

UNIVERSIDAD DEL PAIS VASCO/EUSKAL HERRIKO UNIBERTSITATEA

Departamento de Farmacia y Ciencias de los Alimentos

Área de Tecnología de Alimentos

**PERFIL AROMÁTICO DE LOS QUESOS PALMERO Y HERREÑO
Y ESTUDIO DE SU GRADO DE CONTAMINACIÓN POR
HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS.**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR
AL GRADO DE DOCTOR**

Gemma Palencia Llorente

Vitoria-Gasteiz, 2015

Agradecimientos.

Con estas líneas quisiera expresar mi agradecimiento:

A la directora de este trabajo, Lola, por haberme dado la oportunidad de aprender y trabajar en un gran equipo de investigación así como por sus sabias orientaciones y consejos.

A Marisa, codirectora de esta tesis y excelente compañera.

A Patricia, por enseñarme todo lo que sabía con gran paciencia y dedicación.

Es necesario agradecer la colaboración de Marichu Fresno, de la Universidad Pública de La Laguna, por la aportación de los quesos Palmero y Herreño estudiados en esta memoria.

De igual forma debo mencionar la financiación recibida a través de una beca predoctoral de la Universidad del País Vasco.

Además, también debo mencionar la ayuda de todas/os las/os compañeras/os del área de Tecnología de Alimentos.

Por último, aunque no menos importante, a David por su gran apoyo todos estos años.

Marco y Martín,

ÍNDICE

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1-41
1.- Quesos manufacturados en las Islas Canarias. Estudios previos.	1
1.1. Tipos de quesos.	1
1.2. Estudios previos sobre los Quesos Canarios.	4
1.2.1. Queso Majorero.	4
1.2.2. Queso Palmero.	4
1.2.3. Queso de Tenerife.	6
1.2.4. Queso Herreño.	7
1.2.5. Queso de La Gomera.	7
1.2.6. Queso Flor de Guía.	7
2.- Componentes volátiles del queso y su estudio.	9
2.1.- Métodos para caracterizar los componentes volátiles en queso.	9
2.1.1.-Toma de la muestra.	10
2.1.2.- Preparación de la muestra.	10
2.1.3.- Extracción y aislamiento de los componentes volátiles.	11
2.1.4.- Estudio de los componentes aislados.	16
2.2.- Estudios de componentes volátiles en quesos españoles.	18
3.- Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) y su estudio en quesos.	18
3.1.- Características generales de los HAPs.	19
3.1.1. Definición y estructura.	19
3.1.2. Actividad biológica y carcinogenicidad de los HAPs.	23
3.2.- Legislación sobre HAPs en queso.	28
3.3.- Métodos para la determinación de HAPs en queso.	29
3.3.1.- Técnicas empleadas para la extracción y aislamiento de HAPs en queso.	29

3.3.2.- Técnicas empleadas para la separación, identificación y cuantificación de HAPs.	33
3.3.3.- Métodos oficiales y estudios colaborativos.	34
3.4.- Estudios sobre la presencia de HAPs en queso ahumado y sin ahumar.	35
OBJETIVOS	45-46
MATERIAL Y MÉTODOS	49-66
1. Metodología empleada para la extracción y posterior estudio de los componentes volátiles.	49
1.1. Preparación de las muestras.	49
1.2. Generación del espacio de cabeza y extracción de sus componentes mediante microextracción en fase sólida (SPME).	51
1.3. Desorción, separación, identificación y semicuantificación de los componentes extraídos en un cromatógrafo de gases con detector de espectrometría de masas.	54
2. Metodología empleada para la determinación de HAPs.	57
2.1. Preparación de las muestras.	57
2.2. Compuestos y soluciones de referencia.	58
2.3. Metodología.	59
2.3.1. Extracción de la grasa.	59
2.3.2. Tratamiento alcalino del extracto de grasa.	60
2.3.3. Extracción de HAPs y clarificación del extracto obtenido.	60
2.3.4. Purificación del extracto y aislamiento de los HAPs presentes.	62
2.3.5. Separación, identificación y cuantificación de HAPs por CG/EM (SIM).	62
3. Análisis estadístico.	66
RESULTADOS	69-240

Manuscrito 1: Components detected by means of solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry in the headspace of artisan fresh goat cheese smoked by traditional methods.	73
Manuscrito 2: Components detected by headspace-solid-phase microextraction in the artisanal fresh goat´s cheese smoked using dry prickly pear (<i>Opuntia ficus indica</i>).	117
Manuscrito 3: Complexity and uniqueness of the aromatic profile of smoked and unsmoked Herreño cheese.	143
Manuscrito 4: Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in artisanal palmero cheese smoked with two types of vegetable matter.	177
Manuscrito 5: Contamination of cheese by PAHs in traditional smoking. Influence of the position in the smokehouse on the contamination level of smoked cheese.	207
DISCUSIÓN	243-284
CONCLUSIONES	287-289
BIBLIOGRAFÍA	293-329
OTRAS CONTRIBUCIONES	333-405

INTRODUCCIÓN

1. Quesos manufacturados en las Islas Canarias.

El queso es un alimento elaborado en todas las regiones del mundo donde hay producción lechera, y España no es una excepción. De hecho, en España existe una gran tradición quesera, así como una amplia diversidad de quesos que incluye al menos 81 tipos referenciados (Taborda y col., 2003). La mayoría de los quesos tradicionales han sido ampliamente descritos y varios de ellos poseen Denominación de Origen Protegida (D.O.P.).

Una de las regiones españolas donde la producción quesera tiene gran importancia es el archipiélago Canario. La tradición quesera canaria proviene del desarrollo que la ganadería caprina y ovina experimentó desde tiempos antiguos en estas islas, que se ha mantenido a lo largo del tiempo, dando lugar a la producción de quesos de gran calidad. La mayoría de estos quesos son artesanales y a ellos va destinada más de la mitad de la producción lechera canaria.

1.1. Tipos de Quesos.

En las Islas Canarias se elaboran quesos principalmente de leche de cabra, pero también de oveja y de vaca, así como de mezcla de leche de distintos orígenes. Las características de la leche empleada, determinadas por las razas autóctonas y por la alimentación que reciben los animales, constituyen el principal elemento diferenciador del queso canario, muy rico en variedades. Así, se puede afirmar que en cada isla hay al menos un queso característico que se denomina con el nombre de la isla correspondiente, siendo conocidos el queso Majorero, el queso Palmero, los quesos Tinerfeños, el queso Gomero, el queso de Gran Canaria, el queso de Lanzarote y el queso Herreño.

El **queso Majorero**, elaborado en la isla de Fuerteventura, fue el primer queso canario y el primer queso de cabra español que obtuvo la Denominación de Origen (B.O.E. N° 24 de 23.02.1996). Es un queso elaborado con leche de cabra de raza Majorera, con adición eventual, cuando se destina a la maduración, de hasta un máximo de un 15% de leche de oveja canaria. Es producido tanto a nivel artesanal como industrial.

El **queso Palmero**, que también está amparado bajo una D.O.P. (B.O.E. N° 218 del 11.09.2001), es un queso elaborado con leche cruda de cabra de la raza Palmera. Suele consumirse tierno, generalmente una semana después de su elaboración, y normalmente se ahúma con humo procedente de cáscara de almendra (*Prunus dulcis*), de penca de tunera seca (*Opuntia ficus indica*), de madera de pino canario o de acículas de este mismo árbol (*Pinus canariensis*). Se distinguen dos tipos de queso Palmero: el “Artesano”, que es elaborado por el productor en la propia explotación, con leche cruda recién ordeñada, obtenida exclusivamente de su rebaño; y el de “Manada”, que se elabora con leche de cabras en régimen de pastoreo directo de los recursos forrajeros autóctonos de la zona de producción. Éste último queso se manufactura con un peso igual o superior a los 8 kg.

Los **quesos Tinerfeños** se elaboran con leche cruda o pasteurizada de orígenes diversos. Fundamentalmente se emplea leche de cabra, bien Tinerfeña o Majorera, pero a veces ésta se mezcla con leche de vaca o de oveja. Los más conocidos son los elaborados con leche de cabra y se consumen como quesos frescos. Algunos de estos quesos se ahúman, en ocasiones con plantas aromáticas.

El **queso** de la isla de **La Gomera** se elabora con leche cruda de cabra de las diferentes razas canarias, aunque en ocasiones se mezcla con leche de oveja. La manufactura de estos quesos incluye un ahumado muy intenso, que se realiza unos días después de su elaboración, con humo de jara (*Cistus cadaníferas*), brezo (*Erica vagans*) o tabaiba (*Euphorbia atropurpurea*).

Los **quesos de Gran Canaria** se elaboran, tanto de forma artesanal como industrial, con varios tipos de leche (cabra, vaca, oveja) o de mezcla, si bien predomina el de leche de cabra. Destacan especialmente los quesos de “flor”, que tienen como característica especial que en su elaboración se emplea cuajo vegetal procedente de la flor del cardo. Pueden comercializarse como quesos frescos, semicurados o curados. Dentro de los quesos de flor se diferencian 3 tipos: *Queso de Flor de Guía*, en cuya elaboración se emplea exclusivamente cuajo vegetal obtenido de las flores secas de las variedades de cardo *Cynara cardunculus* var. *ferocissima* y *Cynara scolymus*; *Queso de Media Flor de Guía*, en cuya elaboración la cantidad de cuajo vegetal empleado debe ser superior al 50%; y *Queso de Guía o de Cuajo*, en cuya elaboración se puede emplear cuajo animal y/o vegetal (*Cynara cardunculus* var. *ferocissima*, *Cynara scolymus*) y/u otros fermentos autorizados. Estos quesos están amparados bajo la D.O.P. “Queso de Flor de Guía y Queso de Guía” desde el año 2008 (B.O.E N° 137 del 06.06.08).

El queso de **Lanzarote** se elabora con leche cruda o pasteurizada de cabra de raza Majorera, y el **queso Herreño** con mezcla de leche pasteurizada de cabra, oveja y vaca, todas ellas de raza Canaria. Este último se ahúma con materias vegetales procedentes de la isla de El Hierro como son jara (*Cistus cadaníferas*), tronco de higuera (*Ficus carica*) y *penca de tunera seca* (*Opuntia ficus indica*).

En Canarias, el ahumado del queso se ha realizado de forma tradicional desde tiempos remotos en las islas de La Palma, La Gomera y El Hierro, mientras que en la isla de Tenerife esta práctica se reduce únicamente a dos zonas concretas ubicadas en el norte: Teno y Anaga. El proceso de ahumado y los materiales utilizados como combustible están ligados a la vegetación típica de cada isla, por lo que difieren de una a otra; esta diversidad contribuye a conferir a los quesos características específicas en cada caso.

1.2. Estudios previos sobre los Quesos Canarios.

1.2.1. Queso Majorero.

Uno de los quesos más estudiados ha sido el Majorero. Algunos de estos estudios se han centrado en la determinación de diversos parámetros físico-químicos, microbiológicos y sensoriales a lo largo de su maduración (Peláez y col., 1987; Gómez y col., 1988, 1989; Martín-Hernández y col., 1989; Fresno y Álvarez, 2012). Asimismo, se han examinado los cambios que se producen en la composición y en la flora microbiana de queso Majorero artesanal (Fontecha y col., 1990, Castelo y col., 1992) e industrial (Martín-Hernández y col., 1992), durante su maduración o almacenamiento. Estos estudios han puesto de manifiesto la existencia de diferencias notables entre el queso Majorero industrial, elaborado con leche pasteurizada (Martín-Hernández, 1987), y el queso artesanal elaborado con leche cruda (Fontecha y col., 1990). Tales diferencias podrían explicarse porque la pasteurización elimina microflora autóctona de la leche que influye favorablemente en la evolución del queso a lo largo de su maduración. Sin embargo, teniendo en cuenta que la pasteurización permite la estandarización del procesado del queso y de sus características organolépticas finales y que, además, mejora la calidad higiénico-sanitaria del producto, Requena y colaboradores (1992) desarrollaron un cultivo iniciador específico capaz de impartir algunas características sensoriales peculiares del queso Majorero artesanal al industrial. Precisamente, los estudios más recientes sobre queso Majorero (Calvo y col., 2007, Castillo y col., 2007) hacen referencia al efecto que el empleo de este cultivo iniciador junto con una pasta de cuajo higienizada tiene sobre la lipólisis, proteólisis, textura y otras características sensoriales de este queso (Calvo y col., 2004).

Por último, otros autores (Fresno y Álvarez, 2004) han comprobado la influencia de la alimentación de las cabras majoreras en la calidad de este tipo de queso.

1.2.2. Queso Palmero.

El queso Palmero ha sido objeto de estudios encaminados a profundizar en su proceso de ahumado, con el fin de optimizarlo. El proceso de ahumado de la mayoría de los quesos canarios normalmente se lleva a cabo en ahumaderos artesanales. De hecho, el 81% de los elaboradores ahúma los quesos sobre una rejilla de madera, colocada sobre un bidón metálico al aire libre, lo que les confiere el aspecto de ahumado a bandas claras y oscuras característico del queso Palmero. Sin embargo, este ahumado artesanal origina quesos con poca uniformidad. Por esta razón, en un intento de estandarizar el proceso de ahumado, Álvarez y colaboradores (2006) diseñaron un prototipo de ahumadero artesanal para los quesos Palmeros y compararon los quesos así ahumados con los ahumados por el método tradicional, encontrando que el ahumado experimental reproducía las características de los quesos Palmeros protegidos por la D.O.P.

Fresno y colaboradores (2002) hicieron una recopilación de las distintas metodologías utilizadas por los diferentes productores para elaborar y ahumar el queso Palmero, y realizaron análisis físico-químicos y sensoriales de quesos Palmeros artesanales. Estos mismos autores (Fresno y col., 2004a) realizaron un estudio sobre la preferencia de los consumidores en relación con el color de los quesos Palmeros ahumados, encontrando diferencias entre los consumidores de La Palma y los de Tenerife. Asimismo, Fresno y colaboradores (2007a) compararon el color de quesos elaborados con leche de cabra Palmera, medido por métodos instrumentales, con la apreciación de los consumidores mediante análisis visuales. Estos autores (Fresno y col., 2007b) también estudiaron si los consumidores eran capaces de diferenciar quesos ahumados con distintos materiales, así como el grado de preferencia por los mismos.

Otros aspectos que también han sido objeto de estudio son el efecto del material y del momento de ahumado en el perfil olfato-gustativo de quesos de 4 y 10 días de maduración (Álvarez y col., 2007b; Fresno y col., 2007c), así como la influencia que tiene la

alimentación de las cabras y el tipo de cuajo en la composición mineral de quesos Palmeros (Álvarez y col., 2007a; Fresno y col., 2011; Ledesma y col., 2007).

1.2.3. Queso de Tenerife.

Además de los quesos Majorero y Palmero, los quesos de Tenerife también han sido objeto de estudio y, de hecho, desde el año 2003, se han publicado varios trabajos sobre este tipo de queso. Darías y colaboradores llevaron a cabo estudios cuyo objeto era, por un lado, caracterizar las explotaciones que producen quesos artesanales en esta isla (Darías y col., 2003a), y por otro, conocer con exactitud la metodología empleada en su elaboración en la isla de Tenerife (Darías y col., 2003b). El objetivo final de estos estudios era tipificar los quesos artesanales de Tenerife y caracterizar su proceso de elaboración, estableciendo así las bases para la obtención de una futura Denominación de Origen.

Peláez y colaboradores (Peláez y col., 2003, 2004; Herrera y col., 2006) determinaron el contenido de grasa, proteína, materia seca, así como el pH y las concentraciones de minerales y elementos traza de numerosas muestras de queso de Tenerife, tanto frescos como semicurados. El objetivo de estos estudios fue, por una parte, definir el perfil de los componentes mayoritarios de este tipo de queso y, por otra, estudiar la influencia de la estación y de la región de producción, así como de la cantidad de fibra presente en la dieta de las cabras, sobre las características físico-químicas de los quesos.

Además de parámetros químicos, también se han evaluado atributos sensoriales, especialmente el aroma. Concretamente se ha estudiado el aroma de quesos de Tenerife producidos con leche de cabra pasteurizada y dos tipos de cultivo iniciador, uno comercial y otro patentado formado por tres cepas de bacterias lácticas autóctonas del queso artesanal de Tenerife (González y Zárate, 2012). En general, los quesos elaborados con el cultivo autóctono recibieron mayor puntuación que los elaborados con el comercial.

1.2.4. Queso Herreño.

El queso Herreño ha sido muy poco estudiado. De hecho, hasta donde nosotros sabemos, los únicos estudios publicados en relación con este tipo de queso han sido los llevados a cabo por Fernández-Salguero y colaboradores (1990), que analizaron la composición química del mismo, y por Fresno y colaboradores (2004b), que describieron los antecedentes, las características físico-químicas y sensoriales y los procesos de elaboración (tradicional y actual) del queso Herreño.

1.2.5. Queso de La Gomera.

Los quesos elaborados en La Gomera de forma tradicional con leche de cabra, así como con mezcla de leche de oveja y cabra, han sido caracterizados en cuanto a su composición química, así como en relación a su textura y color, en diferentes estados de maduración (Fresno y col., 2008).

1.2.6. Queso Flor de Guía.

En relación con los quesos de Flor de Guía de Gran Canaria, se ha estudiado su composición química (Fernández-Salguero y col., 1991), así como los compuestos responsables de su aroma (Curioni y Bosset, 2002). También se ha analizado la influencia que tienen los diferentes porcentajes de grasa sobre algunas propiedades físico-químicas (pH, textura, color) de dichos quesos (Sánchez-Macías y col., 2010).

En un trabajo publicado por Moreno-Rojas y colaboradores en 2010 se estudió la composición nutricional y el contenido mineral de los quesos Palmero, Herreño, Majorero, Flor de Guía y de Tenerife entre otros, y se observó que el uso de cuajo vegetal en la elaboración de los quesos proporcionaba los niveles más altos de minerales y elementos traza.

En resumen, se puede decir que la mayor parte de los estudios realizados hasta la fecha sobre quesos canarios se han centrado, sobre todo, en aspectos relacionados con su elaboración, con sus características físico-químicas y sensoriales, con las preferencias de los consumidores y, en el caso de los quesos Palmeros, también con su proceso de ahumado. Además, a pesar de la gran diversidad de quesos producidos en las Islas Canarias y de su importancia en la economía de estas islas, buena parte de ellos hace referencia únicamente a los quesos Majorero y Palmero que, como ya se ha señalado, fueron los primeros en obtener la Denominación de Origen. Esto no es extraño, ya que la obtención de este distintivo requiere la caracterización físico-química del producto, así como la tipificación del proceso de elaboración y de las características sensoriales de los quesos, lo que requiere un estudio previo de todo ello. En cualquier caso, puede decirse que, en general, los quesos canarios no se han estudiado de forma tan exhaustiva como otros tipos de quesos españoles. De hecho, apenas existen estudios sobre sus componentes volátiles, entre los que se encuentran los compuestos responsables de su aroma, que permiten diferenciarlos y que son esenciales para caracterizar el aroma de los distintos tipos de queso.

2. Componentes volátiles del queso y su estudio.

El aroma del queso, que viene determinado en gran parte por sus componentes volátiles, es el resultado de multitud de reacciones que tienen lugar durante su procesado, entre las que se pueden citar reacciones de glicolisis, lipolisis y proteolisis (Marilley y Casey, 2004); además, si el queso se somete a ahumado, su aroma se verá enriquecido con los componentes que se generan en este proceso.

Debido a la importancia que el aroma del queso tiene en su consumo, se han estudiado muy profusamente los componentes volátiles de muchos quesos conocidos, en un intento de definir su perfil aromático. Entre los más estudiados se pueden citar quesos tales como el

8

Manchego (Martínez-Castro y col., 1991; Mallia y col., 2005; Taborda y col., 2008), Torta del Casar (Delgado y col., 2010, 2011), Cheddar (Liebich y col., 1970a,b; Muir y col., 1997; Frank y col., 2004; Burbank y Qian, 2005), Gouda (Sloot y Harkes, 1975a), Limburger (Parliament y col., 1982), Gorgonzola (Martelli, 1989; Moio y col., 2000), Parmesano (Barbieri y col., 1994; Frank y col., 2004, Langford y col., 2012), Ibores (Sabio y Vidal-Aragón, 1996), Camembert (Kubícková y Grosch, 1997), Grana Padano (Moio y Addeo, 1998; Frank y col., 2004), Mozzarella (Moio y col., 1993), Grüyère suizo (Rychlik y Bosset, 2001; Mallia y col., 2005), varios tipos de queso azul y queso Pecorino (Frank y col., 2004; Randazzo y col., 2008, 2010), Provola di Nebrodi (Ziino y col., 2005) o Ragusano (Mallia y col., 2005). Sin embargo, y a pesar de la gran aceptabilidad del queso ahumado (McIlveen y col., 1996), el estudio de sus componentes volátiles no se ha realizado con tanta profundidad como el del no ahumado (Sopelana y col., 2013).

En relación con el queso ahumado, Majcher y colaboradores (2011) realizaron un estudio de los perfiles volátil, sensorial y microbiano durante la elaboración del queso Oscypek ahumado. Asimismo, Majcher y Jelen (2011) estudiaron las diferencias entre el perfil aromático de queso Oscypek ahumado y sin ahumar.

2.1. Métodos para caracterizar los componentes volátiles en queso.

La investigación de los compuestos responsables del aroma y sabor del queso comenzó hace ya más de 30 años, y en este período se ha producido un importante progreso en la identificación de los componentes sápidos y aromáticos del mismo, consecuencia directa del desarrollo de técnicas analíticas como la cromatografía de gases combinada con la espectrometría de masas (CG/EM) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Gracias a dichas técnicas se han identificado gran parte de los componentes que contribuyen al aroma y al flavor del queso, muchos de los cuales se hallan en concentraciones muy bajas.

Algunas de las metodologías y técnicas más empleadas en el estudio de los componentes volátiles del queso se describen a continuación, tanto las utilizadas para la preparación de la muestra como las que permiten el aislamiento de estos compuestos para su posterior estudio por cromatografía. No obstante, debe señalarse que el perfil volátil de una muestra de queso puede parecer diferente dependiendo de la técnica o la metodología utilizada para su estudio. Así, por ejemplo, algunas técnicas sólo son capaces de extraer componentes volátiles de bajo peso molecular (Fernández-García, 1996), y otras no permiten extraer componentes con ciertos grupos funcionales (Thierry y col., 1999).

2.1.1. Toma de muestra.

Dependiendo de cuál sea el objetivo del estudio, el queso se puede dividir en zonas (interior, medio, exterior) y estudiar cada una de ellas por separado, obteniéndose así una visión de todo el queso a través de cada una de sus partes. En otras ocasiones, en cambio, se puede tomar una única porción que abarque todas las partes del queso; sin embargo, este tipo de muestra requiere una buena homogeneización para obtener resultados repetitivos y, además, no permite obtener información de las distintas partes del queso ni conocer si existen diferencias entre ellas. Este inconveniente es muy evidente en el estudio de quesos ahumados, donde los componentes de las zonas externas difieren de forma importante de los de las zonas internas.

2.1.2. Preparación de la muestra.

El siguiente paso es la molienda de la muestra. Esta operación es imprescindible para aumentar la superficie de la muestra y facilitar la liberación de los componentes volátiles. Además, la molienda permite la homogeneización de la muestra que, como ya se ha comentado anteriormente, es una operación especialmente importante cuando se toma una

porción única que abarca a todo el conjunto del queso, ya que en este caso se requiere un mezclado muy eficiente.

2.1.3. Extracción y aislamiento de los componentes volátiles.

Una vez que se dispone de una muestra lo más homogénea posible, la siguiente etapa consiste en la extracción y/o aislamiento de los componentes volátiles. Esta etapa se puede llevar a cabo mediante extracción con disolventes orgánicos (Escriche y col., 1999; Innocente y col., 2000; Larráyo y col., 2001a; Valero y col., 2001), mediante destilación en sus diversas formas (Liebich y col., 1970a,b; Sloot y Harkes, 1975b; Klein, 1990), mediante combinación de las técnicas anteriores, o bien generando el espacio de cabeza y captándolo por distintos procedimientos.

2.1.3.1. Técnicas de extracción. La extracción puede realizarse por distintos métodos tales como:

- a) *Extracción sólido-líquido* de la muestra con un disolvente orgánico y posterior fraccionamiento del extracto con otros disolventes para, en sucesivas etapas, aislar los componentes volátiles (Urbach y col., 1972).
- b) *Extracción con fluidos supercríticos*. Esta técnica emplea generalmente como disolvente dióxido de carbono en condiciones supercríticas y permite eliminar la etapa de concentración del extracto (Gmüer y col., 1987a,b,c; Mohyuddin, 1993; Tuomala y Kallio, 1996; Larráyo y col., 2001b).

El principal inconveniente de las técnicas de extracción es que, aunque permiten aislar todos los componentes volátiles, es imposible evitar la extracción simultánea de grasa, lo que exige fraccionamientos posteriores. Además, existe riesgo de contaminación a través del disolvente y de pérdida de componentes volátiles en la etapa de concentración.

2.1.3.2. Técnicas de destilación. Existen distintas formas de realizar la destilación. Entre éstas se pueden citar:

- a) *Destilación con arrastre de vapor.* Esta técnica consiste en someter una dispersión de queso en agua a la acción de altas temperaturas, con el fin de que los componentes responsables del aroma se volatilicen a la vez que el agua. Esto se puede conseguir también por medio de la inyección de vapor de agua directamente en el interior de la muestra. En una etapa posterior, los componentes objeto de estudio se aíslan mediante crioconcentración o por extracción líquido-líquido con un disolvente orgánico. Sin embargo, a esta técnica se le han atribuido una serie de desventajas, entre las que se puede señalar el efecto de las altas temperaturas necesarias para conseguir la volatilización de los componentes de interés, que pueden provocar la degradación térmica de los mismos o dar lugar a la formación de compuestos nuevos no existentes inicialmente. A pesar de ello, la destilación con arrastre de vapor ha sido empleada por algunos autores para estudiar los componentes volátiles de quesos tales como Emmental (Vamos-Vigyazo y Kiss-Kutz, 1974), Limburger (Parliment y col., 1982), Fontina (Ney y Wirotoma, 1978), Gruyère (Imhof y Bosset, 1989) y Cheddar (Vandeweghe y Reineccius, 1990; Banks y col., 1992).
- b) *Destilación a alto vacío.* Ésta técnica proporciona pequeños volúmenes de extractos concentrados acuosos en los que están incluidos los componentes volátiles del queso. Éstos extractos tienen dos fases: una orgánica y una acuosa, de manera que la separación o aislamiento de los componentes volátiles requiere la utilización de disolventes orgánicos, tales como dicloruro de metileno y dietil éter. Debido a que las muestras ideales para aplicar esta técnica son aquellas que contienen baja humedad, se ha empleado especialmente para el aislamiento de los componentes volátiles en grasas y aceites. Además, esta técnica se ha empleado en el estudio de los componentes volátiles de quesos tales como Cheddar (Day y Libbey, 1964; Dimos y col., 1996; Avsar y col.,

2004), Emmental, Compté, Beaufort (Guichard y col., 1987; Guichard, 1995) y otros (Moio y Addeo, 1998; Qian y Reineccius, 2003).

En resumen, se puede decir que las técnicas de destilación permiten extraer todos los componentes volátiles, pero si la muestra tiene humedad, los componentes aislados se encuentran repartidos entre las fases acuosa y orgánica, con lo que para su aislamiento se requiere el empleo de un disolvente orgánico, de manera que los componentes se repartirán entre la fase acuosa y el disolvente orgánico en función de su coeficiente de partición.

2.1.3.3. Combinación de dos o más técnicas. En un intento de superar los inconvenientes que presenta el empleo de una técnica única para el aislamiento de los componentes volátiles, en ocasiones se suelen emplear dos combinadas. Así, por ejemplo, se han empleado:

- a) Extracción seguida de destilación y fraccionamiento. En la primera etapa se extraen tanto los componentes volátiles como la grasa con un disolvente orgánico, y en la segunda etapa el extracto obtenido se destila a alto vacío para separar por un lado los componentes volátiles y por otro la grasa (Moio y Addeo, 1998; Escriche y col., 1999; O'Riordan y Delahunty, 2001). Esta técnica ha sido empleada en el estudio del queso suizo Emmental (Preininger y col., 1994) y del Cheddar (Avsar y col., 2004).
- b) Extracción-destilación simultánea. Esta técnica está basada en el método desarrollado por Nickerson y Likens (1966). Por medio de ella se obtiene una fracción que contiene los componentes volátiles y semivolátiles junto con agua procedente de la destilación. De esta mezcla los componentes son extraídos utilizando un disolvente con bajo punto de ebullición. Tanto el agua como los disolventes orgánicos son reciclados, evaporándose y condensándose de forma repetitiva. Godefroot y colaboradores (1981) modificaron parcialmente este método para el estudio de los componentes aromáticos del queso.

Maignial y colaboradores (1992) propusieron un sistema de extracción-destilación simultánea que empleaba baja presión y baja temperatura (20-40°C), para evitar la generación de artefactos por efecto del calor. Asimismo, Blanch y colaboradores (1993) describieron un aparato de extracción-destilación simultánea que permitía trabajar a presión reducida, hasta 149 mm de Hg, y minimizaba la pérdida de compuestos de elevada volatilidad. Esta última técnica ha sido utilizada por otros investigadores para estudiar varios quesos Españoles (Mulet y col., 1999; Valero y col., 2001).

c) Destilación a alto vacío con purga de gas inerte y extracción de destilados. En 1982 Liardon y colaboradores aislaron los componentes volátiles de la grasa de muestras de queso Gruyère Suizo mediante la aplicación de la técnica de purga y alto vacío, seguida de extracción con éter de los destilados obtenidos.

2.1.3.4. Extracción de los componentes del *espacio de cabeza*. Otra forma de abordar el estudio de los componentes volátiles del queso consiste en centrarse en el estudio de su espacio de cabeza. La extracción de los componentes del espacio de cabeza implica retenerlos en un soporte o bien arrastrarlos mediante un gas inerte, lo que da lugar a técnicas de espacio de cabeza estático y de espacio de cabeza dinámico, respectivamente.

a) Extracción de los componentes de forma dinámica. Por espacio de cabeza dinámico se entiende el conjunto de componentes que escapan de los alimentos y son inmediatamente arrastrados por una corriente de gas inerte, bien a una trampa fría (purga y trampa) o a un cartucho relleno con un material inerte en el que quedan adsorbidos (Klein, 1990; Bosset y col., 1994; Contarini y Leardi, 1994; Arora y col., 1995; Thierry y col., 1999; Izco y Torre, 2000; Larráyo y col., 2001a; Valero y col., 2001; Pérès y col., 2002; Bellesia y col., 2003; Barrón, y col., 2005a,b, 2007; Taborda y col., 2008; Cornu y col., 2009; Revello-Chion y col., 2010; Di Cagno y col., 2011). En una segunda etapa, estos componentes son desorbidos térmicamente en la mayoría de los casos, o por la acción de microondas.

b) Extracción de los componentes de forma estática. Por espacio de cabeza estático se entiende el conjunto de componentes que escapan de un alimento a una temperatura determinada y pasan a formar parte de la fase gaseosa que lo envuelve (Chin y col., 1996; Dufour y col., 2001; Pères y col., 2002, Kaminarides y col., 2007).

La muestra a analizar se coloca en un vial cerrado, donde se alcanza el equilibrio termodinámico entre la fase sólida y la fase vapor a una temperatura determinada. Una vez generado el espacio de cabeza, es necesario captar o arrastrar sus componentes para su separación, identificación y cuantificación; esto se puede llevar a cabo de diferentes formas:

- b.1) *Técnica de arrastre con gas inerte hasta el inyector*. El espacio de cabeza generado se arrastra directamente mediante una corriente de helio al inyector de un cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama (FID) o de espectrometría de masas (Fernández-García, 1996). La detección de los componentes depende de su concentración en la muestra y de su presión de vapor, así como de la temperatura y de la naturaleza de la muestra objeto de estudio. Sin embargo, aun cuando esta técnica ofrece una gran reproducibilidad, únicamente proporciona información de aquellos componentes más volátiles.
- b.2) *Técnica de captación del espacio de cabeza mediante una jeringa y posterior inyección*. Otra forma de aislar los componentes del espacio de cabeza estático consiste en la captación del espacio de cabeza mediante una jeringa y en la inyección de éstos en la columna de un cromatógrafo de gases (Bottazzi y Battistotti, 1974).
- b.3) *Técnica de microextracción en fase sólida (SPME)*. Los componentes del espacio de cabeza estático también se pueden captar empleando una fibra recubierta por una fase estacionaria, que puede ser de naturaleza diversa. Esta técnica, que fue desarrollada por Arthur y Pawliszyn (1990), se está utilizando ampliamente desde

finales de los años 90 para el estudio de los componentes volátiles de los alimentos, y son muchos los autores que la han aplicado al estudio del espacio de cabeza de quesos tales como Cheddar (Chin y col., 1996; Dufour y col., 2001; Watkins y col., 2002; Frank y col., 2004; Burbank y Qian, 2005), Camembert (Jaillais y col., 1999; Péres y col., 2001), Emmental (Schaller y col., 2000), y otros (Guillén y col., 2000a, 2002, 2005; Pinho y col., 2002, 2003; Lee y col., 2003; Carpino y col., 2004; Verzera y col., 2004; Hayaloglu y col., 2008; Randazzo y col., 2008, 2010; Ferreira y col., 2009; Sheehan y col., 2009; Gkatzionis y col., 2009; Delgado y col., 2010, 2011; Wolf y col., 2010; Milosavljevic y col., 2012; Innocente y col., 2013).

Uno de los inconvenientes que presentan las técnicas de espacio de cabeza es que los componentes detectados y sus proporciones pueden no ser realmente representativos de la fracción volátil del queso por el efecto matriz y otra es que a veces se pueden formar artefactos.

Aun cuando, tal como se ha indicado, se han ensayado numerosas técnicas para el aislamiento de los componentes volátiles del queso, cabe señalar que todavía se sigue investigando en metodologías que permitan aislar los componentes volátiles del queso y de alimentos en general.

2.1.4. Estudio de los componentes aislados.

Una vez aislados los componentes volátiles, su separación se lleva a cabo normalmente por cromatografía de gases, y su identificación y cuantificación empleando un detector de espectrometría de masas, o a veces un detector FID para la cuantificación. En otros casos para el estudio de aquellos componentes que exclusivamente aportan olor también se ha empleado la olfatometría (Kubicková y Grosch, 1997; Milo y Reineccius, 1997; Rychlik y Bosset, 2001; Curioni y Bosset, 2002).

Debe señalarse que, a pesar del empleo de columnas capilares largas y de diferente polaridad, la perfecta separación de todos y cada uno de los componentes volátiles del queso puede resultar a veces prácticamente imposible, debido a su elevado número así como a la coincidencia de sus tiempos de retención. Esta dificultad en la separación conlleva, a su vez, dificultad en la identificación y cuantificación.

Algunos autores que emplean la extracción con fluidos supercríticos, optan por llevar a cabo el estudio de los componentes aislados mediante cromatografía supercrítica, ya que esta técnica posibilita la detección de componentes que se encuentran en concentraciones a nivel de trazas en presencia de grandes proporciones de glicéridos (Gmüer y col., 1987a,b,c).

Pères y colaboradores utilizaron un método en el que los componentes volátiles, aislados mediante espacio de cabeza dinámico (2002) o mediante SPME (2001), se inyectan directamente, sin separación cromatográfica previa, en un espectrómetro de masas a través de una corta línea de transferencia. El espectro de masas así obtenido representa una “huella dactilar” de los volátiles del queso objeto de estudio y los fragmentos de masas se toman como descriptores potenciales de la composición del espacio de cabeza. Este método ofrece la ventaja de que permite minimizar las modificaciones térmicas, mecánicas y químicas de la muestra, reduciendo así el riesgo de artefactos. Sin embargo, no permite identificar componentes individuales ya que lo que se consigue es una caracterización global de la fracción volátil del queso.

En los estudios realizados previamente sobre los componentes volátiles de distintos quesos, se ha puesto de manifiesto que algunas familias de compuestos están presentes, en general, en todos los tipos de queso, variando en número y concentración. Entre éstas se pueden citar ácidos, alcoholes, ésteres, aldehídos y cetonas, entre otras, y si el queso es ahumado, además, se pueden encontrar derivados de furano y pirano, fenol, guayacol, siringol y sus derivados, entre otros.

2.2. Estudios de componentes volátiles en quesos españoles.

A pesar de que se han estudiado con gran profusión los componentes volátiles de muchos tipos de queso, los de los quesos españoles han sido menos estudiados; sin embargo hay estudios sobre componentes volátiles de el queso Manchego (Martínez-Castro y col., 1991; Mallia y col., 2005; Taborda y col., 2008), del queso de los Ibores (Sabio y col., 1996), del Zamorano (Fernández-García y col., 2004), del de La Serena (Carbonell y col., 2002; Arqués y col., 2007), del Roncal (Izco y Torre, 2000), del Idiazabal (Barrón y col., 2005a,b, 2007; Guillén y col., 2005; Guillén y Abascal, 2005, 2009, 2012; Abilleira y col., 2010), del Arzúa-Ulloa y del queso de Tetilla (Rodríguez-Alonso y col., 2009) o de la Torta del Casar (Delgado y col., 2010, 2011), entre otros.

En referencia a los quesos canarios, su fracción volátil apenas ha sido objeto de estudio. Únicamente Castillo y colaboradores (2007) han estudiado los cambios en la fracción volátil de queso Majorero semicurado obtenido empleando una pasta de cuajo higienizada y un tipo definido de cultivo iniciador. Por tanto, debido a la escasa información publicada en relación con los componentes volátiles de los quesos canarios, entre los que como es sabido se encuentran los compuestos responsables de su olor y, en parte, de su sabor, en esta memoria se ha planteado su estudio en diferentes tipos de quesos canarios. La mayoría de los quesos estudiados son ahumados, ya que el ahumado enriquece la fracción volátil del queso con componentes procedentes del humo, los cuales pueden aportar notas muy diversas y, a la vez, específicas. Este estudio contribuirá a caracterizar y tipificar algunos quesos canarios, y a establecer sus peculiaridades en relación con otros tipos de queso.

3. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) y su estudio en quesos.

Como se ha comentado anteriormente, algunos quesos canarios se someten a ahumado. A este proceso se le han atribuido distintos efectos beneficiosos, entre los que cabe destacar la prolongación de la vida útil del alimento debido a las propiedades antimicrobianas y

antioxidantes de algunos de los componentes del humo (Wasilewski y col., 1977; Wendorff y col., 1993), así como el cambio en las propiedades organolépticas del alimento referidas a color, olor, sabor y textura (Riha y Wendorff, 1993; Cardoso y col., 1995). Sin embargo, si el proceso de ahumado no se realiza en condiciones adecuadas, puede provocar la incorporación al queso de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs), algunos de los cuales tienen capacidad carcinogénica (Guillén y Sopelana, 2003). Estos compuestos, que se pueden encontrar en el ambiente y en los alimentos, se generan en la pirólisis de la madera junto con los demás componentes del humo, y su formación se ve favorecida si el proceso se lleva a cabo a temperaturas altas (Tóth y Blaas, 1972a,b,c).

3.1. Características generales de los HAPs.

3.1.1. Definición y estructura.

Los HAPs son compuestos formados por dos o más anillos aromáticos fusionados, constituidos por carbono e hidrógeno, con o sin sustituyentes. El compuesto más simple de este grupo es naftaleno, mientras que los de mayor peso molecular susceptibles de ser estudiados por cromatografía de gases son los dibenzopirenos.

Debe señalarse que, a pesar de la gran variedad de compuestos aromáticos policíclicos existentes, en esta memoria únicamente se han considerado los HAPs y sus derivados alquilados. En la **Tabla 1** se presenta una relación de los principales HAPs no sustituidos, junto con su fórmula, estructura, peso molecular y número de anillos aromáticos.

Tabla 1. Relación de HAPs no sustituidos junto con su fórmula, estructura, peso molecular (PM), y número de anillos aromáticos (N).






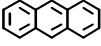
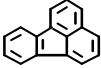

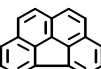
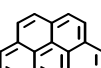
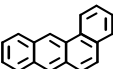
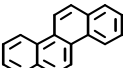
HAP	Fórmula	Estructura	PM	N
Naftaleno	C ₁₀ H ₈		128	2
Acenaftileno	C ₁₂ H ₈		152	3
Acenafteno	C ₁₂ H ₁₀		154	2
Fluoreno	C ₁₃ H ₁₀		166	2
Fenantreno	C ₁₄ H ₁₀		178	3
Antraceno	C ₁₄ H ₁₀		178	3
Fluoranteno	C ₁₆ H ₁₀		202	4
Pireno	C ₁₆ H ₁₀		202	4
Benzo(g,h,i)fluoranteno	C ₁₈ H ₁₀		226	5
Ciclopenta(c,d)pireno	C ₁₈ H ₁₀		226	5
Benzo(a)antraceno	C ₁₈ H ₁₂		228	4
Criseno	C ₁₈ H ₁₂		228	4

Tabla 1. Continuación.


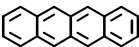
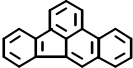
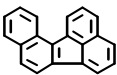
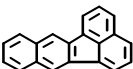
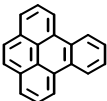
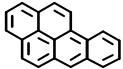
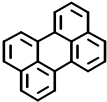
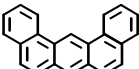
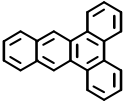
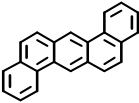
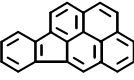
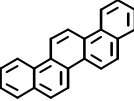
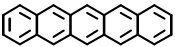
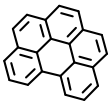
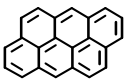
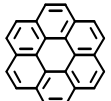
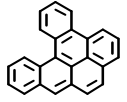
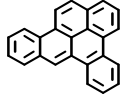
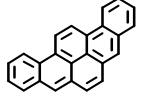
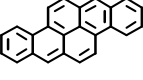
HAP	Fórmula	Estructura	PM	N
Trifenileno	$C_{18}H_{12}$		228	4
Naftaceno	$C_{18}H_{12}$		228	4
Benzo(b)fluoranteno	$C_{20}H_{12}$		252	5
Benzo(j)fluoranteno	$C_{20}H_{12}$		252	5
Benzo(k)fluoranteno	$C_{20}H_{12}$		252	5
Benzo(e)pireno	$C_{20}H_{12}$		252	5
Benzo(a)pireno	$C_{20}H_{12}$		252	5
Perileno	$C_{20}H_{12}$		252	5
Dibenzo(a,j)antraceno	$C_{22}H_{14}$		278	5
Dibenzo(a,c)antraceno	$C_{22}H_{14}$		278	5
Dibenzo(a,h)antraceno	$C_{22}H_{14}$		278	5

Tabla 1. Continuación.

HAP	Fórmula	Estructura	PM	N
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	C ₂₂ H ₁₂		276	6
Piceno	C ₂₂ H ₁₄		278	5
Pentaceno	C ₂₂ H ₁₄		278	5
Benzo(g,h,i)perileno	C ₂₂ H ₁₂		276	6
Antantreno	C ₂₂ H ₁₂		276	6
Coroneno	C ₂₄ H ₁₂		300	7
Dibenzo(a,l)pireno	C ₂₄ H ₁₄		302	6
Dibenzo(a,e)pireno	C ₂₄ H ₁₄		302	6
Dibenzo(a,i)pireno	C ₂₄ H ₁₄		302	6
Dibenzo(a,h)pireno	C ₂₄ H ₁₄		302	6

3.1.2. Actividad biológica y carcinogenicidad de los HAPs.

La actividad biológica de los HAPs y, sobre todo, el potencial carcinogénico de muchos de ellos, es lo que ha convertido a este grupo de contaminantes en objeto de estudio constante desde que, en 1933, Cook y colaboradores aislaron por vez primera benzo(a)pireno a partir de alquitrán, observando que producía tumores malignos al ser aplicado a la piel de ratones.

La carcinogenicidad de los HAPs se puede expresar de diversas formas. Así, además de las **clasificaciones establecidas por organismos internacionales, como la IARC** (Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer, “International Agency for Research on Cancer”) o **la USEPA** (Agencia Americana para la Protección del Medio Ambiente, “United States Environmental Protection Agency”), que están basadas en la mayor o menor evidencia de si la exposición a un determinado HAP produce efectos carcinogénicos, existen otras formas de expresar el grado de carcinogenicidad de estos compuestos. Entre éstas, se pueden mencionar el **índice de Badger**, en el que la carcinogenicidad varía entre (-) y (++++), (Badger, 1948), la **escala propuesta por Cavalieri y colaboradores** (Cavalieri y col., 1983, 1985), que caracteriza la carcinogenicidad en orden creciente desde (-) hasta (+++++), el menos común **índice Iball** (Braga y col., 1999) o las **potencias carcinogénicas relativas (PR)** (Collins y col., 1991). El índice Iball es proporcional a la fracción de animales que muestran una respuesta carcinogénica como resultado de su exposición a un posible carcinógeno, dividida por el período medio de latencia. Por otra parte, las PR expresan la carcinogenicidad en relación con la de benzo(a)pireno, que se considera 1; éstas se utilizan para estimar cuantitativamente el riesgo de cáncer asociado con la exposición a HAPs.

Debe señalarse que, a menudo, existen diferencias entre el grado de carcinogenicidad asignado a los diferentes HAPs en unas clasificaciones y otras. Además, hay que tener en

cuenta que éstas pueden verse modificadas a medida que se realizan más estudios y se obtienen nuevos datos. Un ejemplo muy significativo es el de naftaleno, que durante muchos años ha sido considerado no carcinogénico. Sin embargo, desde que en el año 2000 se pusiera de manifiesto la actividad carcinogénica de este HAP en ratas (NTP, 2000), agencias internacionales como la IARC lo han reclasificado, considerándolo como posible carcinogénico en humanos (grupo 2B) (IARC, 2002). Asimismo, se puede mencionar el caso de benzo(a)pireno que, en el año 2005, pasó de ser considerado probablemente carcinogénico en humanos por la IARC (grupo 2A) a carcinogénico en humanos (grupo 1) (IARC, 2010).

En la **Tabla 2** se presenta un amplio número de HAPs y su grado de carcinogenicidad según diversas fuentes.

Tabla 2. Carcinogenicidad de una serie de HAPs, expresada de diferentes formas.

HAP	C1 ^a	C2 ^b	C3 ^c	Iball ^d	PR ^e
Naftaleno	2B	-	-	ND ^f	ND
Acenafteno	3	ND	ND	ND	ND
Fluoreno	3	ND	ND	ND	ND
Fenantreno	3	-	-	00	ND
1-Metilfenantreno	3	ND	ND	ND	ND
1,4-Dimetilfenantreno	3	ND	ND	ND	ND
Antraceno	3	-	-	ND	ND
5,10-Dimetilantraceno	ND	ND	+	ND	ND
9,10-Dimetilantraceno	ND	+	ND	ND	ND
Fluoranteno	3	ND	ND	ND	ND
2-Metilfluoranteno	3	ND	ND	ND	ND
3-Metilfluoranteno	3	ND	ND	ND	ND
Pireno	3	-	ND	ND	0,081
1-Metilpireno	ND	-	ND	ND	ND
2-Metilpireno	ND	-	ND	ND	ND
4-Metilpireno	ND	-	ND	ND	ND

Tabla 2. Continuación.

HAP	C1 ^a	C2 ^b	C3 ^c	Iball ^d	PR ^e
Benzo(b)fluoreno	3	ND	ND	ND	ND
Benzo(c)fluoreno	3	ND	ND	ND	ND
Benzo(c)fenantreno	2B	+	ND	ND	ND
1-Metilbenzo(c)fenantreno	ND	+	ND	ND	ND
2-Metilbenzo(c)fenantreno	ND	+	ND	ND	ND
3-Metilbenzo(c)fenantreno	ND	++	ND	ND	ND
4-Metilbenzo(c)fenantreno	ND	++	ND	ND	ND
5-Metilbenzo(c)fenantreno	ND	+++	ND	ND	ND
6-Metilbenzo(c)fenantreno	ND	++	ND	ND	ND
Benzo(a)antraceno	2B	±	±	07	0,145
1-Metilbenzo(a)antraceno	ND	-	-	ND	ND
2-Metilbenzo(a)antraceno	ND	-	-	ND	ND
3-Metilbenzo(a)antraceno	ND	-	-	ND	ND
4-Metilbenzo(a)antraceno	ND	ND	-	ND	ND
5-Metilbenzo(a)antraceno	ND	-	-	ND	ND
6-Metilbenzo(a)antraceno	ND	++	++	ND	ND
7-Metilbenzo(a)antraceno	ND	+++	+++	ND	ND
8-Metilbenzo(a)antraceno	ND	-	++	ND	ND
9-Metilbenzo(a)antraceno	ND	-	+	ND	ND
10-Metilbenzo(a)antraceno	ND	ND	±	ND	ND
11-Metilbenzo(a)antraceno	ND	-	-	ND	ND
12-Metilbenzo(a)antraceno	ND	++	++	ND	ND
5,12-Dimetilbenzo(a)antraceno	ND	ND	-	ND	ND
6,8-Dimetilbenzo(a)antraceno	ND	+++	++++	ND	ND
6,12-Dimetilbenzo(a)antraceno	ND	++++	++++	ND	ND
7,12-Dimetilbenzo(a)antraceno	ND	+++++	++++	ND	ND
8,12-Dimetilbenzo(a)antraceno	ND	ND	++++	ND	ND
9,10-Dimetilbenzo(a)antraceno	ND	ND	++	ND	ND
7-Etilbenzo(a)antraceno	ND	+	ND	ND	ND
12-Etilbenzo(a)antraceno	ND	-	ND	ND	ND
6,8,12-Trimetilbenzo(a)antraceno	ND	++++	ND	ND	ND
Criseno	2B	±	+	05	0,0044

Tabla 2. Continuación.

HAP	C1 ^a	C2 ^b	C3 ^c	Iball ^d	PR ^e
1-Metilcriseno	3	ND	-	ND	ND
2-Metilcriseno	3	ND	-	ND	ND
3-Metilcriseno	3	ND	-	ND	ND
4-Metilcriseno	3	ND	-	ND	ND
5-Metilcriseno	2B	+++	++++	ND	ND
6-Metilcriseno	3	±	-	ND	ND
2,3-Dimetilcriseno	ND	ND	-	ND	ND
5,6-Dimetilcriseno	ND	ND	++	ND	ND
5,12-Dimetilcriseno	ND	ND	-	ND	ND
Trifenileno	3	-	-	00	ND
Naftaceno	ND	-	ND	ND	ND
Benzo(b)fluoranteno	2B	ND	ND	ND	0,141
Benzo(j)fluoranteno	2B	ND	ND	ND	0,061
Benzo(k)fluoranteno	2B	ND	ND	ND	0,066
Benzo(a)fluoranteno	3	ND	ND	ND	ND
Benzo(e)pireno	3	-	+	02	0,004
Benzo(a)pireno	1	++++	++++	72	1,0
1-Metilbenzo(a)pireno	ND	++++	ND	ND	ND
2-Metilbenzo(a)pireno	ND	++++	ND	ND	ND
3-Metilbenzo(a)pireno	ND	++++	ND	ND	ND
4-Metilbenzo(a)pireno	ND	++++	ND	ND	ND
5-Metilbenzo(a)pireno	ND	+++	ND	ND	ND
6-Metilbenzo(a)pireno	ND	+++	ND	ND	ND
7-Metilbenzo(a)pireno	ND	+++	ND	ND	ND
10-Metilbenzo(a)pireno	ND	+	ND	ND	ND
11-Metilbenzo(a)pireno	ND	++++	ND	ND	ND
12-Metilbenzo(a)pireno	ND	++++	ND	ND	ND
1,2-Dimetilbenzo(a)pireno	ND	++++	ND	ND	ND
1,3-Dimetilbenzo(a)pireno	ND	++++	ND	ND	ND
1,4-Dimetilbenzo(a)pireno	ND	++++	ND	ND	ND
1,6-Dimetilbenzo(a)pireno	ND	+++	ND	ND	ND
2,3-Dimetilbenzo(a)pireno	ND	++++	ND	ND	ND
3,6-Dimetilbenzo(a)pireno	ND	+++	ND	ND	ND

Tabla 2. Continuación.

HAP	C1 ^a	C2 ^b	C3 ^c	Iball ^d	PR ^e
3,12-Dimetilbenzo(a)pireno	ND	++++	ND	ND	ND
4,5-Dimetilbenzo(a)pireno	ND	++++	ND	ND	ND
7,10-Dimetilbenzo(a)pireno	ND	-	ND	ND	ND
6-Etilbenzo(a)pireno	ND	-	ND	ND	ND
Perileno	3	-	-	ND	ND
3-Metilcolantreno	ND	++++	ND	ND	ND
1,3-Dimetilcolantreno	ND	++	ND	ND	ND
2,3-Dimetilcolantreno	ND	++	ND	ND	ND
Dibenzo(a,c)antraceno	3	+	+	03	ND
Dibenzo(a,h)antraceno	2A	+++	++	26	1,11
Dibenzo(a,j)antraceno	3	+	ND	04	ND
Indeno(1,2,3-cd)pireno	2B	ND	ND	ND	0,232
Benzo(b)criseno	3	ND	-	ND	ND
7,12-Dimetilbenzo(b)criseno	ND	ND	-	ND	ND
Piceno	3	-	-	ND	ND
Benzo(g,h,i)perileno	3	-	ND	ND	0,022
Antantreno	3	±	ND	ND	0,320
6-Metilantantreno	ND	++	ND	ND	ND
6,12-Dimetilantantreno	ND	++	ND	ND	ND
Ciclopenta(c,d)pireno	2A	-	ND	ND	0,023
Coroneno	3	-	ND	ND	ND
Dibenzo(a,e)fluoranteno	3	ND	ND	ND	ND
Dibenzo(a,e)pireno	3	+++	+++	50	ND
Dibenzo(a,i)pireno	2B	++++	++++	74	ND
Dibenzo(a,h)pireno	2B	++++	++++	68	ND
Dibenzo(a,l)pireno	2A	++++	ND	33	ND
Dibenzo(e,l)pireno	ND	-	ND	ND	ND

^a Carcinogenicidad según la clasificación de la IARC (IARC, 1973, 1983, 2002, 2010). **1**: carcinogénico en humanos; **2A**: probablemente carcinogénico en humanos; **2B**: posiblemente carcinogénico en humanos; **3**: inclasificable en cuanto a su carcinogenicidad en humanos; ^b Datos de Cavalieri y colaboradores (Cavalieri y col., 1983; Cavalieri y Rogan, 1985): +++++, extremadamente activo; +++++, muy activo; +++, activo; ++, moderadamente activo; +, débilmente activo; ±, muy débilmente activo; -, inactivo; ^c Datos de Loew y colaboradores (1980, 1985); ^d Índice Iball, tomado de Braga y colaboradores (1999); ^e **PR**: potencias carcinogénicas relativas, adaptadas de Krewski y colaboradores (1989); ^f **ND**: No hay datos.

En la Tabla 2 se puede observar que existen diferencias notables entre isómeros, y que la metil sustitución afecta de forma importante al grado de carcinogenicidad de los distintos HAPs, ya que la presencia de grupos alquilo en determinadas posiciones confiere o intensifica el potencial carcinogénico de algunos de ellos (Irwin y col., 1998).

3.2. Legislación sobre HAPs en queso

A pesar de los efectos perjudiciales de los HAPs para la salud humana, y de su presencia en una gran variedad de alimentos, hay que resaltar la **falta de medidas legales para evitar o limitar la presencia de estos contaminantes** en los mismos. Además, en relación con las medidas existentes, cabe hacer las siguientes consideraciones: (a) no existen límites en todos los países; (b) los límites existentes sólo hacen referencia a unos pocos alimentos; (c) no existe un consenso en cuanto a concentraciones máximas permitidas, ni entre países ni entre alimentos; y (d) las disposiciones establecidas sólo afectan a la concentración de un número muy limitado de compuestos, aun cuando se conoce que existen muchos otros HAPs con actividad carcinogénica reconocida que, además, se han encontrado en alimentos.

En el Reglamento CE 835/2011 de la Comisión Europea (19 de agosto de 2011) y en el Reglamento CE 1327/2014 de la Comisión Europea (12 de diciembre de 2014) se han establecido límites para ciertos HAPs en algunos alimentos como carnes y productos cárnicos ahumados, aceites y grasas, productos pesqueros ahumados y moluscos bivalvos ahumados y sin ahumar, entre otros. Estos límites varían entre 2 y 6 µg/kg para benzo(a)pireno y entre 10 µg/kg y 30 µg/kg para la suma de benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno y criseno. Hay que destacar que, a pesar de que los HAPs son lipofílicos, de que los lípidos son componentes mayoritarios del queso y de que algunos quesos se someten al proceso de ahumado, este alimento no ha sido incluido en el citado Reglamento.

A la legislación anterior hay que añadir otra más antigua (Directiva 88/388/CEE de 22 de junio de 1988), que hace referencia única y exclusivamente a los alimentos ahumados con aromas de humo, estableciendo un máximo de 0,03 µg/kg de benzo(a)pireno. Sin embargo, aun cuando no se ha señalado ninguna razón para ello, en España está prohibido el ahumado de queso con aromas de humo; en consecuencia, el único límite que existe actualmente en nuestro país para HAPs en queso es el establecido para benzo(a)pireno en el Real Decreto 1113/2006, del 29 de Septiembre, por el que se aprueban las normas de calidad para quesos y quesos fundidos; según esta Orden, la concentración de este HAP no debe sobrepasar los 10 µg/kg en la corteza de quesos ahumados madurados.

3.3. Métodos para la determinación de HAPs en queso.

La determinación de HAPs en queso, al igual que en la mayor parte de alimentos, es una tarea difícil por varias razones; entre ellas, cabe señalar la complejidad de este alimento, integrado por componentes de naturaleza diversa, y su alta proporción de grasa, ya que los componentes lipídicos se disuelven en los mismos disolventes que los HAPs, interfiriendo en la determinación de éstos.

3.3.1. Técnicas empleadas para la extracción y aislamiento de HAPs en queso.

De un modo general, puede decirse que los primeros estudios sobre la presencia de HAPs en alimentos se centraban únicamente en la determinación del bien conocido carcinógeno benzo(a)pireno, si bien a medida que avanzaron las técnicas analíticas se empezaron a determinar un mayor número de estos compuestos. Entre los primeros métodos utilizados para el estudio de HAPs en alimentos, empleados también para muestras de queso, cabe destacar los dos desarrollados en 1966 por Howard y colaboradores para la determinación de HAPs en alimentos ahumados: uno para HAPs en general (Howard y col., 1966a) y otro específico para benzo(a)pireno (Howard y col., 1966b). Muy brevemente, las

etapas que incluían estos procedimientos eran una *digestión alcalina* inicial del producto con hidróxido potásico etanólico, seguida por una etapa de *extracción con iso-octano*. El aislamiento de los HAPs de otros compuestos interferentes se llevaba a cabo mediante *cromatografía en columna de florisil*, seguida por *partición entre dimetilsulfóxido e iso-octano*, *cromatografía en papel* y *cromatografía en capa fina*. Estos métodos fueron analizados en colaboración entre la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC, “Association of Official Analytical Chemists”) y la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, “International Union of Pure and Applied Chemistry”) (Howard y col., 1968; Fazio y col., 1973), y el método para HAPs en general fue adoptado como método oficial por la AOAC en 1973 (Howard y Fazio, 1980).

Desde entonces, se han desarrollado numerosos métodos para la determinación de HAPs en alimentos, de los cuales algunos han sido empleados también para el estudio de queso. A pesar de las diferencias existentes entre unos procedimientos y otros, puede decirse que gran parte de ellos comienzan, al igual que los de Howard y colaboradores (1966a,b), con una *digestión alcalina* de la muestra, seguida por una o más *particiones líquido-líquido* y por *cromatografía en columna* con adsorbentes de naturaleza diversa, que tienen por objeto separar los HAPs de compuestos de naturaleza lipídica y otros compuestos interferentes. Entre estos métodos, cabe señalar el descrito por Grimmer y Böhnke en 1975; según estos investigadores, los alimentos ricos en proteína, entre los que se incluye el queso, son sometidos a una *digestión alcalina* inicial con hidróxido potásico y metanol. Los HAPs son extraídos y concentrados mediante dos etapas de *extracción líquido-líquido* (metanol-agua-ciclohexano, N,N-dimetilformamida-agua-ciclohexano) y por *cromatografía en columna* sobre *Sephadex LH-20*. Este procedimiento ha sido utilizado con algunas modificaciones para la determinación tanto de benzo(a)pireno (Lintas y col., 1979) como de un número más alto de HAPs (Panalaks, 1976) en queso ahumado. Este método también fue objeto de un estudio colaborativo, del que se publicó un informe en 1978 (Fazio y Howard, 1983).

Además de Grimmer y Böhnke, (1975), otros investigadores también han empleado la **digestión alcalina** como primera etapa para el estudio de la presencia de HAPs en queso (Joe y col., 1984; Riha y col., 1992; Dafflon y col. 1995; Bosset y col., 1998; Anastasio y col., 2004). Algunos autores sostienen que la digestión alcalina es necesaria cuando se estudian alimentos ricos en proteínas, ya que este tratamiento permite liberar los HAPs de las estructuras de las que forman parte, haciendo posible una extracción más completa de los mismos (Howard y col., 1966a,b; Grimmer y Böhnke, 1975; Takatsuki y col., 1985; Chen y col., 1996); además, se ha señalado que la digestión alcalina es útil para eliminar lípidos, ácidos grasos libres e impurezas solubles en agua. Sin embargo, a pesar de ello, también existen estudios en los que los HAPs se extraen directamente, sin una digestión alcalina previa de la muestra (Soós y col., 1980; Pagliuca y col., 2003). En relación con la necesidad o no de la digestión alcalina, Guillén y Sopolana (2004a) comprobaron que, efectivamente, esta etapa era necesaria para la eliminación de ácidos que interfieren de forma importante en la determinación de HAPs en queso, sobre todo cuando el análisis de los mismos se lleva a cabo por CG/EM. Además, señalaron la conveniencia de realizar la digestión alcalina, no directamente sobre la muestra, sino sobre la grasa extraída previamente de la misma. Por tanto, a pesar de que el tratamiento alcalino de las muestras es un proceso largo, constituye un buen método de purificación.

En una segunda etapa, se lleva a cabo la **extracción de HAPs con un disolvente orgánico**, generalmente *ciclohexano* (Dafflon y col., 1995; Bosset y col., 1998; Pagliuca y col., 2003; Anastasio y col., 2004; Guillén y Sopolana, 2004a; Naccari y col., 2008), aunque también se han utilizado otros, como *iso-octano* (Howard y col., 1966a,b), *1,1,2-tricloro-1,2,2-trifluoroetano* (freon 113) (Joe y col., 1984) o *n-hexano* (Suchanová y col., 2008). Guillén y Sopolana (2004a) encontraron que era necesaria una clarificación del extracto con tungstato sódico para lograr la precipitación de lipoproteínas y otros

compuestos en suspensión, que impedían una correcta separación de fases durante la extracción de los HAPs con ciclohexano.

En 1977, Potthast propuso un método para el aislamiento rápido de HAPs en productos cárnicos ahumados, que también se utilizó para queso ahumado, y que presentaba como novedad la introducción de *carbonato de propileno*. Según el propio autor, este procedimiento permitía la extracción de HAPs libres de compuestos de naturaleza lipídica y una reducción del tiempo invertido en el proceso. Sin embargo, apenas ha sido empleado.

Una vez obtenido el extracto que contiene los HAPs presentes en la muestra, el siguiente paso es la **purificación del mismo**. Ésta se puede llevar a cabo por medio de *particiones líquido-líquido* con *dimetilsulfóxido* (Howard y col., 1966a,b; Joe y col., 1984) o con *dimetilformamida/agua* (9:1, v/v) (Grimmer y Böhnke, 1975; Pagliuca y col., 2003), y/o por *cromatografía de adsorción*, bien utilizando columnas (Howard y col., 1966a,b; Grimmer y Böhnke, 1975; Panalaks, 1976; Lintas y col., 1979; Joe y col., 1984) o *cartuchos de extracción* en fase sólida, rellenos, en general, con florisil o silicagel (Dafflon y col., 1995; Bosset y col., 1998; Pagliuca y col., 2003; Anastasio y col., 2004; Guillén y Sopenana, 2004a). También la *cromatografía de permeación en gel* (GPC, “Gel Permeation Chromatography”) se ha aplicado para la purificación de extractos de HAPs y se ha considerado muy efectiva para eliminar interferencias de elevado peso molecular.

Muchos de los procedimientos de extracción y purificación utilizados para la determinación de HAPs presentan el inconveniente de que requieren mucho tiempo y grandes cantidades de disolventes orgánicos, normalmente tóxicos y caros. Por todo ello, desde hace ya unos años, parte de la investigación se ha centrado en el desarrollo de **métodos alternativos más eficientes que generen menos residuos y que simplifiquen el análisis de HAPs** de manera que permitan realizar esta determinación de forma más rápida y adecuada para métodos de rutina. Esto ha llevado a la utilización de técnicas tales como: la *extracción con fluidos supercríticos* (SFE, “supercritical fluid extraction”), que permite

tiempos de extracción más cortos con recuperaciones más altas y menor consumo de disolventes orgánicos; la *extracción acelerada con disolvente* (ASE, “accelerated solvent extraction”), que potencia la eficacia de extracción operando automáticamente a presión y temperatura elevadas y utilizando pequeños volúmenes de disolventes; o la *extracción asistida con microondas* (MAE, “microwave-assisted extraction”).

Por último, en los últimos años, se ha desarrollado una metodología para la extracción y aislamiento de HAPs basada en QuEChERS (“Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe”). Ésta se ha utilizado para la determinación de HAPs en algunas matrices alimentarias, sobre todo productos de la pesca (Johnson, 2012; Madureira y col., 2014).

El principal inconveniente que presentan algunas de estas últimas técnicas es su elevado coste y exceptuando la ASE, que ha sido aplicada a la determinación de HAPs en queso ahumado (Michalski y Germuska, 2003), las demás no han sido empleadas en el estudio de este tipo de alimento.

En conclusión, puede decirse que, a pesar del desarrollo de nuevas técnicas, los métodos clásicos de extracción siguen utilizándose, probablemente debido a que estos últimos son más baratos y no necesitan equipamiento adicional, lo que facilita su empleo.

Por último hay que añadir que la **SPME**, descrita entre las técnicas para el estudio de compuestos volátiles, ha sido utilizada también para la extracción de HAPs en algunos alimentos como pescado o aceites vegetales; no obstante, el rango de HAPs determinado dependerá de si la extracción se lleva a cabo en el espacio de cabeza (Guillén y Errecalde, 2002; Aguinaga y col., 2008) o por inmersión en el caso de muestras líquidas (Purcaro y col., 2007a, b). En relación con el queso también se ha estudiado la posibilidad de utilizar esta técnica como herramienta de cribado para diferenciar muestras de queso ahumado con distinto grado de contaminación por HAPs (Guillén y Sopelana, 2005).

3.3.2. Técnicas empleadas para la separación, identificación y cuantificación de HAPs.

Varios autores (Grimmer y Böhnke, 1975; Vaessen y col., 1984; Chen, 1997) han señalado que la CG/EM parece ser la técnica más útil para la determinación de un elevado número de HAPs, debido al gran poder de resolución de la CG y a la especificidad de detección de la EM (Howard y Fazio, 1980; Uthe y Musial, 1988). Además, la detección por EM permite la utilización de HAPs deuterados como patrones internos, que presentan muchas ventajas en relación con otro tipo de compuestos utilizados con este fin (Baumard y Budzinski, 1997). Sin embargo, hay que señalar que, a pesar de las ventajas de la CG/EM, esta técnica ha sido poco utilizada para la determinación de HAPs en queso (Lintas y col., 1979; Guillén y Sopelana, 2004a), siendo la *cromatografía líquida de alta resolución* (HPLC) con *detección UV y/o de FL*, la técnica más ampliamente empleada (Howard y col., 1966a,b; Soós, 1980; Crosby y col., 1981; Riha y col., 1992; Lodovici y col., 1995; Bosset y col., 1998; García Falcón y col., 1999; Pagliuca y col., 2003; Anastasio y col., 2004; Suchanová y col., 2008). Esta última presenta la ventaja de que permite separar algunos HAPs isómeros como, por ejemplo, benzo(b)fluoranteno, benzo(j)fluoranteno y benzo(k)fluoranteno, difíciles de separar por CG. Además, permite la determinación de algunos compuestos que pueden degradarse si se exponen a altas temperaturas durante su separación, así como de HAPs con peso molecular superior a 300, cuya baja volatilidad limita su análisis por CG. Uno de los inconvenientes de la HPLC es que las longitudes de onda de excitación y emisión tienen que ser seleccionadas para cada HAP, por lo que resulta difícil obtener simultáneamente las máximas sensibilidades para un alto número de compuestos. Por otra parte, los resultados de varios autores (Crosby y col., 1981; Joe y col., 1982; Vaessen y col., 1984) han puesto de manifiesto que la HPLC proporciona insuficiente resolución para separar los numerosos isómeros presentes en las mezclas complejas de HAPs. En consecuencia, la CG parece más adecuada para analizar un número mayor de HAPs, así como para el estudio de derivados alquilados.

3.3.3. Métodos oficiales y estudios colaborativos.

Hay que señalar que, entre los métodos descritos para determinar HAPs en alimentos, y por extensión en queso, muy pocos han sido sometidos a estudios colaborativos entre laboratorios especializados de varios países, y aceptados a nivel internacional. De hecho, el único que figura entre los métodos oficiales de análisis de la AOAC es el de Howard y colaboradores (1966a), mencionado en el apartado 3.3.1 (Página 29), no habiéndose publicado ningún otro método considerado oficial para la determinación de HAPs en alimentos desde entonces. Únicamente la Organización Internacional para la Normalización (ISO, “International Organization for Standardization”) ha establecido una norma internacional para benzo(a)pireno, pero ésta sólo hace referencia a grasas y aceites (International Standardization (ISO): ISO 15302: 2007).

Por otra parte, a la falta de métodos aceptados a nivel nacional o internacional hay que añadir la escasa información publicada hasta la fecha acerca de estudios colaborativos. En este sentido, cabe señalar que, a partir del año 2004, la Unión Europea ha llevado a cabo algunos estudios de este tipo para la determinación de 15 ó 16 HAPs en aromas de humo líquidos (Simon y col., 2005, 2006, 2007, 2010), así como en aceites vegetales comestibles (Simon y col., 2008). Los resultados de todos estos estudios ponen de manifiesto una gran variabilidad dependiendo de los procedimientos y técnicas utilizados, lo que revela la necesidad de avanzar en el desarrollo y validación de métodos analíticos aceptados oficialmente y adecuados para análisis de rutina, que permitan determinar un amplio número de HAPs, así como comparar con fiabilidad resultados procedentes de diferentes laboratorios.

3.4. Estudios sobre la presencia de HAPs en queso ahumado y sin ahumar.

El origen de los HAPs presentes en queso ahumado se ha atribuido fundamentalmente al proceso de ahumado y, aunque en menor grado, también a la contaminación ambiental.

Dentro del proceso de ahumado, se diferencian dos etapas: una de generación del humo y otra de aplicación del humo al alimento. Los factores que intervienen en estas operaciones, tales como el tipo de generador utilizado, la temperatura del proceso o la naturaleza del material de partida empleado para la producción de humo (Tilgner y Miler, 1963; Howard y col., 1966a,b; Kakareka y col., 2005), así como las características del alimento a ahumar, determinarán el número y concentración de los HAPs depositados sobre la superficie del mismo.

Por otra parte, los HAPs presentes en el ambiente pueden contaminar la materia vegetal que sirve de alimento a los animales terrestres y, de este modo, acumularse en sus tejidos grasos y pasar, a su vez, a los alimentos derivados de los mismos; tal es el caso de la leche, materia prima de partida para la elaboración del queso (Grova y col., 2002). En este sentido, Husain y colaboradores (1997), que estudiaron el contenido de estos contaminantes en productos obtenidos a partir de animales criados en zonas contaminadas por HAPs, encontraron niveles significativos de estos compuestos en huevos y leche. En consecuencia, no resulta extraño que diversos estudios hayan puesto de manifiesto la presencia de HAPs, algunos incluso de alto peso molecular como benzo(a)pireno, en queso sin ahumar, aunque normalmente en concentraciones más bajas que en los ahumados (Howard y col., 1966a, b; McGill y col., 1982; Bosset y col., 1998; Pagliuca y col., 2003; Suchanová y col., 2008).

Hay que señalar que, a pesar de la gran variedad de quesos ahumados existentes en diferentes países, los estudios sobre la presencia de HAPs en este tipo de producto no son muy numerosos. Además, en la mayoría de ellos se determina un número muy bajo de estos contaminantes (entre 2 y 15) (Panalaks, 1976; McGill y col., 1982; Joe y col., 1984; Dafflon y col., 1995; Bosset y col., 1998; De Martin y col., 1998; Pagliuca y col., 2003; Naccari y col., 2008; Suchanová y col., 2008) o incluso sólo benzo(a)pireno (Lucisano y col., 1973; Lintas y col., 1979; Fritz y Soós, 1977; Riha y col., 1992; García Falcón y col., 1999; Michalski y Germuska, 2003; Anastasio y col., 2004).

Ya en 1966, **Howard y colaboradores (1966a)** detectaron pequeñas cantidades de *fluoranteno* y *pireno* tanto en queso ahumado de tipo Gouda (2,8 y 2,6 µg/kg, respectivamente), como en queso Cheddar sin ahumar, si bien en este último las concentraciones eran algo más bajas (0,8 y 0,7 µg/kg, respectivamente).

En 1982, los investigadores británicos **McGill y colaboradores** llevaron a cabo un estudio comparativo de las concentraciones de algunos HAPs en queso ahumado y sin ahumar. Los resultados obtenidos revelaron la presencia de varios HAPs en el queso ahumado, entre los que se encontraban benzo(a)pireno y otros carcinogénicos como benzo(a)antraceno, indeno(1,2,3-cd)pireno o benzofluorantenos, en concentraciones entre 0,01 y 16 µg/kg. Estos mismos contaminantes fueron detectados también en el queso no ahumado, aunque en concentraciones bastante más bajas.

En relación con la forma de llevar a cabo el ahumado, **Riha y colaboradores (1992)**, señalaron que la técnica de ahumado en frío con humo natural que se utiliza normalmente para el ahumado del queso, parece ser efectiva para reducir la deposición de benzo(a)pireno, ya que este HAP no fue detectado en ninguna de las muestras analizadas por ellos.

Bosset y colaboradores (1998), que estudiaron la presencia de 15 HAPs, tanto ligeros como pesados, en diversos tipos de quesos suizos y de otros países, observaron que fenantreno, presente en todas las muestras estudiadas, era en general el HAP más abundante en la mayor parte de ellas, con concentraciones muy variables (0,8-85,2 µg/kg) dependiendo de la procedencia del queso. También pireno fue detectado en la mayor parte de las muestras, en concentraciones más bajas que fenantreno (0,2-17,2 µg/kg). Naftaleno, fluoreno y fluoranteno fueron detectados en un número menor de muestras. En este mismo estudio se analizaron otros tipos de queso, tanto ahumados como sin ahumar, encontrando que benzo(a)antraceno estaba presente en todos ellos, y que las concentraciones en los quesos sin ahumar eran del mismo orden o incluso más altas que en los ahumados. Esto les

llevó a pensar que el origen de este HAP no estaba exclusivamente en el proceso de ahumado, sino que más bien parecía ser producto de la contaminación ambiental.

Pagliuca y colaboradores (2003) analizaron el contenido de HAPs de alto peso molecular (benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno y benzo(a)pireno) en un queso típico italiano denominado “Diavoletto”, ahumado de forma tradicional con diferentes materiales (virutas de madera de naturaleza diversa, paja, heno y cartón). Las concentraciones de estos contaminantes variaban en un rango de 0,12 a 6,21 µg/kg, correspondiendo el valor más bajo al queso ahumado con paja y heno, y el más alto al ahumado con virutas de madera de abeto. Cabe señalar que, aunque se encontraron diferencias entre los quesos ahumados con humo obtenido a partir de diferentes maderas, no se observó que las maderas blandas produjesen más contaminación que las duras, tal como habían señalado antes varios autores (Dikun, 1966; Kersken, 1974).

Anastasio y colaboradores (2004) también pusieron de manifiesto la influencia que tiene el proceso de ahumado y, en concreto, el tipo de material empleado como combustible para producir el humo, en la concentración de benzo(a)pireno en otro queso típico italiano ahumado con Denominación de Origen, el “Mozzarella di Bufala Campana”. Estos autores estudiaron quesos ahumados experimentalmente mediante métodos tradicionales con diferentes materiales (paja, cartón y virutas de madera), y otros ahumados con los mismos materiales, pero comerciales. Según los resultados obtenidos, los quesos ahumados con paja y con cartón contenían niveles más altos de benzo(a)pireno que los ahumados con virutas de madera. Sin embargo, en este caso, las diferencias entre los quesos fueron atribuidas no sólo al material de ahumado sino también al resto de factores que intervienen en el proceso.

Otros autores que también estudiaron la influencia del proceso de ahumado en el grado de contaminación por HAPs del queso fueron **Suchanová y colaboradores (2008)**, que analizaron la presencia de los 15 HAPs considerados prioritarios por la UE en 36 quesos de distinta procedencia ahumados de forma diferente. Los resultados obtenidos pusieron de

manifiesto la existencia de concentraciones de HAPs carcinogénicos, incluido benzo(a)pireno, más bajas en quesos ahumados bajo condiciones industriales (entre 0,1 y 2,7 µg/kg) que en quesos ahumados de forma tradicional (entre 3,9 y 6,2 µg/kg).

La forma de aplicar el humo al alimento también influye en su grado de contaminación por HAPs. En este sentido, debe señalarse que, en la actualidad, existe la posibilidad de separar totalmente la etapa de producción de humo y la de aplicación de éste al alimento, no sólo en el espacio, sino también en el tiempo, mediante el ahumado con aromas de humo; de este modo se pretende disminuir la carga de HAPs de los alimentos que se someten a este proceso. De hecho, algunos estudios ya han demostrado que esta forma de aplicar el humo al alimento produce una deposición menor de benzo(a)pireno en la superficie del queso que el ahumado tradicional (Riha y col., 1992; Aydinol y Ozcan, 2013). No obstante, hay que señalar que el contenido de HAPs en los quesos ahumados con aromas dependerá del grado de contaminación de los propios aromas, tal como ponen de manifiesto los resultados de Pagliuca y colaboradores (2003). Otros autores también han observado que los quesos ahumados con aromas de humo líquidos presentan un grado de contaminación menor que los ahumados de forma tradicional (Anastasio y col., 2004; Naccari y col., 2008; Suchanová y col., 2008). A pesar de ello, y como se ha comentado anteriormente, en España no está permitido el ahumado de queso con aromas de humo (Real Decreto 1113/2006, del 29 de Septiembre).

Por último cabe mencionar que los resultados de algunos de estos estudios (Lucisano y col., 1973; Anastasio y col., 2004; Guillén y Sopelana, 2004a; Suchanová y col., 2008) han puesto de manifiesto diferencias entre el grado de contaminación de las distintas partes del queso, siendo éste más alto en la corteza que en el interior.

Tal como se ha comentado anteriormente, una parte de los estudios sobre HAPs en queso únicamente hacen referencia a benzo(a)pireno. En estos estudios, llevados a cabo en países como España (García Falcón y col., 1999), Italia (Lintas y col., 1979; Anastasio y

col., 2004), Hungría (Fritz y col., 1977) o Canadá (Panalaks, 1976), se han encontrado concentraciones de este HAP que varían desde valores inferiores a 1 µg/kg (Panalaks, 1976; Fritz y col., 1977; Crosby y col., 1981; García Falcón y col., 1999) hasta otros tan altos como 7,8 µg/kg (Michalski y Germuska, 2003). Sin embargo, en otros casos, benzo(a)pireno no ha sido detectado en ninguna o en la mayor parte de las muestras estudiadas (Riha y col., 1992; Bosset y col., 1998).

De todo lo expuesto arriba, se puede concluir que no hay demasiada información sobre el grado de contaminación por HAPs del queso ahumado ya que gran parte de estos estudios hacen referencia exclusivamente a algunos quesos ahumados típicos de Italia, tales como Provola, Ricotta (De Martin y col., 1998; Naccari y col., 2008), Diavoleto (Pagliuca y col., 2003) o Mozzarella di Bufala Campana (Anastasio y col., 2004; Suchanová y col., 2008), existiendo poca información acerca de otros tipos de queso, entre los que se pueden incluir la mayor parte de los quesos españoles. Concretamente, en España, hasta donde nosotros sabemos, sólo hay un estudio exhaustivo sobre la presencia de HAPs en quesos ahumados comerciales de diferente origen (Guillén y Sopelana, 2004a), en el cual se determina un amplio rango de estos contaminantes así como derivados alquilados. Sin embargo, hay que señalar que existe un creciente interés en aumentar la seguridad del queso ahumado fabricado siguiendo métodos tradicionales. En esta línea, Conde y colaboradores (2005) han estudiado las concentraciones de varios HAPs y algunos de sus derivados metilados en humo procedente de la combustión de jara y brezo producido en dos tipos diferentes de ahumadero utilizados normalmente en las islas Canarias para ahumar queso.

Por tanto, teniendo en cuenta que: algunos quesos canarios se someten a un proceso de ahumado artesanal que, si no se realiza adecuadamente, podría dar lugar a la contaminación de los mismos con HAPs; que en la Comunidad Canaria, los productos lácteos, entre los que destaca el queso, son el grupo de alimentos que presenta mayor consumo (Serra-Majem

y col., 1999); y que hasta la fecha no hay estudios sobre la contaminación por HAPs de quesos ahumados canarios; en esta memoria se ha planteado el estudio del grado de contaminación por HAPs de algunos de estos tipos de queso.

OBJETIVOS

Los objetivos que se plantean en esta memoria son los siguientes:

1.- Estudio de los componentes volátiles de queso Palmero artesanal ahumado con dos tipos distintos de materia vegetal: *acículas de pino y penca de tunera seca*. Dentro de

este objetivo general, se pueden diferenciar una serie de objetivos parciales:

- 1.1. Caracterizar los componentes del espacio de cabeza de cada uno de estos quesos, muchos de ellos responsables de su aroma.
- 1.2. Estudiar las diferencias entre los quesos ahumados con los dos tipos de materia vegetal. En este punto se contempla la búsqueda de compuestos marcadores característicos de la materia vegetal utilizada para el ahumado. Esto podría contribuir a la detección de posibles fraudes sobre este tipo de queso, ya que no puede ser ahumado con materias vegetales que no estén incluidas en el Reglamento de la D.O.P. Queso Palmero.

2.- Estudio de los componentes volátiles de queso Herreño sin ahumar y queso Herreño ahumado en distintas posiciones dentro del ahumadero. Dentro de este objetivo

también se distinguen una serie de objetivos parciales:

- 2.1. Caracterizar los componentes del espacio de cabeza del queso Herreño ahumado y sin ahumar, muchos de ellos responsables de su aroma.
- 2.2. Estudiar las diferencias entre el perfil de compuestos volátiles de los quesos ahumados y el del queso sin ahumar.
- 2.3. Estudiar si la posición de los quesos en el ahumadero influye en su perfil de compuestos volátiles.

2.4. Comparar la fracción volátil del queso Herreño ahumado con el de otros quesos ahumados, elaborados exclusivamente con leche de cabra con el fin de tratar de identificar componentes que pudieran ser característicos de este tipo de queso.

3.- Determinación de la contaminación por HAPs de queso Palmero artesanal ahumado con dos tipos de materia vegetal: cáscara de almendra y penca de tunera seca. Con este objetivo se pretende:

3.1. Conocer el grado de contaminación por HAPs de estos quesos.

3.2. Estudiar la posible influencia de la materia vegetal empleada para el ahumado tanto en el tipo de compuestos generados como en sus concentraciones.

4.- Determinación de la contaminación por HAPs de queso Herreño sin ahumar y de queso Herreño ahumado en diferentes posiciones dentro del ahumadero. Dentro de este objetivo se contemplan los siguientes objetivos parciales:

4.1. Estudiar la presencia de HAPs en *queso Herreño ahumado y sin ahumar*. Ésto permitirá conocer hasta qué punto el proceso de ahumado del queso Herreño da lugar a la contaminación del mismo con HAPs.

4.2. Estudiar si la posición del queso en el ahumadero influye en sus niveles de HAPs.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Metodología empleada para la extracción y posterior estudio de los componentes volátiles.

1.1. Preparación de las muestras.

Las muestras objeto de estudio fueron queso Palmero y queso Herreño.

-**“Queso Palmero”** (Manuscritos 1 y 2). Se estudiaron 12 quesos Palmeros fabricados por 12 artesanos diferentes de la isla de La Palma durante la misma semana. Todos ellos fueron elaborados con leche cruda de cabra de la raza Palmera siguiendo métodos tradicionales, y ahumados utilizando *acículas de pino canario* (*Pinus canariensis*) y *penca de tunera seca* (*Opuntia ficus indica*) Para la caracterización de la fracción volátil se estudiaron 6 quesos ahumados con *acículas de pino* y 6 ahumados con *penca de tunera seca*.

En todos los casos los quesos fueron analizados por duplicado.

-**“Queso Herreño”** (Manuscrito 3). Se estudiaron un queso Herreño sin ahumar y 8 quesos Herreños ahumados con humo procedente de una mezcla de *tronco de higuera* (*Ficus carica*) y *penca de tunera seca* (*Opuntia ficus indica*). Todos ellos fueron elaborados, siguiendo los métodos tradicionales, con una mezcla de leche pasteurizada de cabra, oveja y vaca, todas ellas de raza canaria, en proporciones de 75%, 15% y 10% respectivamente.

Al igual que en el caso del queso Palmero, todos los quesos fueron analizados por duplicado.

Como se puede observar en la **Figura 1**, que muestra un esquema del ahumadero utilizado, los quesos ahumados fueron divididos en dos grupos según su posición en el mismo: A y B. Los quesos del grupo A se colocaron en la parte más alta del ahumadero y los del grupo B por debajo de los anteriores. Dentro de cada grupo, los quesos objeto de estudio fueron identificados con números del 1 al 4 según su proximidad a la entrada del humo, siendo el 1 el más próximo y el 4 el más alejado.

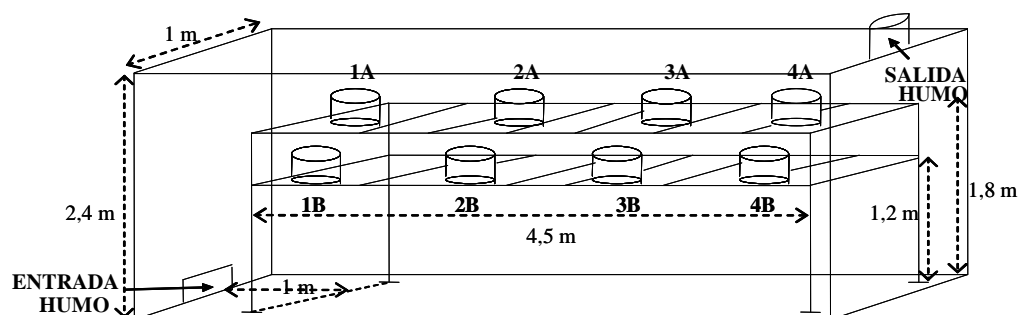


Figura 1. Esquema de las diferentes posiciones de los quesos Herreños dentro del ahumadero.

Teniendo en cuenta que el humo tiende a ascender, y con el fin de obtener un ahumado lo más homogéneo posible en todos los quesos, los del grupo B estuvieron 4 horas en el ahumadero, mientras que los del grupo A sólo 2.

Para la caracterización de la fracción volátil se estudiaron los 8 quesos ahumados en las distintas posiciones y el queso sin ahumar.

Para llevar a cabo este trabajo, tanto los quesos Palmeros como los quesos Herreños se dividieron en diferentes partes, tal como se puede observar en la **Figura 2**.

Para el estudio de los componentes volátiles en el caso del queso Palmero se estudiaron:

- la región exterior (aproximadamente 1 cm desde la corteza hacia el interior del queso),
- la región interior (aproximadamente 1 cm desde el centro del queso hacia el exterior), y
- una sección laminar, consistente en una lámina que comprendía todas las regiones del queso.

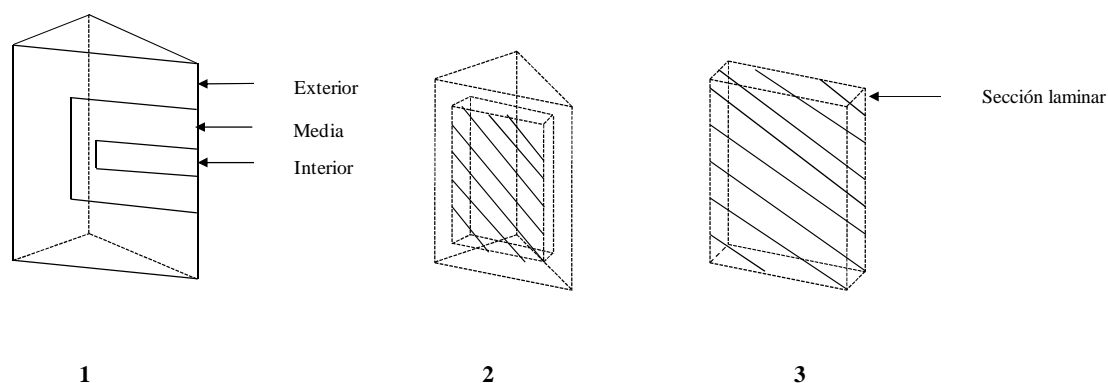


Figura 2. Regiones del queso objeto de estudio.

Cada una de estas partes se molió por separado con una picadora; esta operación de molienda permite también la homogeneización de la muestra. Tras la molienda, aproximadamente 1 g de cada muestra se introdujo en un vial de 4 ml, se cerró con un tapón de rosca que incluía un septum de politetrafluoroetileno (PTFE), y se almacenó en congelación hasta su estudio.

En el caso del queso Herreño únicamente se estudió la región exterior.

1.2. Generación del espacio de cabeza y extracción de sus componentes mediante microextracción en fase sólida (SPME).

La técnica de SPME se basa en el empleo de una fibra capilar de sílice fundida, recubierta por una fase estacionaria, que puede ser de composición variada, en la que los analitos quedan retenidos. Esta fibra es retráctil y se encuentra anclada dentro de una aguja protectora que forma parte de un dispositivo a modo de jeringa; éste se puede observar en la **Figura 3.**

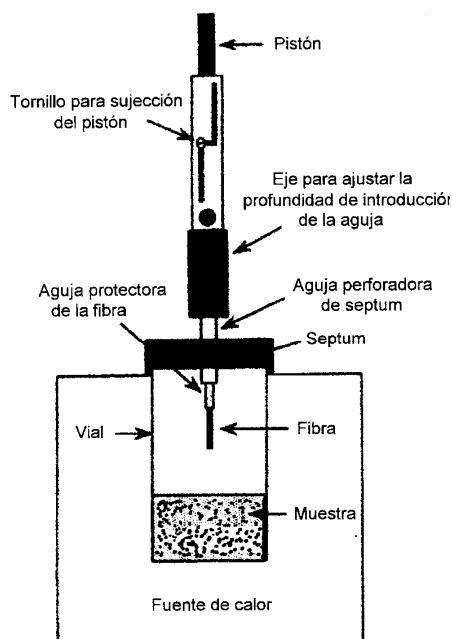


Figura 3. Esquema del dispositivo empleado para la técnica de SPME.

La extracción puede realizarse por inmersión de la fibra en la muestra si ésta es líquida (“SPME directa”) o bien por exposición de la fibra al espacio de cabeza (headspace, HS) de la muestra, cualquiera que sea su estado físico (“HS-SPME”). Dada la naturaleza de las muestras estudiadas, esta última técnica fue la empleada en este trabajo.

El principio fundamental de la SPME es el reparto de los analitos objeto de estudio, en primer lugar, entre la muestra y su espacio de cabeza y, en segundo lugar, entre el espacio de cabeza y el recubrimiento de la fibra. En consecuencia, la eficiencia de la extracción de componentes por HS-SPME dependerá de su coeficiente de reparto entre la matriz de la muestra y la fase gaseosa (espacio de cabeza) y, en un segundo equilibrio, del coeficiente de reparto entre la fase gaseosa y la fase que recubre la fibra. En la volatilización de los compuestos objeto de estudio influyen propiedades como el peso molecular o la presión de vapor, pero también las interacciones existentes entre tales compuestos y la matriz de la muestra, que determinan la capacidad de aquéllos para escapar hacia la fase vapor. En el

segundo coeficiente de reparto, entre el espacio de cabeza y la fase que recubre la fibra, además de las propiedades del analito, influyen la naturaleza de la fibra empleada y el espesor de la fase estacionaria, así como la temperatura y duración del proceso de extracción. Durante este proceso debe procurarse que la temperatura de trabajo posibilite que el mayor número de componentes de la muestra pasen a la fase vapor, pero evitando que se produzcan modificaciones en la muestra y, en consecuencia, en sus componentes volátiles.

El tipo de fibra empleado, así como la temperatura y el tiempo de extracción fueron elegidos en base a los resultados de una serie de ensayos previos realizados en nuestro laboratorio con fibras recubiertas por diferentes fases estacionarias, y en distintas condiciones de tiempo y temperatura. Estos experimentos (Guillén y Abascal, 2002) pusieron de manifiesto que la fibra de poliacrilato de 85 μm de espesor retenía componentes con un rango más amplio de volatilidad que las de polidimetilsiloxano y carboxen, que eran las únicas existentes en el mercado en aquel momento. Con el tiempo fueron apareciendo fibras con otro tipo de fases estacionarias, y en estudios posteriores (Guillén y col., 2005) se observó que la fibra de divinilbenceno/carboxen/polidimetilsiloxano (50/30 μm de espesor) (DVB/CAR/PDMS) retenía componentes con un rango más amplio de volatilidad que las anteriores. Otros autores también han comprobado que esta última fibra retiene componentes con un rango más amplio de volatilidad que la de poliacrilato (Pinho y col., 2003). Esta evolución en las fases estacionarias empleadas en SPME justifica que para analizar las muestras de queso Palmero se utilizase la fibra de poliacrilato de 85 μm , mientras que para las de queso Herreño, estudiadas con posterioridad, la fibra seleccionada fuese una de DVB/CAR/PDMS.

En los estudios anteriormente mencionados (Guillén y Abascal, 2002), también se optimizaron la temperatura y el tiempo de extracción de los analitos llegando a la conclusión de que los mejores resultados se obtenían con 50°C y 60 minutos.

En consecuencia, para la generación del espacio de cabeza de las muestras objeto de estudio y la extracción de sus componentes mediante SPME, el vial con 1 g de queso molido se introdujo en un baño termostático a 50°C durante 60 minutos.

Cabe señalar que, antes de su uso, la fibra debe ser acondicionada con el fin de eliminar impurezas y evitar la aparición de picos extraños en los análisis, procedentes de pegamento u otros compuestos utilizados en su manufactura. Para ello, la fibra se calienta en el inyector de un cromatógrafo de gases a una temperatura de 300°C durante 2 horas, tiempo recomendado por el fabricante para la fibra de poliacrilato, y a 300°C durante 4 horas en el caso de la fibra de DVB/CAR/PDMS.

1.3. Desorción, separación, identificación y semicuantificación de los componentes extraídos.

En este trabajo, la desorción, separación, identificación y semicuantificación de los compuestos adsorbidos en la fibra se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases modelo HP 6890 Series II, equipado con un detector selectivo de masas 5973, operando en el modo de impacto electrónico con un voltaje de 70eV. La columna utilizada fue una columna capilar de sílice fundida de 60 m de largo x 0,25 mm de diámetro interno x 0,25 µm de espesor, recubierta por una fase estacionaria no polar (HP-5-MS, 5% fenilmetilsiloxano).

Para llevar a cabo la desorción de los compuestos retenidos, la fibra se introduce en el inyector del cromatógrafo, que se encuentra a una temperatura de 250°C (temperatura de desorción). La alta temperatura reduce los coeficientes de partición de los analitos, de modo que la afinidad de los mismos por la fibra disminuye y, en consecuencia, son arrastrados

hacia el interior de la columna cromatográfica por el empuje del gas portador. Durante el proceso de desorción, que dura 5 minutos, se mantiene cerrada la válvula de división de flujo (modo “splitless”) y una vez que éste ha finalizado, la válvula se abre, pero la fibra se mantiene en el inyector durante 5 minutos más, con el fin de favorecer la desorción de compuestos que podrían interferir en análisis posteriores. Además, entre muestra y muestra la fibra se somete a una segunda desorción en el inyector sin haber realizado con ella extracción alguna; esta operación se realiza para evitar el arrastre de compuestos de un análisis a otro.

La temperatura inicial del horno, que es de 45°C, se mantuvo constante durante el tiempo de desorción (5 minutos); transcurrido éste la temperatura se aumentó a 4°C/min hasta llegar a 250°C, que se mantuvieron durante 20 min. Como gas portador se utilizó helio con una pureza del 99,999%, a una presión de 16,5 psi. El flujo a través de la columna, que se mantuvo constante durante todo el análisis, fue de 1,0 ml/min. Las temperaturas de la fuente de iones y del cuadrupolo fueron fijadas a 230 y 150°C, respectivamente, y la de la línea de transferencia a 280°C.

Tanto la identificación como la semicuantificación de los compuestos extraídos se realizó en modo scan. La identificación de los compuestos se hizo, como en estudios previos (Guillén y col., 1995, 1996), en base a sus tiempos de retención, a sus espectros de masas y por comparación con los espectros de librerías comerciales (Wiley 138L, Mass Spectral Database, Wiley 1990 y Wiley 275L, Mass Spectral Database, Rev. D.01.00, June 2000) y de compuestos de referencia, así como con el apoyo de datos bibliográficos. Para este fin se determinaron los tiempos de retención y los espectros de masas de un gran número de compuestos patrón. La semicuantificación de los compuestos detectados se realizó midiendo las cuentas de área del ión más abundante del espectro de masas de cada compuesto (pico base).

Los compuestos de referencia utilizados para la identificación de los componentes del espacio de cabeza de los quesos fueron los siguientes:

-Ácidos: acético, butanoico, pentanoico, hexanoico, heptanoico, 2-etilhexanoico, octanoico, 4-metiloctanoico, nonanoico, decanoico, dodecanoico, tetradecanoico, hexadecanoico y benzoico.

-Alcoholes: etanol, 2,3-butanodiol, hexanol y bencenometanol.

-Ésteres: butanoato de etilo, hexanoato de metilo, hexanoato de etilo, benzoato de metilo, nonanoato de metilo, decanoato de etilo, dodecanoato de metilo, dodecanoato de etilo, tetradecanoato de metilo, tetradecanoato de etilo y metil-4-hidroxi-3-metoxibenzoato (vanillato de metilo).

-Aldehídos: hexanal, octanal, nonanal, benzaldehído y bencenoacetaldehído.

-Cetonas: 2-propanona, 2-butanona, 2-pentanona, 2-heptanona, 2-nonanona, 2-decanona, 2-undecanona, 2-dodecanona, 2-tridecanona, 3-hidroxi-2-butanona (acetoina), 1-(acetiloxi)-2-propanona, ciclopentanona, ciclohexanona, 2-metil-2-ciclopenten-1-ona, 3-metil-2-ciclopenten-1-ona, 3-metilciclohexanona, 2,5-hexanodiona, 3-metil-1,2-ciclopentanodiona (cicloteno), 3-etil-1,2-ciclopentanodiona (3-etilciclopentenolona), 1-fenil-etanona (acetofenona), 1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-etanona (acetovanillona), 1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-propanona (propiovanillona) y 1-(2,6-hidroxi-4-metoxifenil)-etanona (acetosiringona).

-Hidrocarburos: nonano, undecano, dodecano, tridecano, tetradecano, pentadecano, hexadecano, heptadecano, octadecano, neofitadieno, eicoseno, escualeno, tolueno, estireno, naftaleno, 2-metilnaftaleno, 1-metilnaftaleno, dimetilnaftalenos, acenaftileno y fenantreno.

-Derivados de furano y pirano: 2-furancarboxaldehído, 2-furanmetanol, 1-(2-furanil)-etanona (2-acetilfurano), 5-metil-2-furancarboxaldehído, y 5-hidroximetil-2-furancarboxaldehído.

-Lactonas: 2(5H)-furanona (γ -crotonolactona), 5-metil-2(5H)-furanona, 3-metil-2(5H)-furanona, 3-hidroxi-2-metil-4H-piran-4-ona, γ -heptalactona, γ -decalactona, γ -dodecalactona, δ -dodecalactona y γ -pentadecalactona.

-Éteres: 1,2-dimetoxibenceno, 1,4-dimetoxibenceno, 1,3-dimetoxibenceno, dimetoxitolueno y trimetoxibenceno.

-Terpenos y sesquiterpenos: α -pineno, canfeno, β -terpineno, β -pineno, α -felandreno, α -terpineno, *trans*-cariofileno, limoneno y β -canfor.

-Derivados nitrogenados: piridina, 2,6-dimetilpiridina, 2,4-dimetilpiridina, 3-metoxipiridina y 5-etil-2-metilpiridina.

-Derivados de fenol: fenol, 2-metilfenol, 4-metilfenol, 3-metilfenol, 2,6-dimetilfenol, 2-etilfenol, 2-propilfenol, 2,4-dimetilfenol, 2,5-dimetilfenol, 4-etilfenol, 3-etilfenol, 2,3-dimetilfenol, 2,4,6-trimetilfenol, 2,3,5-trimetilfenol, 3,4,5-trimetilfenol, 2,4-bis(1,1-dimetiletil)-fenol, 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metil-fenol (BHT), 2-metoxifenol (guayacol), 3-metoxi-1,2-bencenodiol (3-metoxipirocatecol), 4-metil-2-metoxifenol (4-metilguayacol), 4-etil-2-metoxifenol (4-etilguayacol), 4-vinil-2-metoxifenol (4-vinilguayacol), 4-(2-propenil)-2-metoxifenol (eugenol), 4-propil-2-metoxifenol (4-propilguaiacol), 4-hidroxi-3-metoxi-benzaldehído (vanillina), 4-(1-propenil)-2-metoxifenol (isoeugenol), 2,6-dimetoxifenol (siringol), 4-metil-2,6-dimetoxifenol (4-metilsiringol) y 4-(2-propenil)-2,6-dimetoxifenol.

2. Metodología empleada para la determinación de HAPs.

2.1. Preparación de las muestras.

Las muestras objeto de estudio para la determinación de HAPs fueron los quesos Palmero y Herreño elaborados como se detalla en el apartado 1.1 (página 49) de la caracterización de la fracción volátil.

-“**Queso Palmero**” (Manuscrito 4). Se estudiaron los 4 quesos ahumados con *penca de tunera seca* (*Opuntia ficus indica*), de los cuáles se había caracterizado en primer lugar su fracción volátil y otros 4 quesos ahumados con *cáscara de almendra* (*Prunus dulcis*), con las mismas características de elaboración que los anteriores.

En todos los casos los quesos fueron analizados por duplicado.

-“**Queso Herreño**” (Manuscrito 5). Se estudiaron el queso Herreño sin ahumar y algunos de los quesos Herreños ahumados señalados en el esquema de la Figura 1: los de los extremos (1A, 1B, 4A y 4B), y uno de los situados en posición más central en cada uno de los grupos (2A y 3B). Al igual que en el caso del queso Palmero, todos los quesos fueron analizados por duplicado.

La determinación de HAPs se realizó solamente en la parte exterior de los quesos (**Figura 2**) (apartado 1.1, página 51), ya que estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio pusieron de manifiesto que ésta es la parte más contaminada (Guillén y Sopelana, 2004a).

2.2. Compuestos y soluciones de referencia.

Los disolventes empleados fueron ciclohexano y metanol, ambos de pureza HPLC (99,9%). Otros reactivos y materiales utilizados fueron hidróxido potásico, cloruro sódico, sulfato sódico anhidro, tungstato sódico dihidratado y tubos de extracción en fase sólida (SPE) de 3 ml (500 mg) Supelclean LC-Si SPE.

Los HAPs de referencia utilizados fueron los siguientes:

-una solución comercial de HAPs disueltos en una mezcla de diclorometano: benceno (75:25), que contenía naftaleno, acenafteno, acenaftileno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(c)fenantreno, benzo(a)antraceno, criseno, 7,12-dimetilbenzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(j)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-cd)pireno, dibenzo(a,h)antraceno,

benzo(g,h,i)perileno, dibenzo(a,l)pireno, dibenzo(a,i)pireno y dibenzo(a,h)pireno, en concentraciones de aproximadamente 500 µg/ml;

-*soluciones comerciales individuales* de 1,7-dimetilnaftaleno, 1,4-dimetilnaftaleno, 1,5-dimetilnaftaleno, 1-metilfenantreno, 2,3-dimetilantraceno, 9,10-dimetilfenantreno, 2-metilfluoranteno, 1-metilfluoranteno, 11H-benzo(c)fluoreno, 1-metilpireno, 3-metilcriseno, 2-metilcriseno, 5-metilcriseno, 4-metilcriseno, 6-metilcriseno, 1-metilcriseno, dibenzo(a,j)antraceno, benzo(b)criseno, piceno, antantreno, coroneno y dibenzo(a,e)pireno, en concentraciones de 10 µg/ml aproximadamente, y

-*una mezcla de HAPs puros disueltos en diclorometano*, que contenía 2,6-dimetilnaftaleno, 2,3-dimetilnaftaleno, *o*-terfenilo, 2-metilantraceno, 9-metilantraceno, 3,6-dimetilfenantreno, *m*-terfenilo, *p*-terfenilo, 11H-benzo(a)fluoreno, 11H-benzo(b)fluoreno, benzo(e)pireno y perileno, en concentraciones que variaban entre 100 y 247,5 µg/ml.

Como patrón interno se utilizó una mezcla en ciclohexano de los siguientes compuestos deuterados: naftaleno-d₈, acenafteno-d₁₀, fenantreno-d₁₀, pireno-d₁₀, *p*-terfenilo-d₁₄, criseno-d₁₂, perileno-d₁₂ y benzo(g,h,i)perileno-d₁₂. La pureza de estos patrones variaba desde el 97 al 99,5%.

Con todas estas mezclas y soluciones individuales, incluida la de HAPs deuterados, se preparó otra de referencia que se utilizó para cuantificar los HAPs presentes en las muestras.

2.3. Metodología seguida para la extracción, purificación y cuantificación de HAPs.

La metodología empleada para la determinación de los HAPs fue la ya descrita por Guillén y colaboradores en el año 2004 y aparece esquematizada en la **Figura 4**.

2.3.1. Extracción de la grasa.

Tras añadir el patrón interno con los HAPs deuterados a una muestra de 20-25 g de queso previamente molido, se extrajo la grasa con 80 ml de ciclohexano durante 25 min en

un baño de ultrasonidos, procurando que la temperatura no aumentara demasiado. A continuación, el líquido se filtró a través de papel y la muestra se volvió a extraer otras dos veces con 50 ml de ciclohexano durante 20 minutos, filtrando nuevamente el líquido después de cada extracción. El extracto total se concentró a un volumen más pequeño en un rotavapor a 35-40°C, y a continuación se sometió a tratamiento alcalino.

2.3.2. Tratamiento alcalino del extracto de grasa.

Éste se llevó a cabo añadiendo al extracto concentrado 11,2 g de KOH disueltos en 100 ml de una mezcla de metanol y agua destilada (9:1, v/v), tal como describieron Lawrence y Weber (1984) y Simko y colaboradores (1993), y toda la mezcla se calentó bajo reflujo durante 4 horas. También se añadieron bolitas de vidrio para evitar saltos de la mezcla durante el proceso.

2.3.3. Extracción de HAPs y clarificación del extracto obtenido.

Tras el tratamiento alcalino, la muestra se diluyó con 100 ml de una mezcla de metanol/agua (8:2, v/v) y se procedió a la extracción de HAPs por partición líquido-líquido, tres veces durante 3 min, con 80, 50 y 50 ml de ciclohexano, respectivamente. A continuación, el extracto total se lavó con 100 ml de una mezcla de metanol/agua (8:2, v/v), 100 ml de agua + 5 g de cloruro sódico, y 100 ml de agua destilada consecutivamente. Tras los lavados, se añadieron al extracto 100 ml de una solución acuosa de tungstato de sodio dihidratado al 10% (11g/100 ml) y se dejó en reposo durante varias horas para favorecer la precipitación de lipoproteínas. Después, el extracto se filtró, se concentró en rotavapor hasta un volumen menor y se desecó sobre sulfato sódico anhidro en una columna de vidrio. Por último, el extracto ya desecado se concentró primero en rotavapor y después bajo una corriente de nitrógeno hasta un volumen de 1 ml.

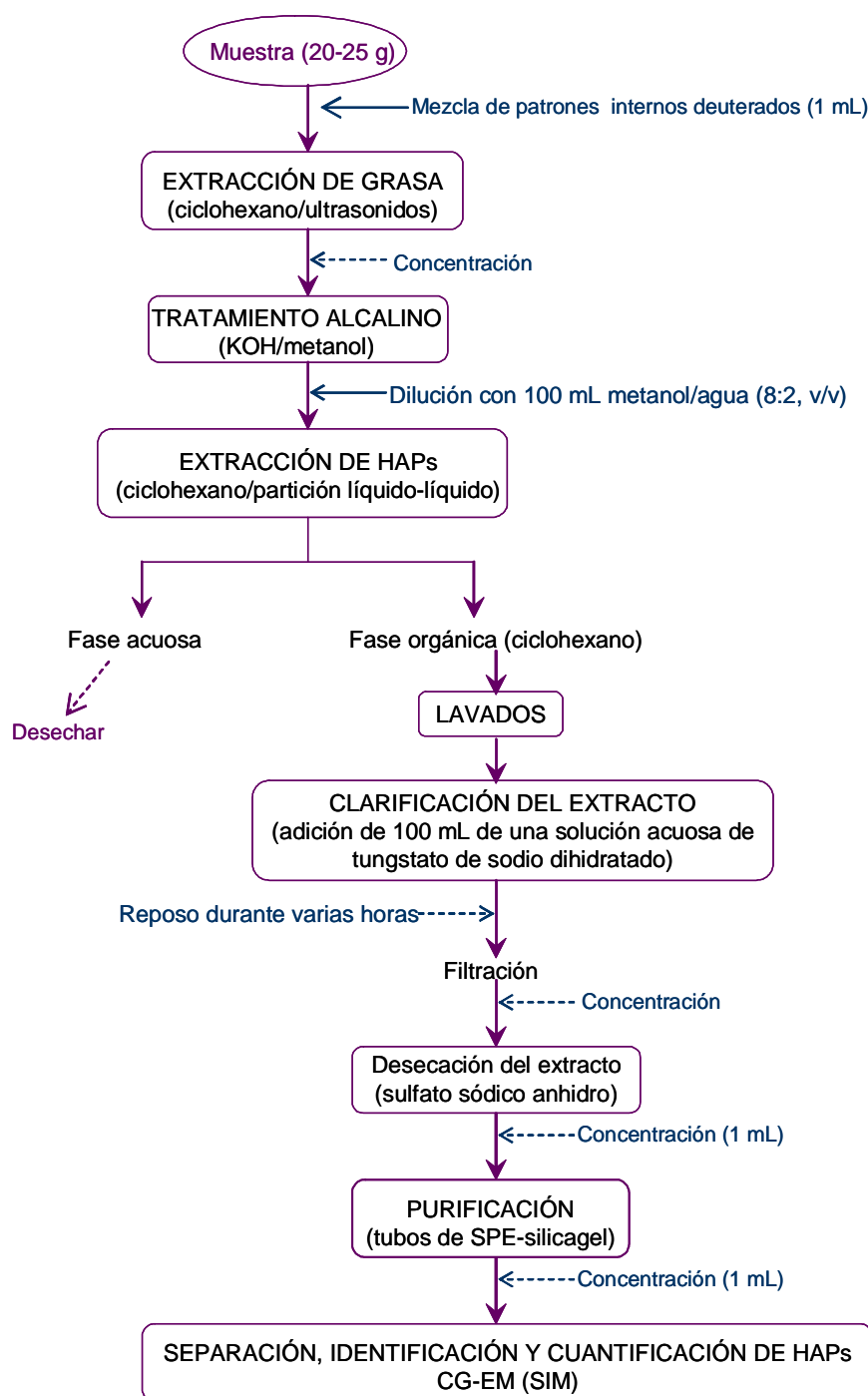


Figura 4. Esquema del procedimiento empleado para la determinación de HAPs en queso.

2.3.4. Purificación del extracto y aislamiento de los HAPs presentes.

La purificación del extracto se llevó a cabo por medio de tubos de extracción en fase sólida rellenos de silicagel. El primer paso para la utilización de estos tubos es un acondicionamiento, que se llevó a cabo haciendo pasar 8 ml del mismo disolvente en el que se encontraba disuelta la muestra.

El extracto, concentrado a 1 ml, se pasó a través del tubo de silicagel ya acondicionado y los HAPs fueron eluidos con 9 ml de ciclohexano a una velocidad de aproximadamente 1 ml/min; este eluato se concentró nuevamente a 1 ml y se analizó por CG/EM en modo SIM (registro selectivo de iones). A continuación, el eluato concentrado se hizo pasar a través de un segundo tubo de silicagel, eluyendo los HAPs retenidos con 1 ml de ciclohexano primero (fracción 1) y 9 ml de ciclohexano después (fracción 2). La fracción 1 se desechó, mientras que la fracción 2 se concentró a 1 ml y se analizó por CG/EM (SIM) para identificar y cuantificar los HAPs que no pudieron ser identificados correctamente en el eluato del primer tubo debido a la presencia de interferencias.

2.3.5. Separación, identificación y cuantificación de HAPs por CG/EM (SIM).

Para el análisis por CG/EM se empleó el mismo equipo descrito para el estudio de la fracción volátil (ver apartado 1.3, página 54).

El programa de temperatura se inició a 50°C (0,5 min), incrementándose a 8°C/min hasta llegar a 130°C y, a partir de ahí, a 5°C/min hasta 290°C. La temperatura final se mantuvo durante 70 min. Las temperaturas del inyector y de la línea de transferencia fueron 280 y 300°C respectivamente, y las de la fuente de iones y del cuadrupolo 230 y 150°C, respectivamente.

El volumen de muestra inyectado fue de 1 µL, y la inyección se llevó a cabo sin división de flujo y con un pulso de presión de 30 psi (“*pulsed splitless*”), con el fin de reducir los efectos de discriminación entre HAPs con diferente volatilidad. Como gas portador se

utilizó helio con una pureza del 99,999%. El flujo a través de la columna, que se mantuvo constante durante todo el análisis, fue de 1,0 ml/min.

La identificación y cuantificación de los HAPs presentes se llevó a cabo en modo SIM. El registro selectivo de iones supone, en primer lugar, la elección de los iones principales de los espectros de los analitos que se pretende determinar y, en segundo lugar, el registro de las relaciones masa/carga (m/z) correspondientes a los iones seleccionados dentro de los intervalos de tiempo en los que éstos eluyen. Por consiguiente, es necesario conocer el tiempo de retención de los compuestos de interés, así como sus espectros de masas, lo que requiere el empleo de compuestos de referencia.

Cuando se trabaja en modo SIM, la identificación se realiza en base al tiempo de retención del pico base del espectro de masas de cada compuesto y a las abundancias relativas de otros 2 ó 3 iones mayoritarios. En el caso de los HAPs, el pico base es, en general, el ión molecular. Según varios autores (Nyman y col., 1993; Mottier y col., 2000; Chen y col., 2001), la confirmación de identidad requiere que el valor de la relación entre los iones elegidos se mantenga dentro de un margen de variación del 20% respecto a la relación observada en los compuestos de referencia.

La cuantificación en modo SIM se realizó con la medida del área del pico base del espectro de cada compuesto, y por medio de los patrones internos mencionados en el apartado 2.2 (página 59). Así, naftaleno- d_8 se utilizó para la cuantificación de naftaleno y sus metilderivados, fenantreno- d_{10} para la de fenantreno, antraceno y sus metilderivados, pireno- d_{10} para fluoranteno y pireno, p -terfenilo- d_{14} para m -terfenilo, p -terfenilo, benzofluorenos y metil-fluorantenos/-pirenos, criseno- d_{12} para la de benzo(a)antraceno, criseno y sus metilderivados, perileno- d_{12} para benzofluorantenos, benzopirenos y, por último, benzo(g,h,i)perileno- d_{12} para HAPs con pesos moleculares más altos.

Para llevar a cabo esta cuantificación se utilizó la mezcla de referencia mencionada en el apartado 2.2 (páginas 58 y 59).

En la **Tabla 3**, se presenta una relación de los HAPs objeto de estudio, los iones utilizados para la identificación y cuantificación de los mismos y sus abundancias relativas. Cabe señalar que el estudio incluye no sólo HAPs cabezas de serie, sino también derivados alquilados, acerca de los cuales apenas existe información en queso ni en alimentos en general.

Tabla 3. HAPs de referencia empleados para el desarrollo de este trabajo, principales iones de su espectro de masas y abundancias relativas correspondientes a cada uno de ellos. El ion molecular aparece señalado en negrita.

HAP	Iones mayoritarios			Abundancias relativas		
1. Naftaleno	128	126	102	100	6,6	6,4
2. 2-Metilnaftaleno	142	141	115	100	83,7	24,4
3. 1-Metilnaftaleno	142	141	115	100	86,2	26,6
4. 2,6-Dimetilnaftaleno	156	141	155	100	65,3	34,1
5. 1,7-Dimetilnaftaleno	156	141	155	100	67,2	31,2
6. 1,4-Dimetilnaftaleno	141	156	155	100	95,5	23,1
7. 1,5-Dimetilnaftaleno	156	141	155	100	78,5	31,7
8. Acenaftileno	152	151	153	100	12,8	18,7
9. Acenafteno	153	154	152	100	94,9	48,7
10. Fluoreno	166	165	163	100	91,3	14,4
11. Fenantreno	178	176	179	100	17,7	14,5
12. Antraceno	178	176	179	100	17,31	15,1
13. <i>o</i> -Terfenilo	230	229	215	100	62,4	36,5
14. 2-Metilantraceno	192	191	189	100	46,0	23,8
15. 1-Metilfenantreno	192	191	189	100	55,2	27,2
16. 9-Metilantraceno	192	191	189	100	62,9	29,0
17. 3,6-Dimetilfenantreno	206	191	189 205	100	33,5	28,9 23,2
18. Fluoranteno	202	200	203	100	19,5	17,6
19. 2,3-Dimetilantraceno	206	191	205 189	100	28,7	17,2 16,5
20. 9,10-Dimetilfenantreno	206	191	189	100	98,1	24,4

Tabla 3. Continuación.

HAP	Iones mayoritarios			Abundancias relativas		
21. Pireno	202	200	203	100	20,0	18,3
22. 9,10-Dimetilantraceno	206	191	205	100	51,5	25,1
23. <i>m</i> -Terfenilo	230	231	228	100	20,4	15,2
24. <i>p</i> -Terfenilo	230	231	228	100	19,4	12,4
25. 2-Metilfluoranteno	216	215	213	100	79,4	20,0
26. 1-Metilfluoranteno	216	215	213	100	87,8	22,3
27. 11H-Benzo(a)fluoreno	216	215	213	100	73,9	18,5
28. 11H-Benzo(b)fluoreno	216	215	213	100	91,2	19,7
29. 11H-Benzo(c)fluoreno	216	215	213	100	72,2	20,0
30. 1-Metilpireno	216	215	213	100	68,7	16,4
31. Benzo(c)fenantreno	228	226	227	100	50,6	50,9
32. Benzo(a)antraceno	228	226	229	100	26,0	19,0
33. Criseno	228	226	229	100	27,4	18,8
34. Trifenileno ^a	228	226	229	100	30,0	19,5
35. Naftaceno	228	226	229	100	21,4	19,0
36. 3-Metilcriseno	242	241	239	100	26,0	27,2
37. 6-Metil-B(a)A ^b	242	241	239	100	27,4	25,2
38. 2-Metilcriseno	242	241	239	100	24,8	25,2
39. 5-Metilcriseno	242	241	239	100	47,5	36,4
40. 4-Metilcriseno ^c	242	241	239	100	53,7	39,5
41. 6-Metilcriseno	242	241	239	100	34,1	31,8
42. 1-Metilcriseno	242	241	239	100	25,9	26,0
43. 7-Metil-B(a)A	242	241	239	100	39,8	26,6
44. Benzo(b)fluoranteno	252	250	126	100	21,6	15,4
45. Benzo(k)fluoranteno	252	250	126	100	20,4	12,1
46. 7,12-Dimetil-B(a)A	256	241	239	100	52,2	41,1
47. Benzo(e)pireno	252	250	126	100	28,0	16,0
48. Benzo(a)pireno	252	250	126	100	22,7	16,8
49. Perileno	252	250	126	100	26,6	17,4
50. Dibenzo(a,j)antraceno	278	276	279	100	22,1	23,3
51. Indeno(1,2,3-cd)pireno	276	277	274	100	23,6	19,8
52. Dibenzo(a,c)antraceno ^c	278	276	279	100	24,2	22,4
53. Dibenzo(a,h)antraceno	278	276	279	100	20,5	22,4
54. Benzo(b)criseno	278	276	279	100	24,4	23,6

Tabla 3. Continuación.

HAP	Iones mayoritarios			Abundancias relativas		
55. Piceno	278	276	279	100	25,3	22,6
56. Benzo(ghi)perileno	276	277	274	100	23,4	20,3
57. Antantreno	276	277	274	100	22,6	19,0
58. Dibenzo(a,l)pireno	302	300	303	100	44,2	25,5
59. Coroneno	300	150	301	100	31,8	25,1
60. Dibenzo(a,e)pireno	302	303	300	100	24,9	24,2
61. Dibenzo(a,i)pireno	302	303	300	100	24,3	17,1
62. Dibenzo(a,h)pireno	302	303	300	100	24,9	17,4

^a Este HAP no se separa del isómero anterior; ^b **B(a)A**: benzo(a)antraceno; ^c Este HAP no se separa del isómero que viene a continuación.

3. Análisis estadístico.

El tratamiento estadístico de los datos se llevó a cabo mediante el paquete estadístico SPSS. Las diferencias en los perfiles de volátiles fueron analizadas utilizando un análisis de la varianza (ANOVA) mientras que los valores medios de las abundancias de los compuestos volátiles en los quesos Herreños ahumados y sin ahumar fueron comparados aplicando el test HSD Tukey.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos han dado lugar a 5 artículos publicados en revistas SCI o JCR.

Objetivo 1: Estudio de los componentes volátiles de queso Palmero artesanal ahumado con distintos tipos de materia vegetal (*acículas de pino* y *penca de tunera seca*).

Manuscrito 1. Components detected by means of solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry in the headspace of artisan fresh goat cheese smoked by traditional methods. *Journal of Dairy Science*, 2004, 87, 284-299.

Manuscrito 2. Components detected by headspace-solid-phase microextraction in the artisanal fresh goat's cheese smoked using dry prickly pear (*Opuntia ficus indica*). *Lait*, 2004, 84, 385-397.

Objetivo 2: Estudio de los componentes volátiles de queso Herreño sin ahumar y queso Herreño ahumado en distintas posiciones dentro del ahumadero.

Manuscrito 3. Complexity and uniqueness of the aromatic profile of smoked and unsmoked Herreño cheese. *Molecules*, 2014, 19, 7937-7958.

Objetivo 3: Determinación de la contaminación por HAPs de queso Palmero artesanal ahumado con dos de los tipos de materia vegetal permitidos (*cáscara de almendra* y *penca de tunera seca*).

Manuscrito 4. Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in artisanal palmero cheese smoked with two types of vegetable matter. *Journal of Dairy Science*, 2007, 90, 2717-2725.

Objetivo 4: Determinación de la contaminación por HAPs de queso Herreño sin ahumar y de queso Herreño ahumado en diferentes posiciones dentro del ahumadero.

Manuscrito 5. Contamination of cheese by PAHs in traditional smoking. Influence of the position in the smokehouse on the contamination level of smoked cheese. *Journal of Dairy Science*, 2011, 94, 1679-1690.

Manuscrito 1

COMPONENTS DETECTED BY MEANS OF SOLID PHASE MICROEXTRACTION AND GAS CHROMATOGRAPHY/MASS SPECTROMETRY IN THE HEADSPACE OF ARTISAN FRESH GOAT CHEESE SMOKED BY TRADITIONAL METHODS

María D. Guillén*, María L. Ibargoitia*, Patricia Sopelana*, Gemma Palencia* and
María Fresno†

*Tecnología de Alimentos, Facultad de Farmacia, Universidad del País Vasco, Paseo de la Universidad 7, 01006, Vitoria,
Spain.

†Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, La Laguna, Santa Cruz de Tenerife, Spain.

Journal of Dairy Science, **2004**, *87*, 284-299.

ABSTRACT

The study of the headspace components of fresh smoked goat cheese, was carried out by means of Solid Phase Microextraction using a Polyacrylate fiber followed by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. The samples studied were six artisan Palmero cheeses manufactured following traditional methods and smoked using pine leaves. The cheese regions studied were exterior, interior and a cross-section. In total more than 320 components were detected, the exterior region being the richest in components, among which were acids, alcohols, esters, hydrocarbons, aldehydes, ketones, furan and pyran derivatives, terpenes and sesquiterpenes, nitrogen derivatives, phenol, guaiacol and syringol derivatives, ethers, and others. In addition to typical cheese components, typical smoke components were also detected; these latter were present especially in the headspace of the exterior region and only those in significant concentrations in the exterior region were also detected in the interior. The main components were acids and phenolic derivatives. These latter compounds play an important role in the flavour of this cheese and their relative proportions together with the presence of specific smoke components derived from pine leaves may be considered of interest in order to distinguish this cheese from those smoked with other vegetable matter.

Keywords: *pine leaves; smoked fresh goat cheese; headspace components; solid phase microextraction; gas chromatography-mass spectrometry.*

Abbreviation key: **GC/MS**=gas chromatography/mass spectrometry, **SPME**=solid-phase microextraction.

1. INTRODUCTION

The volatile compounds of cheese, known to be important in cheese flavor, have been reported for many different type of cheese (Liebich et al., 1970a,b; Sloom and Harkes, 1975; Parliament et al., 1982; Martelli, 1989; Martinez-Castro et al., 1991; Barbieri et al., 1994; Sabio and Vidal-Aragón, 1996; Muir et al., 1997; Kubíčková and Grosch, 1997; Moio and Addeo, 1998; Moio et al., 2000; Rychlik and Bosset, 2001). Recently, Solid Phase Microextraction (SPME) followed by Gas Chromatography/ Mass Spectrometry (GC/MS) has been shown useful for determination of volatile compounds in cheese (Chin et al., 1996; Jaillais et al., 1999; Dufour et al., 2001; Watkins et al., 2002; Lee et al., 2003).

In this paper, the study of the headspace of artisan Palmero cheese smoked with smoke coming from pine needles was investigated. The Palmero cheese is a fresh smoked cheese manufactured on the Isle of Palma (The Canary Islands), which constitutes an important part of the economy of this isle. This is an artisan cheese, protected recently by the Denomination of Origin, which only can be made using milk from Palmera goats, by the milk producers themselves, following traditional methods passed down from generation to generation. This is one of the few cheeses which combine the two characteristics of fresh and of smoked cheese. It is made with unpasteurized milk, recently milked, using rennet of kid or authorized enzymes for the coagulation and is then smoked following traditional practices. The smoking can be done by burning almond shells (*Prunus dulcis*), dry prickly pear (*Opuntia ficus indica*), or the wood or needles of canary pine (*Pinus canariensis*). This cheese has a cylindrical shape and flat sides, with average compositional characteristics of: protein 17.5%, lipids 35.1% and dry extract 48.5%. This kind of cheese has been produced since the Middle Ages at least. This cheese, due to its organoleptic

properties, has great consumer acceptability; however its volatile components have never been studied.

The study is carried out by means of generation of the static headspace and extraction of its components by means of Solid Phase Microextraction followed by Gas Chromatography/Mass Spectrometry for the subsequent study of the extract. This is a technique that respects the environment because it does not requires the use of organic solvents. The purpose of this work is multiple: the characterization of the components of the headspace of this cheese, many of which are responsible for its flavour; the study of the diffusion degree of the smoke components into the cheese; the study of the differences between cheeses manufactured by different artisans; and the search for the presence of labelling substances or marker compounds related with the vegetable matter used for the smoking.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Samples.

The collection of samples is constituted by six artisan Palmero cheeses, named A1, A2, A3, A4, A5 and A6, manufactured by six different artisans of the Palma Isle, on the same date of the first week of July of 2001. All of them had been elaborated following the traditional methods previously mentioned and smoked using canary pine needles. Their chemical composition was determined by near infrared spectroscopy (NIR) previous calibration of the equipment (Instalab 600) as usual (Adamopoulos et al., 2001); likewise the pH was determined. Each cheese, having cylindrical shape, was divided in four similar pieces and three of them were vacuum packet and kept frozen at -40°C until study. From

the fourth piece three different samples were prepared: the interior of the cheese; the exterior region; and a thin cross-section representative of the entire cheese, containing both exterior and interior parts. The samples were chopped, and approximately 1g of the chopped sample was weighed into a 4mL amber vial Screw Top (acquired from Supelco), sealed with a hole cap PTFE/silicone septum. Those chopped samples stored in vials whose study was not immediate were frozen at -40°C until its study.

2.2. Generation of the headspace and extraction of its components by SPME.

Vials containing 1g of the cheese sample were introduced into a water bath maintained at 50°C. After a period of sample equilibration (15 minutes) the fiber was inserted into the headspace of the sample and was maintained for sixty minutes. The fiber used was a fiber of Polyacrylate (85 µm film thickness), acquired from Supelco. Previous experiments (Guillén and Errecalde 2002) carried out in our laboratory on the study of the headspace components of other smoked foods using fibers of Carboxen/Polydimethylsiloxane, Polydimethylsiloxane (100 µm film thickness) and Polyacrylate (85 µm film thickness) show that: Carboxen/Polydimethylsiloxane fiber basically retains the most volatile components of the headspace, in very high proportions; however Polyacrilate (85 µm film thickness) fiber retain components of a broader volatility range; and Polydimethylsiloxane (100 µm film thickness) fiber has less retention ability of smoke components than Polyacrilate (85 µm film thickness) fiber.

2.3. Gas Chromatography/Mass Spectrometry study.

Fibers with the adsorbed compounds were injected into a Hewlett-Packard gas chromatograph model HP 6890 Series II, equipped with a Mass Selective Detector 5973 and a Hewlett-Packard Vectra XM Series 4 computer operating with the ChemStation

program. The column used was a fused-silica capillary column (60 m long x 0.25 mm inner diameter x 0.25 μm film thickness; from Hewlett-Packard), coated with a non-polar stationary phase (HP-5MS, 5% phenyl methyl siloxane). The operation conditions were the following: the oven temperature was set initially at 45 °C (0.50 min hold), increased to 250 °C at 4 °C/min (20 min hold); the temperatures of the ion source and the quadrupole mass analyzer were kept at 230 and 150 °C, respectively; Helium was used as carrier gas at a pressure of 16.5 psi; injector and detector temperatures were held at 220 and 280 °C, respectively; splitless mode was used for injection with a purge time of 5 minutes. The fiber was maintained in the injection port for 10 minutes. Mass spectra were recorded at an ionization energy of 70 eV. After the first desorption, the fiber was routinely desorbed for a second time to determine if the first desorption process was complete, in order to take the corresponding measures.

Many components were identified by using standards. So, asterisked compounds in Table 1 were acquired commercially and used as standards for identification; in addition 4-ethyl-octanoic acid was also used to discard its presence in the headspace of this cheese. Many other components were only tentatively identified. In this latter case, the retention times together with the mass spectra, and a higher than 85% match with mass spectra from a commercial library were taken as identification criteria (Wiley 138.L, Mass Spectral Database, Wiley 1990) as in previous studies (Guillén et al., 1995; Guillén and Ibargoitia, 1996). Due to the overlapping of the signal of many compounds, semi quantification was based on arbitrary units of the total current ion or of the base specific peak ion area counts divided by 10^5 . Tables 2 and 3 give the average values obtained for some main components together with their average deviations and the ion used for the quantification in each case.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The six cheeses have very similar composition in terms of humidity ($45.64\pm 1.06\%$), proteins ($20.65\pm 1.05\%$), fat ($22.56\pm 2.4\%$), and pH (5.77 ± 0.23), in agreement with that indicated in the Origin Denomination regulation (B.O.E. num. 218, 11/9/01). Table 1 gives the compounds detected in the exterior and interior regions of the cheese, as well as in a cross-section which represent the whole cheese sample. Most of these compounds were detected in all samples studied; however, some of them were detected in only some samples. As can be observed the number of detected compounds is very high, more than 320, and they have been grouped according to their nature: acids, alcohols, esters, hydrocarbons, aldehydes, ketones, furan and pyran derivatives, terpenes and sesquiterpenes, nitrogen derivatives, phenol, guaiacol and syringol derivatives, ethers, and others. The detected compounds show a broad range of molecular weights and volatilities; taking into account the operating conditions of the experiments, the detection of compounds of very low volatility and very high molecular weight can only be explained by synergic effects in the volatilization process.

Acids form the most important group by concentration, constituting twenty components, in general coming from triglyceride lypolysis or hydrolysis, although other routes are also possible, as is well known. Most are saturated linear acids with an even or uneven number of carbon atoms the first being in higher concentration than the second. Hexanoic, octanoic and decanoic acids are the main components; this is consistent with their names caproic (or capronic), caprylic and capric (or caprinic) acids respectively, all of them coming from the name of the *capra* (goat) genus. Although linear acids are the main components of the headspace of this cheese, they are in lower concentrations than in other types of cheese

studied in our laboratory (Guillén and Abascal, 2002). In different papers the presence of the branched 4-methyl- and 4-ethyl-octanoic acids has been considered as a distinctive characteristic of goat cheese (Salles et al., 2002); however in this Palmero cheese the main branched acids are 4-methyl and 2-ethylhexanoic acids, with 4-methyloctanoic acid in very low proportions, even undetectable in some samples, and with 4-ethyloctanoic acid totally absent. This fact could be considered as a distinctive characteristic of this goat cheese, attributable to the composition of the milk either as a result of the goat race or from the feed. In addition, benzoic and oleic acids have also been detected. The presence of low proportions of benzoic acid in cheese has been associated with bacterial growth and its formation has been explained through two different pathways: either from hippuric acid by fermentation or from benzaldehyde autoxidation (Overstrom et al., 1972; Sieber et al., 1995); this latter compound has also been detected in the headspace of this cheese (see Table 1, aldehydes group). It should be noted that not all methods previously cited to study cheese volatile components are able to isolate and detect acids.

Table 1.- Detected compounds in different cheese regions together with an indication on their concentration.

RT(min)	Compound (molecular weight)	Exterior	Cross-section	Interior
Acids				
4.61	acetic acid (60)*	++**	++	++
8.87	butanoic acid (88)*	++	++	++
11.02	methyl-butanoic acid (102)	-	tr	tr
12.99	pentanoic acid (102)*	+	+	+
17.32	hexanoic acid (116)*	+++	+++	+++
20.46	4-methyl-hexanoic acid (130)	tr	tr	tr
20.70	heptanoic acid (130)*	tr	tr	tr
22.41	2-ethyl-hexanoic acid (144)*	+	tr	tr

Table 1 (continued).

RT(min)	Compound (molecular weight)	Exterior	Cross-section	Interior
24.44	benzoic acid (122)*	tr	tr	tr
24.80	octanoic acid (144)*	+++	+++	+++
26.99	4-methyl-octanoic acid (158)*	tr	tr	tr
27.97	nonanoic acid (158)*	+	+	+
31.51	decanoic acid (172)*	+++	+++	+++
34.76	undecanoic acid (186)	+	+	+
37.47	dodecanoic acid (200)*	+	+	+
40.36	tridecanoic acid (214)	-	tr	-
43.04	tetradecanoic acid (228)*	tr	+	+
45.66	pentadecanoic acid (242)	tr	tr	tr
48.13	hexadecanoic acid (256)*	+	+	+
52.33	9-octadecenoic acid (282)	-	+	-
Alcohols				
aliphatic alcohols				
3.94	ethanol (46)*	+++	+++	+++
7.38	3-methyl-1-butanol (88) (or isomer)	++	+	+
9.11	1,3-butanediol (90) (or isomer)	+	+	++
9.35	2,3-butanediol (90)*	+++	+++	+++
12.24	hexanol (102)*	tr	-	-
13.54	2-heptanol (116) (or isomer)	tr	tr	-
18.93	2-ethyl-1-hexanol (130)	tr	tr	-
19.22	dimethyl-4-heptanol (144) (or isomer)	-	+	+
aromatic alcohols				
19.21	benzenemethanol (108)*	+	tr	-
20.39	methyl-benzenemethanol (122)	tr	-	-
22.45	benzeneethanol (122)	tr	tr	tr
Esters				
10.13	ethyl butanoate (116)*	tr	tr	tr
16.67	methyl hexanoate (130)*	tr	-	-
17.73	ethyl hexanoate (144)*	tr	-	-
21.74	methyl benzoate (136)*	tr	tr	-

Table 1 (continued).

RT(min)	Compound (molecular weight)	Exterior	Cross-section	Interior
24.91	methyl benzeneacetate (150)	tr	-	-
25.97	methyl methylbenzoate (150)	tr	-	-
27.44	methylbutyl hexanoate (186) (or isomer)	-	tr	tr
29.07	methyl nonanoate (172)*	tr	tr	tr
30.30	methyl 2,5-dihydroxybenzoate (168) (or isomer)	tr	-	-
32.40	ethyl decanoate (200)*	+	tr	tr
35.04	bis-methylpropyl butanedioate (230) (or isomer)	tr	-	-
35.50	ethyl undecanoate (214)	-	tr	-
36.42	methyl 4-hydroxy-3-methoxybenzoate (182) (methyl vanillate)*tr	-	-	-
36.42	methyl dodecanoate (214) (or isomer)*	-	tr	-
36.87	dibutyl-2-butanedioate (228) (or isomer)	tr	tr	tr
38.05	dibutyl pentanedioate (244) (or isomer)	tr	-	-
38.50	ethyl dodecanoate (228)*	tr	tr	tr
40.15	phosphoric acid, tributyl ester (266)	tr	tr	-
42.13	methyl tetradecanoate (242)*	-	tr	tr
43.99	ethyl tetradecanoate (256)*	tr	tr	tr
44.79	isopropyl myristate (270)	tr	tr	tr
47.31	methyl hexadecanoate (270)	-	tr	tr
48.95	ethyl hexadecanoate (284)	-	tr	tr
52.04	methyl octadecanoate (298)	tr	tr	tr
57.83	dioctyl hexanedioate (370) (or isomer)	tr	tr	-
58.43	3-hydroxypropyl 9-octadecenoate (340) (or isomer)	-	tr	-
59.30	hexadecyl octanoate (368) (or isomer)	tr	tr	tr
63.06	octadecyl octanoate (396) (or isomer)	-	tr	-
69.29	triglyceryl butanoate (302) (or isomer)	-	tr	-
72.70	triglyceryl octanoate (470) (or isomer)	-	tr	-
88.19	triglyceryl tridecanoate (554) (or isomer)	-	+	tr
Aldehydes				
aliphatic aldehydes				
9.53	hexanal (100)*	tr	-	-
17.88	octanal (128)*	tr	tr	tr
22.02	nonanal (142)*	++	++	+++
24.25	2-nonenal (140)	tr	tr	-

Table 1 (continued)

RT(min)	Compound (molecular weight)	Exterior	Cross-section	Interior
25.87	decanal (156)	tr	+	+
27.94	2-decenal (154)	-	+	-
29.50	undecanal (170)	tr	+	tr
32.87	dodecanal (184)	+	+	tr
36.05	tridecanal (198)	tr	tr	tr
39.07	tetradecanal (212)	tr	+	tr
41.91	pentadecanal (226)	tr	tr	-
47.19	heptadecanal (254)	-	tr	tr
aromatic aldehydes				
16.16	benzaldehyde (106)*	tr	tr	tr
19.65	2-hydroxybenzaldehyde (122)	tr	tr	-
19.67	benzeneacetaldehyde (120)*	tr	tr	tr
21.20	methylbenzaldehyde (120)	tr	-	-
21.92	benzene-propenaldehyde (132)	tr	-	-
22.10	benzene-propenaldehyde (132) (isomer)	tr	-	-
24.15	3-hydroxy-4-methylbenzaldehyde (136)	tr	tr	tr
Ketones				
aliphatic linear ketones				
13.16	2-heptanone (114)*	-	tr	-
21.62	2-nonanone (142)*	-	tr	-
25.44	2-decanone (156)*	tr	tr	-
29.01	2-undecanone (170)*	tr	tr	-
32.41	2-dodecanone (184)*	-	tr	-
35.21	2-tridecanone (198)*	-	tr	-
41.48	2-pentadecanone (226)	tr	+	+
44.17	2-hexadecanone (240)	-	tr	-
46.76	2-heptadecanone (254)	-	tr	-
49.55	2-octadecanone (268)	-	tr	tr
aliphatic cyclic ketones				
9.25	cyclopentanone (84)*	tr	-	-
10.87	2-cyclopenten-1-one (82)	tr	tr	tr
11.17	2-methyl-cyclopentanone (98)	tr	-	-

Table 1 (continued).

RT(min)	Compound (molecular weight)	Exterior	Cross-section	Interior
13.30	cyclohexanone (98)*	tr	-	-
13.80	2-methyl-2-cyclopenten-1-one (96)*	+	tr	-
15.02	cyclohexen-1-one (96)	tr	-	-
15.24	2-ethylcyclopentenone (110) (or isomer)	tr	tr	-
15.53	2,5-dimethyl-2-cyclopentenone (110) (or isomer)	tr	-	-
16.31	3-methyl-2-cyclopenten-1-one (96)*	+	tr	tr
17.51	dimethyl-2-cyclopentenone (110) (isomer)	tr	tr	-
17.79	dimethyl-2-cyclopentenone (110) (isomer)	tr	tr	-
17.86	3-methylcyclohexanone (112)*	tr	tr	tr
19.31	trimethyl-2-cyclopenten-1-one (124) (isomer)	tr	tr	-
19.43	dimethyl-2-cyclopenten-1-one (110) (isomer)	+	tr	tr
20.44	trimethyl-2-cyclopenten-1-one (124) (isomer)	+	tr	tr
21.05	3-ethylcyclopent-2-en-1-one (110) (or isomer)	tr	-	-
aliphatic cyclic diketones				
18.92	3-methyl-1,2-cyclopentanedione (112) (cyclotene)*	++	+	tr
20.11	3,5-dimethyl-1,2-cyclopentanedione (126)	+	tr	-
22.63	3-ethyl-1,2-cyclopentanedione (126) (3-ethylcyclopentenolone)*	+	tr	tr
aromatic ketones and related				
20.60	1-phenyl-ethanone (120) (acetophenone)*	+	tr	tr
23.07	1-phenyl-2-propanone (134)	tr	tr	-
23.42	(methylphenyl)-ethanone (134) (isomer)	tr	-	-
24.80	(methylphenyl)-ethanone (134) (isomer)	tr	-	-
25.26	(methylphenyl)-ethanone (134) (isomer)	tr	-	-
28.03	1-(2,4-dihydroxyphenyl)-ethanone (152) (or isomer)	tr	-	-
28.78	2,3-dihydro-1H-inden-1-one (132)	+	tr	tr
29.68	3-methyl-2,3-dihydro-1H-inden-1-one (146)	tr	tr	-
31.30	hydroxy-methoxyphenyl-ethanone (166) (or isomer)	tr	-	-
34.13	dimethyl-2,3-dihydro-1H-inden-1-one (160) (or isomer)	tr	-	-
35.10	dimethyl-2,3-dihydro-1H-inden-1-one (160) (or isomer)	tr	-	-

Table 1(continued).

RT(min)	Compound (molecular weight)	Exterior	Cross-section	Interior
35.18	hydroxy-dimethoxyphenylethanone (196) (or isomer)	tr	-	-
35.52	1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-ethanone (166) (acetovanillone)*	tr	-	-
36.60	2-methyl-1,4-naphthalenedione (172)	tr	-	-
36.85	1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propanone (180) (propiovanillone)*	tr	-	-
39.86	diphenyl methanone (182)	+	tr	tr
49.01	9,10-anthracenedione (208)	tr	tr	tr
50.75	1,4-dimethyl-9,10-anthracenedione (236)	tr	tr	tr
Hydrocarbons				
aliphatic hydrocarbons				
13.47	nonane (128)*	tr	tr	tr
21.89	undecane (156)*	-	tr	-
25.68	dodecane (170)*	-	tr	tr
28.23	tridecene (182)	-	tr	-
29.20	tridecane (184)*	-	tr	-
32.28	tetradecene (196)	tr	-	-
32.53	tetradecane (198)*	tr	tr	-
34.90	1-pentadecene (210) (or isomer)	+	tr	tr
35.69	pentadecane (212)*	-	tr	-
38.63	hexadecane (226)*	-	tr	-
40.87	1-heptadecene (238)	tr	tr	tr
41.26	heptadecane (240)*	tr	+	+
43.84	1-octadecene (252) (or isomer)	tr	tr	tr
44.12	octadecane (254)*	tr	tr	tr
45.18	neophytadiene (278)*	-	tr	-
45.34	3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecene (280) (phytene)	tr	tr	tr
49.10	eicosene (282)*	tr	tr	tr
52.29	hydrocabon	tr	-	-
54.22	unsaturated hydrocabon	tr	-	-
55.26	hydrocabon	+	tr	tr

Table 1 (continued).

RT(min)	Compound (molecular weight)	Exterior	Cross-section	Interior
55.74	hydrocabon	tr	-	-
65.87	squalene (410)*	-	+	+
monoaromatic hydrocarbons				
12.30	dimethylbenzene (106) (isomer)	tr	-	-
13.19	styrene (104)*	tr	-	-
13.31	dimethylbenzene (106) (isomer)	tr	-	-
18.90	methyl-methylethyl-benzene (134) (isomer)	-	-	tr
27.31	butyl-benzene (134)	tr	-	-
29.28	1,2,4,5-tetramethyl-benzene (134) (or isomer)	tr	tr	tr
33.78	triethyl-benzene (162)	tr	-	-
33.89	1-butenyl-dimethyl-benzene (160) (or isomer)	tr	-	-
33.91	1,1'-methylenebis-benzene (168) (or isomer)	tr	tr	tr
polyaromatic hydrocarbons				
19.77	1H-indene (116)	+	tr	-
23.90	methyl-1H-indene (130) (isomer)	tr	tr	-
24.15	methyl-1H-indene (130) (isomer)	tr	-	-
24.27	azulene (128)	tr	-	-
25.31	naphthalene (128)*	+	tr	-
27.45	decahydro-naphthalene (138)	tr	-	-
29.36	2-methylnaphthalene (142)*	tr	tr	tr
29.93	1-methylnaphthalene (142)*	tr	tr	-
30.46	2,3-dihydro-trimethyl-1H-indene (160) (or isomer)	tr	-	-
30.99	2,3-dihydro-trimethyl-1H-indene (160) (or isomer)	tr	-	-
32.16	1,1'-biphenyl (154)	tr	tr	-
32.69	ethyl-naphthalene (156)	tr	-	-
33.38	2,3-dihydro-trimethyl-1H-indene (160) (or isomer)	tr	tr	-
33.51	dimethyl-naphthalene (156)	tr	-	-
33.56	2,2'-dimethyl-1,1'-biphenyl (182) (or isomer)	tr	-	-
33.65	dimethyl-naphthalene (156)	tr	-	-
33.73	tetrahydro-dimethyl-naphthalene (160) (or isomer)	tr	-	-
34.56	acenaphthylene (152)*	+	tr	-

Table 1 (continued).

RT(min)	Compound (molecular weight)	Exterior	Cross-section	Interior
38.63	9H-fluorene (166)	tr	-	-
44.19	phenanthrene (178)*	tr	-	-
Furan and pyran derivatives				
11.05	2-furancarboxaldehyde (96)*	+	tr	-
11.63	2-furanmethanol (98)*	++	+	tr
14.02	1-(2-furanyl)-ethanone (110) (2-acetylfuran)*	+	-	tr
14.39	2(3H)-dihydrofuranone (86)	+	tr	tr
14.15	2(5H)-furanone (84) (γ -crotonolactone)*	+	tr	tr
15.23	5-methyl-2(5H)-furanone (98)*	tr	-	-
15.80	2-furancarboxylic acid (112)	++	tr	tr
16.14	3-methyl-5-methyliden-2(5H)-furanone (110) (or isomer)	tr	tr	-
16.82	methyl 2-furancarboxylate (126)	tr	-	-
20.28	5-methyl-2(3H)-dihydrofuranone (100)	-	tr	tr
22.42	3-hydroxy-2-methyl-4H-pyran-4-one (126) (maltol)*	tr	tr	-
24.08	γ -heptalactone (128)*	-	tr	-
28.91	δ -octalactone (142)	tr	tr	+
29.08	2-octylfuran (180)	-	tr	-
32.48	δ -nonalactone (156)	-	tr	-
34.89	γ -decalactone (170)*	-	tr	-
35.80	δ -decalactone (170)*	tr	+	tr
36.19	2-methyl-8H-cyclohepta(b)furan-8-one (160) (or isomer)	tr	-	-
36.66	methyl-cyclohepta(b)furanone (160) (or isomer)	tr	-	-
38.09	γ -undecalactone (186)	-	tr	-
38.92	δ -undecalactone (186)	-	tr	tr
40.49	γ -dodecelactone (196)	tr	tr	tr
41.12	γ -dodecalactone (198)*	tr	+	+
41.94	δ -dodecalactone (198)*	tr	+	tr
43.92	γ -tridecalactone (212)	-	tr	-
46.66	γ -tetradecalactone (226)	-	tr	tr
47.45	δ -tetradecalactone (226)	tr	+	tr

Table 1 (continued).

RT(min)	Compound (molecular weight)	Exterior	Cross-section	Interior
49.22	γ -pentadecalactone (240)*	-	tr	-
51.68	γ -hexadecalactone (254)	tr	tr	tr
52.45	δ -hexadecalactone (254)	tr	+	tr
54.02	γ -heptadecalactone (268)	-	tr	-
56.25	γ -octadecalactone (282)	-	tr	-
56.97	δ -octadecalactone (282)	tr	tr	tr
Ethers				
alkyl alkyl ethers				
17.96	2-(2-ethoxyethoxy)-ethanol (134)	++	++	++
23.34	4-butoxy-1-butanol (146)	tr	tr	tr
31.01	1,4-dibutoxy-butane (202)	tr	+	++
cyclic ethers or benzofuran derivatives				
17.77	benzofuran (118)	tr	tr	-
22.31	2-methyl-benzofuran (132) (or isomer)	tr	tr	-
23.89	dihydrobenzofuran (120) (or isomer)	tr	tr	-
26.13	dimethylbenzofuran (146) (or isomer)	tr	tr	-
26.24	dihydrobenzofuran (120) (or isomer)	+	tr	tr
26.45	dimethylbenzofuran (146) (or isomer)	tr	-	-
36.60	dibenzofuran (168)	tr	-	-
aliphatic-aromatic ethers				
18.65	4-methyl-1-methoxybenzene (122)	tr	-	-
23.67	1,2-dimethoxybenzene (138)*	tr	tr	-
24.98	1,4-dimethoxybenzene (138)*	+	+	-
25.25	1,3-dimethoxybenzene (138)*	+	tr	-
26.54	2-phenoxy-ethanol (138)	tr	tr	tr
26.57	dimethoxytoluene (152) (or isomer)	tr	-	-
27.11	dimethoxytoluene (152) (or isomer)	tr	tr	tr
27.57	dimethoxytoluene (152) (or isomer)	tr	-	-
29.71	trimethoxybenzene (168) (or isomer)	+	tr	-
29.81	dimethoxytoluene (152) (or isomer)	tr	-	-

Table 1 (continued).

RT(min)	Compound (molecular weight)	Exterior	Cross-section	Interior
aliphatic-aromatic ethers				
31.90	methyl-propenyl-methoxybenzene (162) (or isomer)	tr	-	-
32.76	5-methyl-1,2,3-trimethoxybenzene (182)	tr	tr	-
34.25	methyl-propenyl-methoxybenzene (162) (or isomer)	tr	-	-
35.73	propenyl-dimethoxybenzene (178) (or isomer)	tr	-	-
37.33	propenyl-dimethoxybenzene (178) (or isomer)	tr	-	-
Terpenes, sesquiterpenes, oxygenate derivatives and sterols				
15.06	α -pinene (136)*	tr	tr	tr
17.84	carvomenthene (138) (or isomer)	-	tr	tr
19.07	limonene (136)*	tr	-	tr
24.35	terpene (136)	tr	-	-
25.73	myrtenol (152) (or isomer)	tr	-	-
26.51	carveol (152) (or isomer)	tr	-	-
32.12	sesquiterpene (204)	tr	tr	-
32.71	sesquiterpene (204)	tr	-	-
33.28	cyperene (204) (or isomer)	tr	tr	tr
33.64	sesquiterpene (204)	tr	tr	tr
36.75	sesquiterpene (204)	tr	tr	-
45.30	oxygenated sesquiterpene	tr	tr	-
73.07	cholest-5-en-3-ol (386)	-	+++	++
Nitrogen derivatives				
17.28	benzonitrile (103)	+	tr	tr
20.32	1-(1H-pyrrol-2-yl)-ethanone (109)	tr	-	-
23.45	benzeneacetonitrile (117)	+	tr	-
27.26	benzenepropanenitrile (131)	tr	tr	-
28.44	methyl-1H-indole (131)	tr	-	-
29.16	isoquinoline (129)	tr	-	-
29.18	1H-indole (117)	+	tr	tr
31.18	3-(1-methyl-2-pyrrolidinyl)-pyridine (162) (nicotine)	tr	tr	tr
31.76	dimethyl-1H-indole (145) (or isomer)	tr	-	-

Table 1 (continued).

RT(min)	Compound (molecular weight)	Exterior	Cross-section	Interior
Nitrogen derivatives				
32.36	methyl-1H-indole (131) (or isomer)	+	tr	tr
33.59	2-methyl-1H-isoindole-1,3(2H)-dione (161) (or isomer)	tr	-	-
34.71	1H-isoindole-1,3(2H)-dione (147) (or isomer)	tr	-	-
Phenolic derivatives				
phenol derivatives				
16.89	phenol (94)*	+++	++	tr
19.97	2-methylphenol (108)*	+++	++	tr
20.79	4-methylphenol (108)* and 3-methylphenol (108)*	+++	++	tr
22.15	2,6-dimethylphenol (122)*	++	+	tr
23.28	2-ethylphenol (122)*	++	+	tr
23.69	2,4-dimethylphenol (122)* and 2,5-dimethylphenol (122)*	+++	++	tr
24.35	propylphenol (136) (or isomer)	tr	-	-
24.36	4-ethylphenol (122)*	+	+	tr
24.44	3-ethylphenol (122)*	+	+	-
24.85	2,3-dimethylphenol (122)*	+	tr	-
25.15	ethyl-methylphenol (136) (or isomer)	+	tr	
25.38	dimethylphenol (122) (or isomer)	+	tr	-
25.69	trimethylphenol (136) (or isomer)	tr	tr	-
25.87	trimethylphenol (136) (or isomer)	+	-	-
26.41	propylphenol (136) (or isomer)	tr	-	-
26.67	ethyl-methylphenol (136) (or isomer)	+	tr	tr
26.77	ethyl-methylphenol (136) (or isomer)	+	-	-
26.93	trimethylphenol (136) (or isomer)	+	tr	-
27.09	ethyl-methylphenol (136) (or isomer)	+	tr	-
27.21	ethyl-methylphenol (136) (or isomer)	+	tr	-
27.57	propenyl-phenol (134) (or isomer)	tr	tr	-
27.69	methyl-methylethyl-phenol (150) (or isomer)	tr	-	-
27.72	propylphenol (136) (or isomer)	tr	tr	-
27.78	methylethyl-phenol (136) (or isomer)	+	tr	tr

Table 1.- Detected compounds in different cheese regions together with an indication on their concentration (continued).

RT(min)	Compound (molecular weight)	Exterior	Cross-section	Interior
27.91	ethyl-methylphenol (136) (or isomer)	tr	-	-
28.12	trimethylphenol (136) (or isomer)	tr	tr	-
28.28	trimethylphenol (136) (or isomer)	+	tr	-
28.45	trimethylphenol (136) (or isomer)	tr	-	-
28.49	methyl-methylethyl-phenol (150) (or isomer)	tr	-	-
28.90	methyl-methylethyl-phenol (150) (or isomer)	tr	-	-
28.91	propenyl-phenol (134) (or isomer)	tr	tr	-
29.10	methyl-methylethyl-phenol (150) (or isomer)	+	-	-
29.35	ethylmethyl phenol (136) (or isomer)	tr	-	-
29.54	methylpropyl-phenol (150) (or isomer)	tr	-	-
29.64	diethylphenol (150) (or isomer)	tr	-	-
30.21	methylpropyl-phenol (150) (or isomer)	tr	-	-
30.69	propenyl-phenol (134) (or isomer)	tr	-	-
30.75	methyl-propyl-phenol (150) (or isomer)	tr	-	-
36.10	2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol (206)*	tr	tr	tr
36.31	2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-phenol (220) (BHT)*	tr	tr	tr
36.48	(1,1'-biphenyl)-3-ol (170)	tr	tr	tr
39.93	tri-butylphenol (262) (or isomer)	tr	+	+
53.44	4,4'-(1-methylethylidene)bis-phenol (228) (or isomer)	tr	tr	tr
methoxyphenol derivatives				
21.52	2-methoxyphenol (124) (guaiacol)*	+++	++	+
23.38	2-methyl-3-methoxyphenol (138) (or isomer)	tr	-	-
23.58	3-methoxy-1,2-benzenediol (140) (3-methoxypyrocatechol)*	+	tr	-
31.31	4-(2-propenyl)-2-methoxyphenol (164) (eugenol)*	+	tr	-
31.68	4-propyl-2-methoxyphenol (166) (4-propylguaiacol)*	+	tr	-
32.58	allyl-methoxyphenol (164) (or isomer)	tr	tr	-
32.74	4-hydroxy-3-methoxy-benzaldehyde (152) (vanillin)*	tr	tr	-
33.02	4-(1-propenyl)-2-methoxyphenol (164) (isoeugenol)*	+	tr	-
33.57	5-(1-propenyl)-methoxyphenol (164) (or isomer)	tr	-	-
34.33	4-(1-propenyl)-2-methoxyphenol (164) (isoeugenol isomer)*	+	tr	-

Table 1 (continued).

RT(min)	Compound (molecular weight)	Exterior	Cross-section	Interior
dimethoxyphenol derivatives				
27.44	dimethoxyphenol (154) (or isomer)	tr	-	-
31.08	2,6-dimethoxyphenol (154) (syringol)*	+	tr	-
34.16	4-methyl-2,6-dimethoxyphenol (168) (4-methylsyringol)*	+	tr	-
36.29	propenyl-dimethoxyphenol (194) (or isomer)	tr	-	-
36.65	4-ethyl-2,6-dimethoxyphenol (182) (4-ethylsyringol)	tr	tr	-
38.94	4-(2-propenyl)-2,6-dimethoxyphenol (194)*	tr	-	-
41.72	4-(1-propenyl)-2,6-dimethoxyphenol (194) (isomer)	tr	-	-
Others				
14.32	sulfonylbis-methane (94)	tr	tr	tr
54.85	1,1'-sulfonylbis-4-chloro-benzene (285)	tr	tr	tr
Unidentified				
36.98	41(14), 43(24), 55(34), 71(100), 98(6)	tr	tr	+
37.17	41(28), 43(28), 57(36), 71(100), 85(19), 98(15), 129(12)	+	+	+
39.12	41(40), 43(39), 55(68), 57(60), 71(100), 73(81), 85(22), 100(13), 145(8)	+	+	+
40.04	40(21), 55(47), 56(17), 70(7), 84(18), 99(34), 111(17), 173(100)	+	+	+
	129(47), 145(11)	tr	+	+
44.45	41(36), 43(23) 55(100), 71(73), 73(94), 85(20), 129(47), 145(11)	tr	+	+
44.62	41(34), 57(68), 71(100), 73(75), 85(28), 100(21), 129(43), 145(18)	+	+	+
49.53	41(24), 43(34), 55(28), 71(100), 85(17), 129(19), 239(5), 256(9)	tr	tr	+

* asterisked compounds were identified by standards.

** great number of area counts: +++; medium number of area counts: ++; small number of area counts: +; very low number of area counts: tr; no detected: -.

Few alcohols have been detected and only those having a small number of carbon atoms are in significant proportions. Among aliphatic alcohols there are primary and secondary as well as linear or branched; all of these have been identified detected before as cheese components and can come from lactose, aminoacids, or acids through different processes (Molimard and Spinnler, 1996). The origin of the aromatic alcohols could be found in the smoke, although some of them, such as benzeneethanol are important in the flavour of several unsmoked cheeses (Rychlik and Bosset, 2001; Sorensen and Benfeldt, 2001; Valero et al., 2001).

The ester group contains thirty one components, most of them having one single ester group, although compounds having two or three have also been detected. This group includes esters whose origin could be attributed to reactions between acids and alcohols, as well as triglycerides; the presence of these latter compounds, with great molecular weight and low volatility could only be explained by synergic effects during headspace generation, as commented above. In general, the concentration of esters is very low, the most significant being ethyl decanoate. Finally it only remains to add that some aromatic esters derived from benzoic, methylbenzoic and benzeneacetic acids have also been detected, together with methyl vanillate, compound derived from vanillic acid, which is a typical smoke component (Guillén and Ibargoitia, 1998).

The group of aldehydes is formed by saturated and unsaturated aliphatic and aromatic aldehydes. Saturated, unsaturated aliphatic and some aromatic aldehydes have been detected in the headspace of different unsmoked cheeses (Moio and Addeo, 1998; Thierry et al., 1999). The saturated aldehydes vary from six to seventeen carbon atoms with an even or uneven number of carbon atoms and can come from acids or from aminoacids; the

most significant are nonanal, decanal, undecanal and dodecanal, especially the first. Only two unsaturated aldehydes have been detected; it should be noted that this type of aldehydes has not been detected in cheese very often. In addition, some aromatic aldehydes have also been detected. Some of them, such as benzaldehyde, hydroxy-benzaldehyde and benzeneacetaldehyde (with bitter, almond, fragrant, sweet, creamy, nutty, woody balsamic notes), are common cheese components (Careri et al., 1994); however others, such as vanillin, are typical smoke components (Guillén and Ibargoitia, 1998), probably for this reason some of these have not been detected in the interior region.

Ketones are very numerous (47 components). There is a subgroup of ten methyl ketones, with between seven and eighteen carbon atoms, well known cheese components whose formation has been attributed to *beta*-oxidation of fatty acids; these ketones are in very low concentrations. There is also a subgroup of cyclic ketones, typical smoke components (Guillén and Ibargoitia, 1996); among these the most significant are some methyl, dimethyl and trimethyl cyclopentenones which have diffused into the interior region. The cyclic diketones detected, with well known nutty, burnt, brandy, coffee, caramel, and maple syrup notes (Maga, 1988), are the main ketones, and some have also been detected, as trace levels, in the interior of cheese; these compounds come from smoke (Maga, 1988). Finally this group also includes an important number of aromatic ketones, most of them smoke components, explaining why they are almost exclusively found in the exterior region. It must be noted that only those ketones normally present in significant proportions in smoke (Guillén and Ibargoitia, 1996) have been detected in the interior of the cheese.

Hydrocarbons, in a great number and at very low concentrations, are also present in the headspace. Among these there are saturated and unsaturated aliphatic hydrocarbons, as well as mono- and poly-aromatic hydrocarbons. Linear saturated and unsaturated hydrocarbons, having from nine to more than eighteen carbon atoms, have been detected, as well as branched hydrocarbons of very high molecular weight; the most significant is heptadecane. Linear saturated and unsaturated hydrocarbons have been detected in unsmoked cheeses (Larrayoz et al., 2001), although the saturated ones also are smoke components (Guillén and Ibargoitia, 1998). In addition, there are present three branched hydrocarbons: squalene, phytene and neophytadiene; these have been previously detected in cheese (Banks et al., 1992; Dirinck and De Winne, 1999; Guillén and Abascal, 2002), and are present in many plants, which if they form part of the goat diet could be the cause of their presence in this cheese. The origin of the mono-aromatic hydrocarbons detected is difficult to establish because they are also smoke constituents, and some of them, such as styrene and other alkylbenzene hydrocarbons, have also been detected in unsmoked cheese (Guichard et al., 1987; Bosset and Gauch, 1993; Bosset et al., 1997). The polyaromatic hydrocarbons detected, all of them of low molecular weight, probably are from the smoke, although some of them have also been detected in unsmoked cheese (Guichard et al., 1987; Martinez-Castro et al., 1991; Careri et al., 1994; Jaillais et al., 1999). It should be noted that aliphatic hydrocarbons have been detected both in the exterior and interior region of cheese, however aromatic hydrocarbons have been basically found in the exterior; this fact could indicate a different origin for both kinds of hydrocarbons.

The furan and pyran derivatives constitute a very numerous group, having 33 components. Among these, all those of low molecular weight, from 2-furancarboxaldehyde

to maltol, coming from the smoke (Guillén and Ibargoitia, 1996), are found not only in the exterior but also in the interior region, although in higher concentration in the first than in the second region, as expected; most of these compounds give pleasant flavours such as caramel, sweet, malt toasted, like bread, spicy, warm, butterscotch (Maga, 1988). In addition to these components a great number of γ - and δ -lactones, most of them in very low concentrations, have been detected; among these, δ -decalactone, δ -dodecalactone, δ -tetradecalactone and δ -hexadecalactone are in higher proportions. These compounds, probably resulting from oxidation of fatty acids and subsequent cyclation of the formed hydroxyacids, are well known cheese components, although the number of lactones usually detected in cheese is lower than that found here; their flavour has been described as pleasant, buttery and fruity.

Another group of components is constituted by ethers. This contains some alkyl-alkyl ethers in significant proportions, most of them also having an alcohol group, which are distributed similarly in both interior and exterior cheese regions. Some authors have previously described the presence of some of these components in cheese (Moio et al., 1993; Careri et al., 1994; Lecanu et al., 2002). Within this group a subgroup of compounds tentatively identified as benzofuran derivatives has also been included, together with another of alkyl-aryl ethers; both kinds of compounds, which are basically present only in the exterior region, are well known smoke components (Guillén and Ibargoitia, 1998).

The presence in pine needles of terpenes and sesquiterpenes, as well as of some of their oxygen derivatives, is well documented (Lapp and Von, 1982; Papadopoulou and Koukos, 1996; Marculescu and Gleizes, 2002). For this reason their presence in this cheese could be attributed to the smoke used in manufacture; however in other cheeses their presence has

been attributed to the animal feed (Dumont et al., 1981; Guichard et al., 1987; Bosset et al., 1994) or to the activity of *P. caseifulvum* and of *P. camemberti fungus* (Larsen, 1999). Their concentration is very low and all of them have interesting organoleptic properties.

In addition, a group of nitrogen derivatives including nitrile and indole derivatives has also been detected. Some of these, known smoke components, are in higher proportions in the exterior than in the interior region, so their origin could be attributed to the smoke. However, benzonitrile (Barbieri et al., 1994; Careri et al., 1994; Sunesen et al., 2002) as well as some indole derivatives have also been detected in unsmoked cheese and are considered to result from the activity of lactic acid bacteriae on aminoacids (Gao et al., 1997; Kemmer et al., 1997; Rychlik and Bosset, 2001; Valero et al. 2001; Tavarria et al., 2002). Nicotine has also been detected, both in the exterior and interior region, always at very low proportions; this compound has been previously described as a cheese component (Moio and Addeo, 1998; Guillén and Abascal, 2002).

The most numerous group of components is that of phenolic derivatives, constituted by phenol (43 components), methoxyphenol (13 components) and dimethoxyphenol (7 components) derivatives. All of them are well known smoke components (Maga, 1988) and only those in significant concentrations in the exterior region have diffused into the interior, these being phenol, guaiacol, syringol and some of their low molecular weight alkylderivatives. The high number of phenol and low number of syringol derivatives it is noteworthy. The flavour notes contributed by phenol derivatives are pungent and cresolic while those of guaiacol derivatives have been described as sweet, smoky, somewhat pungent, weak, phenolic, woody and those of syringol derivatives as smoky, mild, heavy, burnt (Kim et al., 1974; Maga, 1988).

Finally a reduced number of other components of unknown origin, some of them probably contaminants such as sulfonylbis-methane and 1,1'-sulfonylbis-4-chloro-benzene which are monomers of some polyesters have been also detected at very low concentration levels.

Obviously the contribution of the different compounds above mentioned to the Palmero cheese flavour is determined by the taste and odour threshold values of each and every one of these compounds in this fresh cheese matrix.

As can be observed in Table 1, the headspace of the interior region of the Palmero cheese is poorer in volatile components than the exterior region because only those smoke components in significant concentrations in the exterior region, such as some cyclic ketones and diketones, some furan and pyran derivatives of low molecular weight, some phenol, and guaiacol derivatives, as well as some alkyl-aryl ethers, diffuse through the cheese matrix and reach the interior region although in very low concentrations. The slight diffusion of smoke components into the cheese matrix could be due to the short period of time between smoking and consumption of this cheese; probably in smoked cheeses with a long period of ripening this diffusion is greater. As could be expected, the headspace of the cross-section contains more components than the interior region but less than the exterior region. This can be also observed in Figure 1, which gives the total current ion chromatogram of the headspace components of the exterior, interior and cross-section of the sample A4, which is the most smoked of all studied.

Smoke is constituted by a large number of components, coming from cellulose, hemicellulose and lignin pyrolysis, which have different functional groups, such as ketones, aldehydes, acids, ethers, hydrocarbons, carbohydrate derivatives, nitrogen derivatives, and

phenol, guaiacol, syringol, and pyrocatechol derivatives (Guillén and Ibargoitia, 1996; Guillén and Manzanos, 1999; Guillén et al., 2001). Among these components, generally, carbonyl and carboxyl derivatives together with carbohydrate derivatives are the major smoke components, whereas phenolic derivatives are in smaller proportion. In the smoking process the smoke components are deposited at random on the cheese surface. If smoke components do not react at all or not interact very strongly with cheese components, both systems, smoke and smoked cheese, will contain the same components coming from wood pyrolysis and in similar proportions.

In spite of carbonyl, furan and pyran and other carbohydrate derivatives being in higher proportions than phenolic derivatives in smoke (Maga, 1988; Guillén and Ibargoitia, 1996; Guillén and Manzanos, 1999), in the headspace of this smoked cheese the opposite is true, that is to say the headspace contains proportions of carbonyl, of furan and pyran derivatives, and of phenolic derivatives which are very different from those generally found in smoke. This could be due to some carbonyl derivatives reacting with amine cheese groups in reactions similar to those of Maillard, modifying the texture and the colour of the cheese, or because carbonyl derivatives are strongly retained by cheese components. The high proportions of phenol derivatives in the headspace of this cheese could be due to these smoke components neither react nor interact very strongly with cheese components.

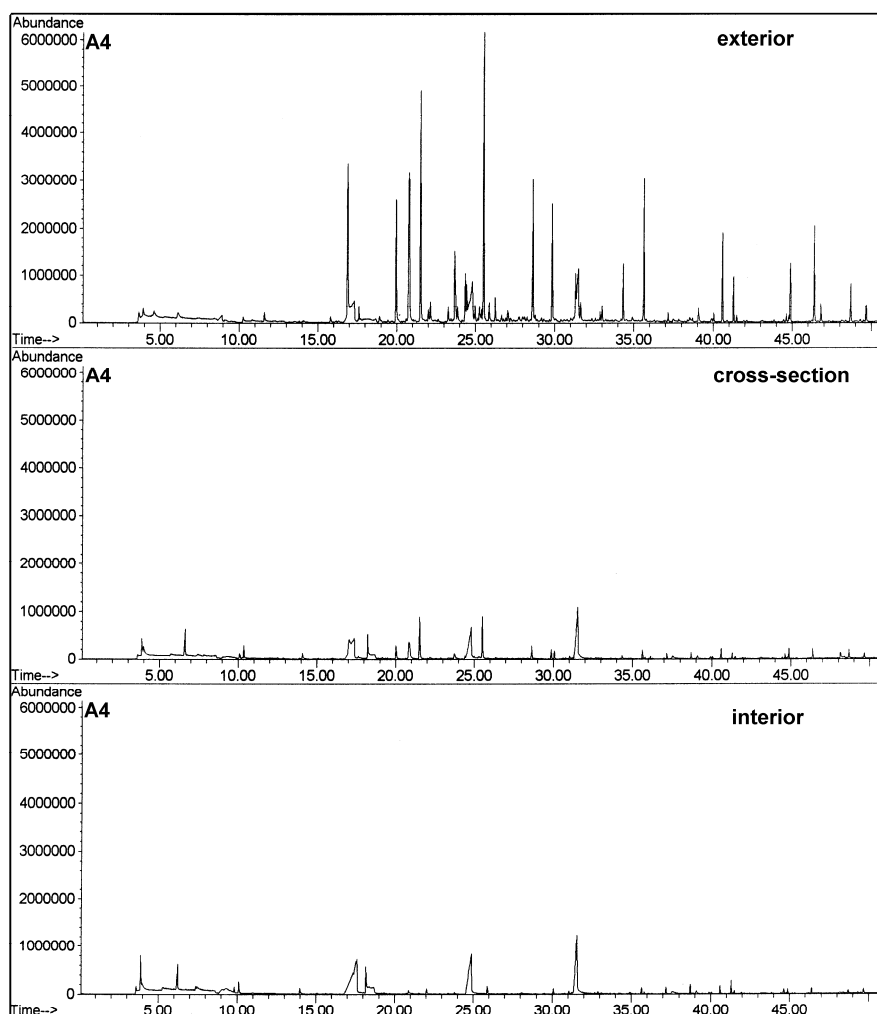


Figure 1.- Total ion current chromatogram of the components of the headspace of the exterior, cross-section and interior regions of the A4 cheese sample.

This Palmero cheese, as has been commented on above, is made by artisans and for this reason there is a certain variability among the headspace composition of the different samples studied. The differences found are related to the concentration of the components but not to their nature. The samples A2 and A4 contain concentrations in fatty acids and in

smoke components respectively, which are much greater than in the other samples, due to an accentuation of the lypolysis in the first case and of the smoking process in the second; both are extreme cases. Figure 2 shows the total current ion chromatogram of the headspace of the exterior region of these two cited samples and of sample A1; it can be observed that in the headspace of the exterior region of the sample A2 the hexanoic, octanoic and decanoic acids predominate whereas in the headspace of the exterior region of the sample A4 the phenolic derivatives predominate, that is to say phenol and their methyl derivatives and guaiacol and their alkyl derivatives. However in the headspace of the exterior region of sample A1, although smoke components are the main components their abundance is much lower than in sample A4.

Table 2 shows the cheese headspace average concentrations in samples A1, A2, A3, A5 and A6, of some compounds known as typical smoke components (Maga, 1988), together with the average deviations; these concentrations are given in area counts of the base peak ions of each compound multiplied by 10^{-5} . Table 3 gives the cheese headspace average concentrations of the main acids in samples A1, A3, A4, A5 and A6 in the same arbitrary units. It can be observed that, though the average deviations are high, indicating significant differences in the abundance of these components in the headspace of these artisan cheeses, the compounds in high, or low, concentrations in one sample are also in high, or low, concentrations in the others; so, in all studied samples, among smoke component phenol, guaiacol, 4-methylguaiacol and 4-ethylguaiacol are in high proportion and trimethylphenol, propylphenol and isoeugenol are in smaller proportions and hexanoic, octanoic and decanoic acids are the main acids in all samples.

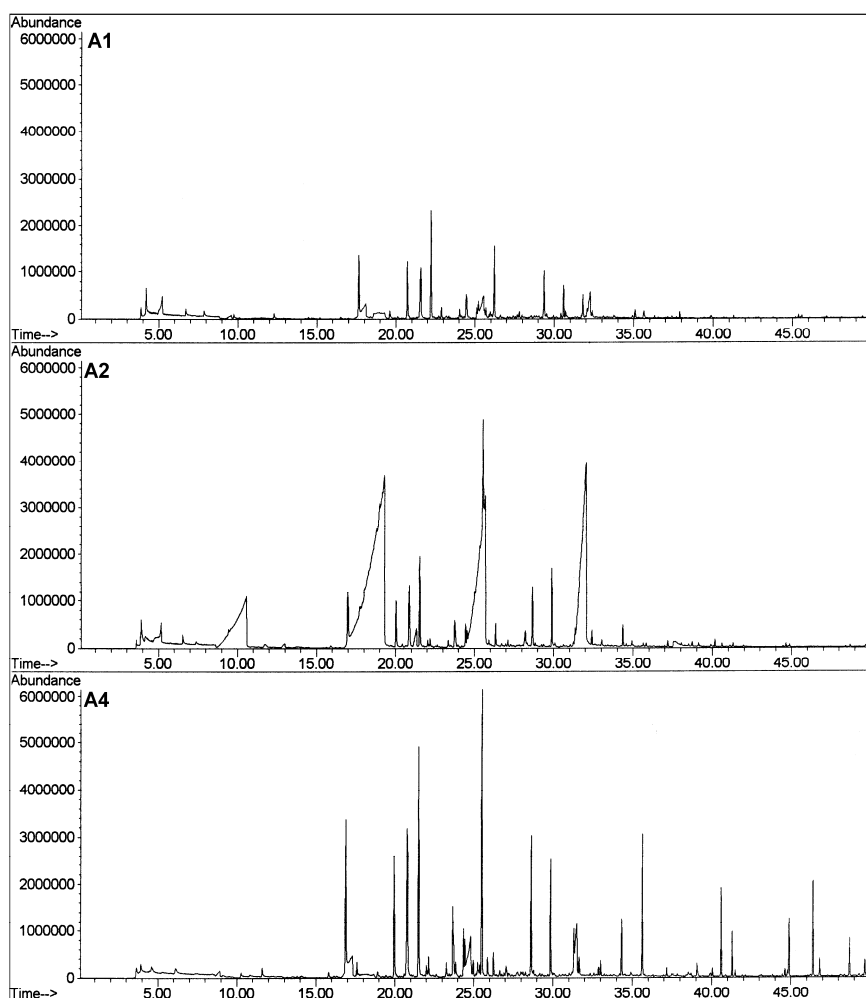


Figure 2.- Total ion current chromatogram of the components of the headspace of the exterior region of A1, A2 and A4 cheese samples.

Table 2.- Average concentrations, Ca, of some components coming from the smoke, in the headspace of the exterior cheese region, calculated from data of A1, A2, A3, A5, and A6 samples, given in area counts of base peak ions (I_{BP}) multiplied by 10^{-5} , together with the average deviations, Da.

RT	Compound	I_{BP}	Ca	Da
11.84	Furanmethanol	98	9.0	± 3.4
18.84	Cyclotene	112	4.3	± 2.0
16.95	Phenol	94	183.3	± 71.5
19.98	2-Methylphenol	108	73.9	± 27.7
20.81	4-Methylphenol and 3-Methylphenol	107	147.1	± 52.9
22.15	2,6-Dimethylphenol	122	9.9	± 3.8
23.28	2-Ethylphenol	107	15.5	± 6.5
23.68	2,4-Dimethylphenol and 2,5-Dimethylphenol	107	53.2	± 16.3
24.86	2,3-Dimethylphenol	107	8.5	± 3.1
25.87	Trimethylphenol (isomer)	121	4.3	± 1.0
25.87	Propylphenol (isomer)	107	1.9	± 0.8
21.49	2-Methoxyphenol (guaiacol)	109	164.1	± 73.7
25.50	4-Methyl-2-methoxyphenol (4-methylguaiacol)	138	144.1	± 56.4
28.62	4-Ethyl-2-methoxyphenol (4-ethylguaiacol)	137	131.3	± 39.2
29.82	4-Vinyl-2-methoxyphenol (4-vinylguaiacol)	150	80.8	± 39.4
31.31	4-(2-Propenyl)-2-methoxyphenol (eugenol)	164	13.6	± 5.0
31.68	4-Propyl-2-methoxyphenol (4-propylguaiacol)	137	18.9	± 4.7
32.98	4-(1-Propenyl)-2-methoxyphenol (isoeugenol)	164	6.6	± 2.5
34.30	4-(1-Propenyl)-2-methoxyphenol (isoeugenol isomer)	164	25.8	± 11.1
25.29	Naphthalene	128	15.4	± 8.4

Table 3.- Average concentrations, Ca, of the acids in the headspace of the exterior cheese region, calculated from data of A1, A3, A4, A5, and A6 samples, given in area counts of base peak ions (I_{BP}) multiplied by 10^{-5} , together with the average deviations, Da.

RT	Compound	I_{BP}	Ca	Da
9.45	Butiric acid	60	27.5	± 16.9
12.99	Pentanoic acid	60	1.2	± 0.7
17.77	Hexanoic acid	60	132.6	± 67.5
21.34	Heptanoic acid	60	4.7	± 1.4
22.65	2-Ethylhexanoic acid	73	1.7	± 1.5
25.35	Octanoic acid	60	100.4	± 37.6
28.22	Nonanoic acid	60	3.4	± 1.1
32.04	Decanoic acid	60	94.3	± 32.7
34.76	Undecanoic acid	60	1.7	± 1.5
37.86	Dodecanoic acid	73	5.9	± 3.4
43.48	Tetradecanoic acid	73	3.5	± 3.5
45.82	Pentadecanoic acid	73	0.6	± 0.0

The relative abundance of the components in relation to the total abundance affords information on the existence or not of a common aromatic profile in the several samples, with different intensity degree which is determined by the absolute abundance of the components. This fact can be arrived at from the percentages of the headspace components. Table 4 shows the proportions of some of the most significant smoke components in the headspace of these cheese samples in relation to their total abundance; it can be observed that, despite the different smoking intensities, in general all of them contain quite similar proportions of these smoke components, showing that the smoking process is fairly homogeneous because it provides almost constant proportions of the different smoke components, with differences only in its intensity as the absolute abundances indicate. Table 5 shows the proportions of some of the main acids in the headspace of the cheese samples in relation to their total abundance. It can be observed that

Table 4.- Abundance of some smoke components in the headspace of the exterior region of the different cheese samples expressed as percentage in relation to the total abundance of them.

RT	Compound	Ion	A1	A2	A3	A4	A5	A6
11.84	Furanmethanol	98	0.9	0.9	0.5	0.5	0.7	1.1
18.84	Cyclotene	112	0.6	0.3	0.3	0.4	0.3	0.4
16.95	Phenol	94	19.5	17.9	14.9	16.7	12.7	16.9
19.98	2-Methylphenol	108	8.2	6.7	7.8	6.3	5.1	5.5
20.81	4-Methylphenol and 3-Methylphenol	107	13.8	13.7	13.6	15.0	11.9	13.8
22.15	2,6-Dimethylphenol	122	1.1	0.9	1.1	0.8	0.7	0.6
23.28	2-Ethylphenol	107	2.0	1.3	1.7	1.1	0.9	1.1
23.28	2,4-Dimethylphenol and 2,5-Dimethylphenol	107	5.7	4.6	6.6	4.8	3.5	4.6
23.68	2,3-Dimethylphenol	107	1.1	0.6	1.1	0.6	0.5	0.7
25.50	Trimethylphenol (or isomer)	121	0.4	0.4	0.6	0.4	0.3	0.4
25.87	Propylphenol (or isomer)	107	0.3	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2
21.49	2-Methoxyphenol (guaiacol)	109	16.6	13.6	12.0	15.0	16.0	12.4
25.29	4-Methyl-2-methoxyphenol (4-methylguaiacol)	138	8.9	12.1	12.6	15.4	17.2	14.5
28.28	4-Ethyl-2-methoxyphenol (4-ethylguaiacol)	137	10.4	10.4	14.7	10.9	12.7	13.2
28.78	4-Vinyl-2-methoxyphenol (4-vinylguaiacol)	150	5.8	9.2	5.1	5.9	8.4	5.5
29.19	4-(2-Propenyl)-2-methoxyphenol (eugenol)	164	0.8	1.2	1.2	1.2	1.6	1.7
29.32	4-Propyl-2-methoxyphenol (4-propylguaiacol)	137	1.5	1.4	2.2	1.5	1.7	2.2
31.31	4-(1-Propenyl)-2-methoxyphenol (isoeugenol)	164	0.4	0.5	0.6	0.6	0.8	0.7
31.68	4-(1-Propenyl)-2-methoxyphenol (isoeugenol isomer)	164	1.4	2.2	2.3	2.4	3.2	2.5
24.86	Naphthalene	128	0.6	1.9	0.9	0.5	1.7	1.9

Table 5.- Abundance of some main acids in the headspace of the exterior region of the different cheese samples A1, A2, A3, A4, A5 and A6, expressed as percentage in relation to the total acids abundance.

RT	Compound	I _{BP}	A1	A2	A3	A4	A5	A6
9.45	Butiric acid	60	3.9	17.7	9.3	9.3	3.9	10.9
12.99	Hexanoic acid	60	32.2	55.2	40.7	41.9	26.5	26.8
21.34	2-Ethylhexanoic acid	73	1.6	0.0	0.1	0.0	0.3	0.3
22.65	Octanoic acid	60	28.7	17.4	24.1	27.7	26.0	33.2
25.35	Nonanoic acid	60	1.2	0.3	0.8	0.8	0.7	1.5
28.22	Decanoic acid	60	30.7	9.2	22.7	19.4	35.5	25.7
37.86	Dodecanoic acid	73	1.2	0.2	1.7	0.6	3.8	1.4
43.48	Tetradecanoic acid	73	0.4	0.0	0.5	0.3	3.2	0,3

the proportions of acids is not as homogeneous as the proportion of smoke components in the different samples. This can be due to the lypolysis process was affected by different factors in the manufacture of these cheese samples, providing differences not only in the absolute but also in the relative abundance of acids.

This cheese was smoked with pine needles and it may be thought that its headspace composition is affected by the composition of the vegetable matter used. It is known that the proportions of the different phenolic derivatives in smoke are clearly dependent on the lignin composition, which differs from one wood to another; for this reason the ratio between abundances of some important phenolic derivatives, or other smoke components indicated in Table 1, may be considered of interest as indicators or markers of the vegetable matter used in the smoking process.

4. CONCLUSIONS

In conclusion, in the headspace of this cheese more than 320 components have been detected, covering a broad range of volatility, molecular weight and nature. Among them there are acids, alcohols, esters, hydrocarbons, aldehydes, ketones, furan and pyran derivatives, terpenes and sesquiterpenes, nitrogen derivatives, phenol, guaiacol and

syringol derivatives, ethers, and others. As could be expected, the richest region in components is the exterior region in which are present not only the typical cheese components but also a great number of components coming from the leaves pine smoke. It is characteristic of this goat cheese that its main branched acid is 2-ethylhexanoic acid. The components coming from the smoke play an important role in the flavour of this cheese, and in spite of the variability found in the smoking intensity degree in the different cheeses, all of them show fairly constant values in terms of relative abundance of phenolic derivatives, which are the main smoke components detected. These relative abundances together with other smoke components could be of interest as markers of this fresh goat cheese smoked with pine needles.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been supported by the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología and Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCYT, AGL2000-1696 and CAL00-054-C3-2) the Universidad del País Vasco (9/UPV 00101.125.13667/2003). G. Palencia thanks the Universidad del País Vasco for a predoctoral fellowships. The authors thanks the collaboration of the Palmero Artisans and of the Consejo Regulador of the Origin Denomination.

REFERENCES

- Adamopoulos, K. G., A. M. Goula, and H. J. Petropakis. 2001. Quality Control During Processing of Feta Cheese-NIR Application. *J. Food Comp. Anal.* 14(4): 431-440.
- Banks, J. M., E. Y. Brechany, W. W. Christie, E. A. Hunter, and D. D. Muir. 1992. Volatile components in steam distillates of Cheddar cheese as indicator indexes of cheese maturity, flavor and odor. *Food Res. In.* 25(5): 365-373.
- Barbieri, G., L. Bolzoni, M. Careri, A. Mangia, G. Parolari, S. Spagnoli, and R. Virgili. 1994. Study of the Volatile Fraction of Parmesan Cheese. *J. Agric. Food Chem.* 42(5): 1170-1176.
- Bosset, J. O., and R. Gauch. 1993. Comparison of the volatile flavor compounds of six European AOC cheeses by using a new dynamic headspace GC-MS method. *Int. Dairy J.* 3(4-6): 359-377.
- Bosset, J. O., U. Buetikofer, R. Gauch, and R. Sieber. 1994. Occurrence of terpenes and aliphatic hydrocarbons in Swiss Gruyere and Etivaz alpine cheese using dynamic headspace GC-MS analysis of their volatile flavour compounds. *Schweizerische Milchwirt. Forsch.* 23(2): 37-42.
- Bosset, J. O., U. Butikofer, T. Berger, and R. Gauch. 1997. Study of the volatile compounds of the Vacherin Fribourgeois and (Swiss) Vacherin Mont-d'Or cheese varieties. *Mitt. Gebiete Lebensn. Hyg.* 88(3): 233-258.
- Careri, M., P. Manini, S. Spagnoli, G. Barbieri, and L. Bolzoni. 1994. Simultaneous distillation-extraction and dynamic headspace methods in the gas chromatographic analysis of Parmesan cheese volatiles. *Chromatographia.* 38(5-6): 386-394.

Chin, H. W., R. A. Bernhard, and M. Rosenberg. 1996. Solid Phase Microextraction for cheese volatile compound analysis. *J. Food Sci.* 61(6): 1118-1122, 1128.

Dirinck, P., and A. De Winne. 1999. Flavor characterisation and classification of cheeses by gas chromatographic-mass spectrometric profiling. *J. Chromatogr. A.* 847(1/2): 203-208.

Dufour, J. P., P. Delbecq, and L. Perez. 2001. Solid-Phase Microextraction combined with Gas Chromatography-Olfactometry for analysis of cheese aroma. *ACS Symposium Series, 782 (Gas Chromatography-Olfactometry)*. 123-137.

Dumont, J. P., J. Adda, and P. Rousseaux. 1981. Example of flavor variation within the same type of cheese: Gruyere de Comte. *Lebensm. Wiss. Tech.* 14(4): 198-202.

Gao, S., D. H. Oh, J. R. Broadbent, M. E. Johnson, B. C. Weimer, and J. L. Steele. 1997. Aromatic amino acid catabolism by lactococci. *Lait.* 77(3): 371-381.

Guichard, E., J. L. Berdague, and R. Grappin. 1987. Ripening and quality of Gruyere of Comte cheese. Change in the amounts of volatile compounds in relation to season of manufacture and ripening conditions. *Lait.* 67(3): 319-337.

Guillén, M. D., and B. Abascal. 2002. Study of the volatile fraction of cheese smoked by means of smoke flavourings, using solid phase microextraction followed by GC/MS. *10^{as} Jornadas de Análisis Instrumental*. Barcelona. 78.

Guillén, M. D., and M. C. Errecalde. 2002. Volatile components of raw and smoked black bream (*Brama raii*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) studied by means of solid phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *J. Sci. Food Agric.* 82(9): 945-952.

Guillén, M. D., and M. J. Manzanos. 1999. Extractable components of the aerial parts of *Salvia lavandulifolia* and the composition of the liquid smoke flavoring obtained from them. *J. Agric. Food Chem.* 47(8): 3016-3027.

Guillén, M. D., and M. L. Ibargoitia. 1996. Aqueous liquid smoke flavoring preparations from vine shoots and beech wood. *J. Sci. Food Agric.* 72(1): 104-110.

Guillén, M. D., and M. L. Ibargoitia. 1998. New Components with Potential Antioxidant and Organoleptic Properties, Detected for the First Time in Liquid Smoke Flavoring Preparations. *J. Agric. Food Chem.* 46(4): 1276-1285.

Guillén, M. D., M. J. Manzanos, and L. Zabala. 1995. Study of a commercial liquid smoke flavouring by means of GC/MS and FTIR. *J. Agric. Food Chem.* 43(2): 463-468.

Guillén, M. D., M. J. Manzanos, and M. L. Ibargoitia. 2001. Carbohydrate and nitrogenated compounds in liquid smoke flavorings. *J. Agric. Food Chem.* 49(5): 463-468.

Jaillais, B., V. Bertrand, and J. Auger. 1999. Cryo-trapping/ SPME/ GC analysis of cheese aroma. *Talanta.* 48(4): 747-753.

Kemmer, H., M. Dehnhard, and R. Claus. 1997. Screening of indoles in cheese. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A.* 205(6): 433-436.

Kim, K., T. Kurata, and M. Fujimaki. 1974. Smoke flavor. II. Identification of flavor constituents in carbonyl, noncarbonyl neutral, and basic fractions of aqueous smoke condensates. *Agric. Biol. Chem.* 38(1): 53-63.

Kubícková, J., and W. Grosch. 1997. Evaluation of potent odorants of Camembert cheese by dilution and concentration techniques. *Int. Dairy J.* 7(1): 65-70.

Lapp, M. S., and R. E. Von. 1982. Chemosystematic studies in the genus *Pinus*. IV. Leaf oil composition and geographic variation in jack pine of eastern North America. *Can. J. Bot.* 60(12): 2762-2769.

Larrayoz, P., M. Addis, R. Gauch, and J. O. Bosset. 2001. Comparison of dynamic headspace and simultaneous distillation extraction techniques used for the analysis of the volatile components in three European PDO ewes' milk cheeses. *Int. Dairy J.* 11(11-12): 911-926.

Larsen, T. O. 1999. Volatile flavor production by *Penicillium caseifulvum*. *Int. Dairy J.* 8(10-11): 883-887.

Lecanu, L., V. Ducruet, C. Jouquand, J. J. Gratadoux, and A. Feigenbaum. 2002. Optimization of headspace solid-phase Microextraction (SPME) for the odor analysis of surface-ripened cheese. *J. Agric. Food Chem.* 50(13): 3810-3807.

Lee, J. H., R. Diono, G. Y. Kim, and D. B. Min. 2003. Optimization of Solid Phase Microextraction Analysis for the Headspace Volatile Compounds of Parmesan Cheese. *J. Agric. Food Chem.* 51(5): 1136-1140.

Liebich, H. M., D. R. Douglas, E. Bayer, and A. Zlatkis. 1970a. Volatile flavor components of Cheddar cheese. *J. Chromatogr. Sci.* 8(6): 355-359.

Liebich, H. M., D. R. Douglas, E. Bayer, and A. Zlatkis. 1970b. Volatile flavour components of Cheddar cheese. *Advan. Chromatogr., Proc. Int. Symp., 6th*, 219-225. Publisher: University of Houston, Houston, Texas.

Maga, J. A. 1988. *Smoke in Food Processing*, CRC Press, Boca Ratón. Florida. USA.

Marculescu, A., and M. Gleizes. 2002. Composition of volatile substances in conifer species from the montane zone. 3. Pine (*Pinus silvestris* L.) leaves. *Rev. Chi.* 53(2): 185-189.

- Martelli, A. 1989. Volatile components of Gorgonzola cheese flavor. *La Rivista della Societa Italiana di Scienza dell'Alimentazione*. 18(4): 251-262.
- Martinez-Castro, I., J. Sanz, L. Amigo, M. Ramos, and P. Martin-Alvarez. 1991. Volatile componentes of Manchego cheese. *J. Dairy Res.* 58(2): 239-246.
- Moio, L., and F. Addeo. 1998. Grana Padano cheese aroma. *J. Dairy Res.* 65(2): 317-333.
- Moio, L., J. Dekimpe, P. X. Etievant, and F. Addeo. 1993. Volatile flavor compounds of water buffalo Mozzarella cheese. *Ital. J. Food Sci.* 5(1): 57-68.
- Moio, L., P. Piombino, and F. Addeo. 2000. Odour-impact compounds of Gorgonzola cheese. *J. Dairy Res.* 67(2): 273-285.
- Molimard, P., and H. E. Spinnler. 1996. Review: Compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheeses: origins and properties. *J. Dairy Sci.* 79(2): 169-184.
- Muir, D. D., E. A. Hunter, and J. M. Banks. 1997. Aroma of cheese. Part 2. Contribution of aroma to the flavor of Cheddar cheese. *Milchwissenschaft.* 52(2): 85-88.
- Orden de 31 de agosto de 2001 por la que se ratifica el Reglamento de la Denominación de Origen "Queso Palmero" y de su Consejo Regulador. B.O.E. num. 218: 11/9/01: 34210-34217.
- Overstrom, H., J. Reigo, and S. Borgstrom. 1972. Preliminary study concerning formation of benzoic acid in cheese. *Milchwissenschaft.* 27(11): 705-708.
- Papadopoulou, K., and P. Koukos. 1996. Variation of the essential oils of the leaves, twigs and cones of Balkan pine (*Pinus peuce Grisebach*) grown in Greece. *J. Essent. Oil Res.* 8(5): 499-502.

Parliment, T. H., M. G. Kolor, and D. J. Rizzo. 1982. Volatile components of Limburger cheese. *J. Agric. Food Chem.* 30(6): 1006-1008.

Rychlik, M., and J. O. Bosset. 2001. Flavour and off-flavour compounds of Swiss Gruyere cheese. Evaluation of potent odorants. *Int. Dairy J.* 11(11-12): 895-901.

Sabio, E., and M. C. Vidal-Aragón. 1996. Análisis of the volatile fraction of Ibores cheese. *Alimentaria.* 278: 101-103.

Salles, C., N. Sommerer, C. Septier, S. Issanchou, C. Chabanet, A. Garem, and J. L. Le Quere. 2002. Goat cheese flavor: Sensory evaluation of branched-chain fatty acids and small peptides. *J. Food Sci.* 67(2): 835-841.

Sieber, R., U. Buetikofer, and J. O. Bosset. 1995. Benzoic acid as a natural compound in cultured dairy products and cheese. *J. Reprod. Med.* 40(4): 227-246.

Sloot, D., and P. D. Harkes. 1975. Volatile trace components in Gouda cheese. *J. Agric. Food Chem.* 23(2): 356-357.

Sorensen, J., and C. Benfeldt. 2001. Comparison of ripening characteristics of Danbo cheeses from two dairies. *Int. Dairy J.* 11(4-7): 355-362.

Sunesen, L. O., P. Lund, J. Sorensen, and G. Holmer. 2002. Development of volatile compounds in processed cheese during storage. *Lebensm. Wiss. Tech.* 35(2):128-134.

Tavaria, F. K., S. Dahl, F. J. Carballo, and F. X. Malcata. 2002. Aminoacid catabolism and generation of volatiles by lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 85(10): 2462-2470.

Thierry, A., M. B. Maillard, and J. L. Le Quéré. 1999. Dynamic headspace analysis of Emmental aqueous phase as a method to quantify changes in volatile flavour compounds during ripening. *Int. Dairy J.* 9(7): 453-463.

Valero, E., J. Sanz, and I. Martinez-Castro. 2001. Direct thermal desorption in the analysis of cheese volatiles by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry: comparison with simultaneous distillation-extraction and dynamic headspace. *J. Chromatogr. Sci.* 39(6): 222-228.

Watkins, P. J., Z. Shen, and C. Wijesundera. 2002. Determination of volatile flavour compounds in cheese by SPME and GC/MS. *Aust. J. Dairy Technol.* 57(2): 70.

Manuscrito 2

COMPONENTS DETECTED BY HEADSPACE-SOLID-PHASE MICROEXTRACTION IN THE ARTISANAL FRESH GOAT´S CHEESE SMOKED USING DRY PRICKLY PEAR (*OPUNTIA FICUS INDICA*).

María D. Guillén*, María L. Ibargoitia*, Patricia Sopelana*, Gemma Palencia*

*Tecnología de Alimentos, Facultad de Farmacia, Universidad del País Vasco, Paseo de la Universidad 7, 01006, Vitoria, Spain.

Lait, 2004, 84, 385-397.

ABSTRACT

The study of the headspace components of six different samples of hand-made fresh goat cheese smoked with dry prickly pear (*Opuntia ficus indica*) smoke, protected by the Palmero Origin Denomination, has been carried out. These cheeses were manufactured by six different artisans from the Island of Palma. In spite of this cheese not being a ripened cheese, the number of components detected, by means of solid phase microextraction using a polyacrylate fiber followed by gas chromatography/mass spectrometry, was very high. The cheese exterior region was the richest in components because in addition to the characteristic cheese components it also contained all those adsorbed smoke components which had not reacted with the cheese components. The cheese interior region is the poorest in components because only some of the smoke components had diffused towards the interior. Branched acids associated with goats cheese flavour were not detected. In spite of the different smoking degree in the samples studied, homogeneous proportions of the main smoke phenolic derivatives were observed. Likewise, although differences in the absolute concentrations of acids were observed, fairly homogeneous proportions of the main acids were found. The absence of terpenes and sesquiterpenes and the presence of some nitrogen derivatives as well as of syringol derivatives in significant concentrations together with characteristics proportions of phenolic derivatives allow one to distinguish this Palmero cheese from that smoked with pine needles.

Dry prickly pear/ smoked fresh goat cheese/ headspace components/ solid phase microextraction/ gas chromatography-mass spectrometry

1. INTRODUCTION

Organoleptic properties are very important in food acceptance by consumers and especially in many cheeses often considered as delicacies. These properties are due to the food composition, and specifically food aroma is mostly determined by its headspace composition. For this reason the components of the headspace of many cheeses have been profusely studied using different techniques [1, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 25, 28]. However in spite of the existence of many studies on those components responsible for the flavour of cheeses of very different origin and characteristics, the study of the headspace components of smoked cheeses has been rarely undertaken [2, 5, 16], and the same can be said of fresh goats cheese [6, 7, 9, 23, 27, 30].

In this paper the study of the volatile and less volatile components of the headspace of the fresh smoked artisan goat cheese protected by the Palmero Origin Denomination is carried out. The cheese studied was smoked exclusively with dry prickly pear (*Opuntia ficus indica*) smoke, although other vegetable matters such as almond shells (*Prunus dulcis*), and the wood or needles of canary pine (*Pinus canariensis*) can be used. These cheeses are manufactured, using milk from Palmera goats, by the milk producers themselves, only on the Island of Palma (The Canary Islands), following traditional methods passed down from generation to generation.

The study was accomplished by means of the extraction of the static headspace components using solid phase microextraction (SPME) followed by gas chromatography/mass spectrometry. The aim of this study is to establish the components of the headspace of this cheese, and to know the diffusion degree of the smoke components across the cheese matrix.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Samples.

Artisan Palmero cheeses, manufactured from fresh untreated milk, by six different artisans of the Palma Island, named T1, T2, T3, T4, T5 and T6, were studied. All of them were smoked using dry prickly pear. The manufacture was carried out following the traditional methods [8]. From each cheese three different parts were studied separately: the interior of the cheese; the exterior region; and a thin cross-section representative of the entire cheese, containing exterior and interior parts. The samples were chopped, and approximately 1 g of the chopped sample was weighed into a 4 mL amber vial Screw Top (acquired from Supelco, Bellefonte, PA, USA), sealed with a hole cap PTFE/silicone septum, and stored frozen until study. The day before the study each sample was transferred to the refrigerator for thawing.

2.2. Generation of the headspace and extraction of its components by SPME.

Vials containing 1 g of the cheese sample were introduced into a water bath maintained at 50 °C. After a period of sample equilibration (15 min) the fiber was inserted into the headspace of the sample and was maintained for 60 min. The fiber used was a fiber of Polyacrylate (85 µm film thickness), acquired from Supelco. Previous experiments [11] carried out in our laboratory on the study of the headspace components of other smoked foods using fibers of carboxen/polydimethylsiloxane, polydimethylsiloxane (100 µm film thickness) and polyacrylate (85 µm film thickness) have shown that: carboxen/polydimethylsiloxane fiber basically retained the most volatile components of the headspace, in very high proportions; however polyacrylate fiber retained components of a broader volatility range; and

polydimethylsiloxane fiber had less retention ability of smoke components than polyacrylate fiber.

2.3. Gas chromatography/mass spectrometry study.

Fibers with the adsorbed compounds were injected into a Hewlett-Packard gas chromatograph model HP 6890 Series II, equipped with a mass selective detector 5973 and a Hewlett-Packard Vectra XM Series 4 computer operating with the Chemstation program. The column used was a fused-silica capillary column (60 m long x 0.25 mm inner diameter x 0.25 μm film thickness; from Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA), coated with a non-polar stationary phase (HP-5MS, 5% phenyl methyl siloxane). The operation conditions were the following: the oven temperature was set initially at 45 $^{\circ}\text{C}$ (0.50 min hold), increased to 250 $^{\circ}\text{C}$ at 4 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ (20 min hold); the temperatures of the ion source and the quadrupole mass analyzer were kept at 230 and 150 $^{\circ}\text{C}$, respectively; Helium was used as carrier gas at a pressure of 113.76 kPa; injector and detector temperatures were held at 220 and 280 $^{\circ}\text{C}$, respectively; splitless mode was used for injection with a purge time of 5 min. The fiber was maintained in the injection port for 10 min. Mass spectra were recorded at an ionization energy of 70 eV. After the first desorption, the fiber was routinely desorbed for a second time in order to determine if the first process was complete.

The components were identified by their retention times, by their mass spectra, by comparing their mass spectra with those in a commercial library (Wiley 138L, Mass Spectral Database, Wiley 1990) and by using standards. All those compounds included in table I were acquired commercially as pure compounds and used as standard for identification; in addition, 4-ethyl-octanoic acid was also used to

elucidate its presence or absence in the headspace of this cheese. Due to the overlapping of the signal of many compounds, semi quantification was based on arbitrary units of the total current ion or of the base specific peak ion counts divided by 10^5 . Tables II and III give the average abundances (A_a) obtained for some main components, as well as the average relative abundances (A_{ra}) expressed as percentages, together with their deviations and the ion used for the quantification in each case.

Table I. Detected compounds in different cheese regions together with an indication on their concentration*

Nº	RT (min)	Compound (molecular weight)	Exterior	Cross-section	Interior
Acids					
1	5.85	acetic acid (60)	++	++	++
2	9.26	butanoic acid (88)	++	++	++
3	12.65	pentanoic acid (102)	tr	tr	tr
4	17.39	hexanoic acid (116)	+++	+++	+++
5	20.72	heptanoic acid (130)	tr	tr	tr
6	22.48	2-ethyl-hexanoic acid (144)	tr	-	-
7	24.69	benzoic acid (122)	tr	-	-
8	24.88	octanoic acid (144)	+++	+++	+++
9	27.99	nonanoic acid (154)	+	+	tr
10	30.69	4-hydroxy-3-methoxy-benzoic acid (168) (vanillic acid)	tr	-	-
11	31.65	decanoic acid (172)	+++	+++	+++
12	37.54	dodecanoic acid (200)	++	tr	tr
13	43.13	tetradecanoic acid (228)	++	+	-
14	48.27	hexadecanoic acid (256)	+++	tr	-
15	52.34	9-octadecenoic acid (282)	++	-	-
16	52.82	octadecanoic acid (284)	+	tr	-
Alcohols					
17	3.95	ethanol (46)	++	++	++
18	9.78	2,3-butanediol (90)	++	++	++
19	19.29	benzenemethanol (108)	tr	tr	-

Table I (continued).

Nº	RT (min)	Compound (molecular weight)	Exterior	Cross-section	Interior
Esters					
20	10.13	ethyl butanoate (116)	-	tr	-
21	18.38	ethyl hexanoate (144)	-	tr	tr
22	21.69	methyl benzoate (136)	tr	tr	-
23	25.38	ethyl octanoate (172)	-	-	tr
24	32.10	ethyl decanoate (200)	-	tr	tr
25	36.40	methyl dodecanoate (214)	tr	-	-
26	36.42	methyl 4-hydroxy-3-methoxybenzoate (182) (methyl vanillate)	tr	-	-
27	38.62	ethyl dodecanoate (228)	-	tr	tr
28	42.11	methyl tetradecanoate (242)	tr	-	-
29	44.77	ethyl tetradecanoate (256)	-	tr	tr
Aldehydes					
30	16.14	benzaldehyde (106)	tr	tr	tr
31	19.67	benzeneacetaldehyde (120)	tr	tr	tr
32	21.99	nonanal (142)	tr	tr	tr
Ketones					
aliphatic linear and cyclic ketones and diketones					
33	7.28	3-hydroxy-2-butanone (88)	-	-	tr
34	9.25	cyclopentanone (84)	tr	-	-
35	12.27	1-(acetyloxy)-2-propanone (116)	tr	-	-
36	13.10	2-heptanone (114)	tr	-	tr
37	13.31	cyclohexanone (98)	tr	-	-
38	13.88	2-methyl-2-cyclopenten-1-one (96)	tr	tr	-
39	15.00	2,5-hexanedione (114)	tr	-	-
40	16.43	3-methyl-2-cyclopenten-1-one (96)	tr	tr	-
41	17.95	3-methylcyclohexanone (112)	tr	tr	-
42	19.08	3-methyl-1,2-cyclopentanedione (112) (cyclotene)	+	+	tr
43	22.68	3-ethyl-1,2-cyclopentanedione (126) (3-ethylcyclopentenolone)	tr	tr	-
44	29.00	2-undecanone (170)	tr	-	-
45	35.57	2-tridecanone (198)	tr	-	tr
aromatic ketones and related					
46	20.58	1-phenyl-ethanone (120) (acetophenone)	tr	tr	-
47	34.95	2,5-di-tert-butyl-1,4-benzoquinone (220)	tr	-	-
48	35.50	1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-ethanone (166) (acetovanillone)	tr	tr	tr

Table I (continued).

N°	RT (min)	Compound (molecular weight)	Exterior	Cross-section	Interior
Hydrocarbons					
aliphatic hydrocarbons					
49	38.60	hexadecane (226)	tr	-	-
50	41.26	heptadecane (240)	+	-	-
51	44.10	octadecane (254)	tr	-	-
52	49.28	eicosene (282)	tr	-	-
53	65.87	squalene (410)	tr	tr	-
polyaromatic hydrocarbons					
54	25.29	naphthalene (128)	tr	tr	-
55	29.32	2-methylnaphthalene (142)	tr	tr	-
56	29.91	1-methylnaphthalene (142)	tr	-	-
57	34.52	acenaphthylene (152)	tr	-	-
58	44.18	phenanthrene (178)	tr	-	-
Furan, pyran derivatives and others					
59	10.80	2-furancarboxaldehyde (96)	tr	-	-
60	11.84	2-furanmethanol (98) (furfuryl alcohol)	tr	tr	tr
61	14.02	1-(2-furanyl)-ethanona (110) (2-acetylfuran)	tr	tr	tr
62	14.48	2(5H)-furanone (84) (γ -crotonolactone)	tr	tr	tr
63	15.51	5-methyl-2(5H)-furanone (98)	tr	-	-
64	16.27	5-methyl-2-furancarboxaldehyde (110)	tr	-	-
65	19.75	3-methyl-2(5H)-furanone (98)	tr	tr	-
66	22.43	3-hydroxy-2-methyl-4H-pyran-4-one (126) (maltol) +		tr	tr
67	28.86	δ -octalactone (142)	tr	tr	tr
68	34.88	γ -decalactone (170)	-	tr	-
69	35.29	1,6-anhydro- β -D-glucopyranose (162) (levoglucosan)	tr	-	-
70	35.78	δ -decalactone (170)	tr	tr	tr
71	41.09	γ -dodecalactone (198)	tr	tr	tr
72	41.91	δ -dodecalactone (198)	tr	tr	-
Ethers					
73	23.64	1,2-dimethoxybenzene (138)	tr	tr	-
74	24.96	1,4-dimethoxybenzene (138)	tr	tr	-
75	25.22	1,3-dimethoxybenzene (138)	tr	tr	-

Table I (continued).

Nº	RT (min)	Compound (molecular weight)	Exterior	Cross-section	Interior
Phenolic derivatives					
phenol derivatives					
76	16.95	phenol (94)	++	+	tr
77	19.98	2-methylphenol (108)	++	+	-
78	20.81	4-methylphenol (108) and 3-methylphenol (108)	++	+	-
79	22.15	2,6-dimethylphenol (122)	+	tr	-
80	23.28	2-ethylphenol (122)	+	tr	-
81	23.68	2,4-dimethylphenol (122)	+	tr	-
82	23.73	2,5-dimethylphenol (122)	+	tr	-
83	24.27	4-ethylphenol (122)	+	tr	-
84	24.46	3-ethylphenol (122)	+	tr	-
85	30.65	2-(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-phenol (164)	tr	-	-
86	36.11	2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol (206)	tr	-	-
87	36.29	2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-phenol (220) (BHT)	tr	tr	-
diphenol derivatives					
88	23.57	3-methoxy-1,2-benzenediol (140) (3-methoxyprocatechol)	tr	tr	-
89	25.68	1,2-benzenediol (110) (procatechol)	tr	-	-
90	27.90	3-methyl-1,2-benzenediol (124) (3-methylprocatechol)	tr	-	-
methoxyphenol derivatives					
91	21.49	2-methoxyphenol (guaiacol) (124)	+++	++	tr
92	25.50	4-methyl-2-methoxyphenol (138) (4-methylguaiacol)	++	+	tr
93	28.62	4-ethyl-2-methoxyphenol (152) (4-ethylguaiacol)	++	tr	-
94	29.82	4-vinyl-2-methoxyphenol (150) (4-vinylguaiacol)	++	tr	-
95	31.31	4-(2-propenyl)-2-methoxyphenol (164) (eugenol)	+	tr	-
96	32.06	4-propyl-2-methoxyphenol (166) (4-propylguaiacol)	+	tr	-
97	32.74	4-hydroxy-3-methoxy-benzaldehyde (152) (vanillin)	tr	tr	-
98	32.98	4-(1-propenyl)-2-methoxyphenol (164) (isoeugenol)+		tr	-
99	34.30	4-(1-propenyl)-2-methoxyphenol (164) (isoeugenol)+		tr	-
dimethoxyphenol derivatives					
100	31.03	2,6-dimethoxyphenol (154) (syringol)	++	+	-
101	34.17	4-methyl-2,6-dimethoxyphenol (168) (4-methylsyringol)	+	tr	-

Table I (continued).

N°	RT (min)	Compound (molecular weight)	Exterior	Cross-section	Interior
102	38.91	4-(2-propenyl)-2,6-dimethoxyphenol (194)	tr	tr	-

* great number of area counts: +++; medium number of area counts: ++; small number of area counts: +; very low number of area counts: tr; no detected: -. Data in tables II and III give an approximate idea of the signification of these symbols.

Table II. Average abundances, A_a , and average relative abundances, Ar_a of some components coming from the smoke, in the headspace of the exterior cheese region, calculated from data of five (T1, T2, T4, T5, T6) and of six samples respectively, expressed in area counts of the ion used for the quantification (I) multiplied by 10^{-5} , and as percentages respectively, together with their standard deviations, DA_a and DAr_a .

Compounds	I	A_a	DA_a	Ar_a	DAr_a
2-Furanmethanol (furfuryl alcohol)	98	14.6	±4.9	1.8	±1.0
3-Methyl-1,2-cyclopentanedione (cyclotene)	112	6.1	±1.5	0.9	±0.4
3-Hydroxy-2-methyl-4H-pyran-4-one (maltol)	126	4.0	±1.3	0.6	±0.2
Phenol	94	154.0	±61.1	16.9	±4.1
2-Methylphenol	108	48.3	±14.3	5.8	±0.5
4-Methylphenol and 3-Methylphenol	107	100.8	±29.6	11.7	±2.1
2,6-Dimethylphenol	122	5.7	±1.7	0.7	±0.1
2-Ethylphenol	107	5.5	±1.3	0.7	±0.1
2,4-Dimethylphenol and 2,5-Dimethylphenol	107	32.0	±7.9	4.0	±0.4
2,3-Dimethylphenol	107	5.7	±1.3	0.7	±0.1
2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-phenol (BHT)	205	2.7	±1.3	0.3	±0.2
2-Methoxyphenol (guaiacol)	109	113.4	±28.2	13.9	±1.5
4-Methyl-2-methoxyphenol (4-methylguaiacol)	138	78.9	±24.9	9.9	±1.6
4-Ethyl-2-methoxyphenol (4-ethylguaiacol)	137	96.3	±28.5	12.2	±1.4
4-Vinyl-2-methoxyphenol (4-vinylguaiacol)	150	47.3	±21.2	5.6	±1.4
4-(2-Propenyl)-2-methoxyphenol (eugenol)	164	8.3	±3.2	1.1	±0.3
4-Methyl-2,6-dimethoxyphenol (4-methylsyringol)	168	13.9	±2.1	2.2	±1.0
4-Propyl-2-methoxyphenol (4-propylguaiacol)	137	13.1	±4.7	1.7	±0.4
4-(1-Propenyl)-2-methoxyphenol (isoeugenol isomer)	164	16.1	±6.2	2.2	±0.8
4-(1-Propenyl)-2-methoxyphenol (isoeugenol)	164	4.3	±1.7	0.6	±0.2
2,6-Dimethoxyphenol (syringol)	154	38.5	±9.0	5.8	±2.7
4-(2-Propenyl)-2,6-dimethoxyphenol	194	1.0	±0.3	0.2	±0.1
Naphthalene	128	3.9	±1.3	0.4	±0.1
2-Methylnaphthalene	142	0.8	±0.3	0.1	±0.0
Acenaphthylene	152	0.6	±0.4	0.1	±0.0

Table III. Average abundances, A_a , and average relative abundances, Ar_a of the acids in the headspace of the exterior cheese region, calculated from data of four (T2, T3, T5, T6) and of six samples respectively, expressed in area counts of the ion used for the quantification (I) multiplied by 10^{-5} and as percentages respectively, together with their standard deviations, DA_a and DAr_a .

Compounds	I	A_a	DA_a	Ar_a	DAr_a
Pentanoic acid	60	6.1	± 4.7	1.4	± 1.5
Hexanoic acid	60	91.5	± 27.6	37.3	± 9.8
Octanoic acid	60	94.6	± 22.2	30.4	± 4.1
Nonanoic acid	60	2.3	± 0.9	0.6	± 0.3
Decanoic acid	60	89.7	± 19.3	27.7	± 5.9
Dodecanoic acid	73	7.6	± 2.2	2.5	± 1.4

3. RESULTS AND DISCUSSION

The number of detected compounds was very high, more than 330. However table I gives only those compounds, identified by means of standards, found in the headspace of the exterior and/or interior regions of the cheese, as well as in a cross-section which represents the whole cheese sample. These have been grouped according to their nature in acids, alcohols, esters, aldehydes, ketones, hydrocarbons, furan and pyran derivatives, ethers, nitrogen derivatives, phenol, naphthalenol, diphenol, guaiacol and syringol derivatives, and others. The detected compounds showed a broad range of molecular weights and volatilities.

Acids formed the most important group by concentration, making up nineteen components, present in both the exterior and in the interior region. Most were saturated linear acids, ranging between two and eighteen carbon atoms, with an even or uneven number of carbon atoms, the first in higher concentrations than the second; the origin of these acids can be found in the triglyceride hydrolysis, although other

routes are also possible. The importance of hexanoic, octanoic and decanoic acids in the goat cheese flavour has been well known for a long time [3]. Only one branched-chain, 2-ethyl-hexanoic acid, and one unsaturated, 9-octadecenoic acid, were detected. Although 4-methyl- and 4-ethyl-octanoic acids have been considered by different authors as characteristics of goat cheese [16, 31], these acids were not detected in any of these artisan Palmero cheese samples studied.

The number of identified alcohols was low. Linear alcohols were present both in the exterior and in the interior region and may be formed by different processes from lactose, aminoacids, or acids [26].

The ester group contained mainly methyl or ethyl ester derivatives. Most of these components come from reactions between acids and alcohols and some of them have been detected not only in the exterior but also in the interior region. One should note the presence, in the exterior region, of benzoate as well as of vanillate esters, these latter probably derived from the corresponding acid also detected; although compounds of this nature have not been very often detected in cheese, they contribute not only organoleptic [21] but also preserving properties [29]; it should be noted that methyl vanillate has been included in formulations to reproduce blue cheese flavours [24].

A reduced number of aliphatic and aromatic aldehydes were also identified at very low concentrations.

Ketones were very numerous. Some of these, such as 1-(acetyloxy)-2-propanone, the cyclic mono- and di-ketones, and the aromatic ketones are well known smoke components [12]. Most of them were only present in the exterior region, except acetovanillone and cyclotene. The diffusion of these latter towards the interior region could be due to different factors such as: their concentration in the exterior region; size and shape of the compound; or the ability of the compound to establish interactions with the components of the cheese matrix.

In the group of hydrocarbons, aliphatics and aromatics were detected. The main aliphatic hydrocarbon was heptadecane. The origin of the polyaromatic hydrocarbons could be found in the smoke, although those of low molecular weight have also been detected in unsmoked cheese [4, 10, 22]. Most of the detected hydrocarbons were only found in the exterior region.

The furan and pyran derivatives consisted of two different types of components: those coming from the smoke, covering from 2-furancarboxaldehyde to maltol and related, and the group of γ - and δ -lactones coming from the cyclation of hydroxyacids. All these compounds were only detected as trace amounts. Of the components coming from smoke only some, such as 2-furanmethanol, 2-acetylfuran, γ -crotonolactone and maltol, had diffused towards the interior cheese region. Levoglucosan or 1,6-anhydro- β -D-glucopyranose is an anhydrosugar coming from cellulose thermal degradation and is a main smoke component [14]. Lactones were detected mainly in the exterior and only δ -octalactone, δ -decalactone and γ -dodecalactone were detected in the interior region.

The ethers identified were alkyl-aryl ethers and probably come from the smoke being mainly present in the cheese exterior region. It is worth noting that a significant group of nitrogenated compounds, basically nitrile, quinoline and indol derivatives, was detected but were not included in table I because their identification was not based on standard compounds.

The most numerous group of components was that of phenolic derivatives, constituted by phenol, diphenol, methoxyphenol (guaiacol) and dimethoxyphenol (syringol) derivatives. Although some phenol derivatives have been detected in certain unsmoked cheeses, most of these phenolic derivatives come from the smoke. The presence of diphenol derivatives, compounds with well known antioxidant ability, was significant, as was that of syringol and some of its alkyl derivatives. In spite of the high number of phenolic derivatives detected in the exterior region, only phenol, guaiacol and 4-methyl-guaiacol reached the interior region.

Although smoke contained higher proportions of compounds coming from thermal degradation of wood carbohydrates (aldehydes, ketones, anhydrosugars, acids, furan and pyran derivatives) than from wood lignin (phenolic derivatives) [13], in the headspace of all studied cheeses there were higher proportions of phenolic derivatives than of compounds coming from carbohydrates pyrolysis. This fact could be due: to these latter being retained more strongly in cheese matrix than the phenolic derivatives; or to compounds coming from carbohydrate having less affinity to be retained on the fiber than phenolic derivatives; or because they react with

cheese components by reactions similar to Maillard, modifying the texture and the colour of the cheese and disappearing from the system.

The headspace of the cheese exterior region is much richer in components than the headspace interior region. This is because the majority of the smoke components present in the exterior region do not diffuse towards the interior of the cheese and because some important reactions which generate volatile compounds, such as esterification and oxidation processes, are probably favoured in the exterior region. Smoke components identified in the interior region are cyclotene, acetovanillone, 2-furanmethanol, acetylfuran, α -crotonolactone, maltol, phenol, guaiacol and 4-methylguaiacol. Although the contribution of each smoke component has not been determined since the corresponding threshold values are unknown, smoke components are likely to influence cheese flavour and this should be taken into account in particular in the preparation of samples for sensory evaluations.

Figures 1 and 2 show the total current ion chromatograms of the headspace components of the exterior, interior and cross-section of the samples T3 and T4; these cheese samples had the highest concentration in smoke components and in acids, respectively, of all those here studied. It can be observed that in both samples the smoke components concentration diminished from the exterior towards the interior, whereas acids concentration was fairly constant in both cheese regions inside the same sample. So, while in the interior region of both samples (Figs. 1c, 2c), hexanoic, octanoic and decanoic acids predominated, in the exterior region of sample T3 (Fig. 1a) predominated phenolic derivatives, and in the exterior region of sample T4 (Fig.

2a) predominated acids together with phenolic derivatives, showing a great difference in composition between both regions inside the same cheese sample.

As has been commented on before, these six cheese samples were made by artisans, for this reason there was a certain variability among the samples. So, T3 was the cheese sample whose headspace had the highest concentrations in smoke components, and the others T1, T2, T4, T5 and T6, showed lower concentrations of these kinds of components. This variability can be observed in table II, which gives the cheese headspace average abundances (A_a) together with the standard deviations (D_A) of some smoke components in samples T1, T2, T4, T5 and T6. In spite of the different smoking degree undergone by these cheeses, the average relative abundances (Ar_a) of the smoke components of the six samples, expressed as percentages in relation to the total abundance, given in table II, reveal that these cheese show a fairly homogeneous aromatic profile of smoke components, mainly made up of phenol, guaiacol, 4-methyl- and 4-ethyl-guaiacol, syringol, methyl-phenols and vinyl-guaiacol in quite constant proportions.

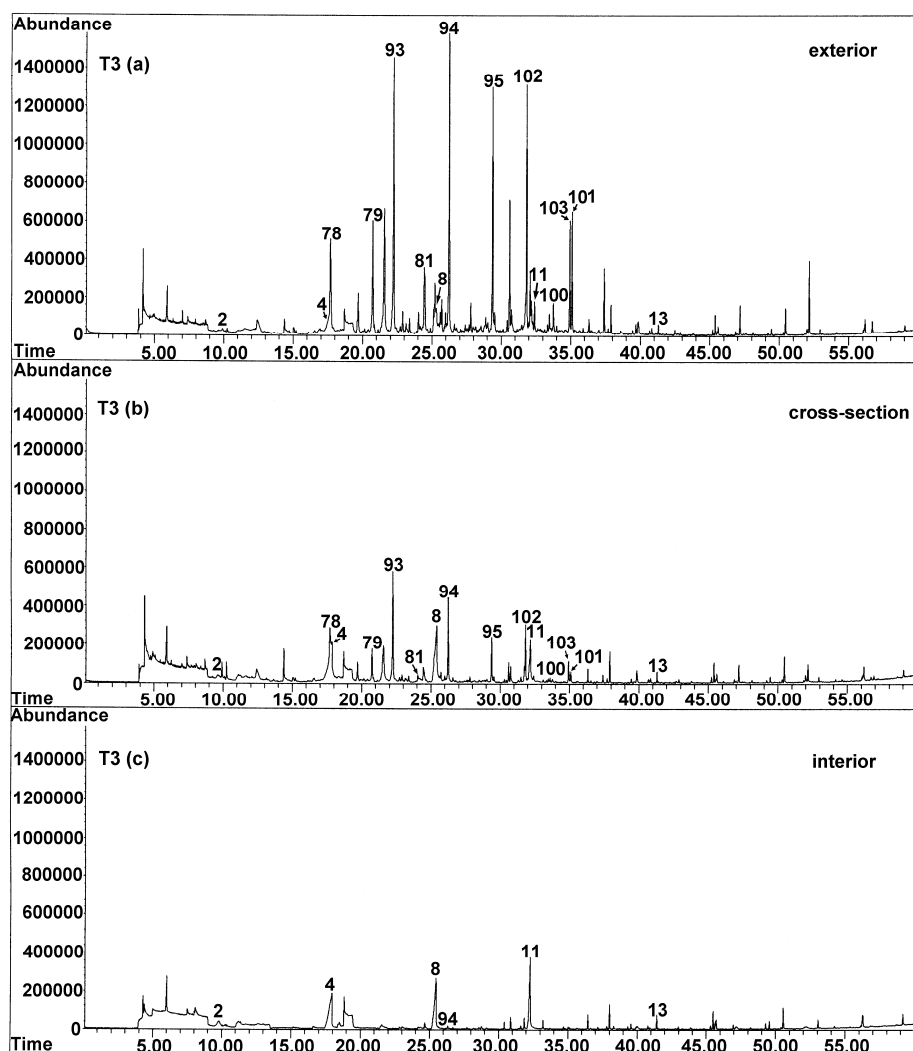


Figure 1.- Total ion current chromatogram of the components of the headspace of the exterior (a), cross-section (b) and interior regions (c) of the T3 cheese sample, which contains the highest concentrations in smoke components. The numbers of the components agree with those in table I.

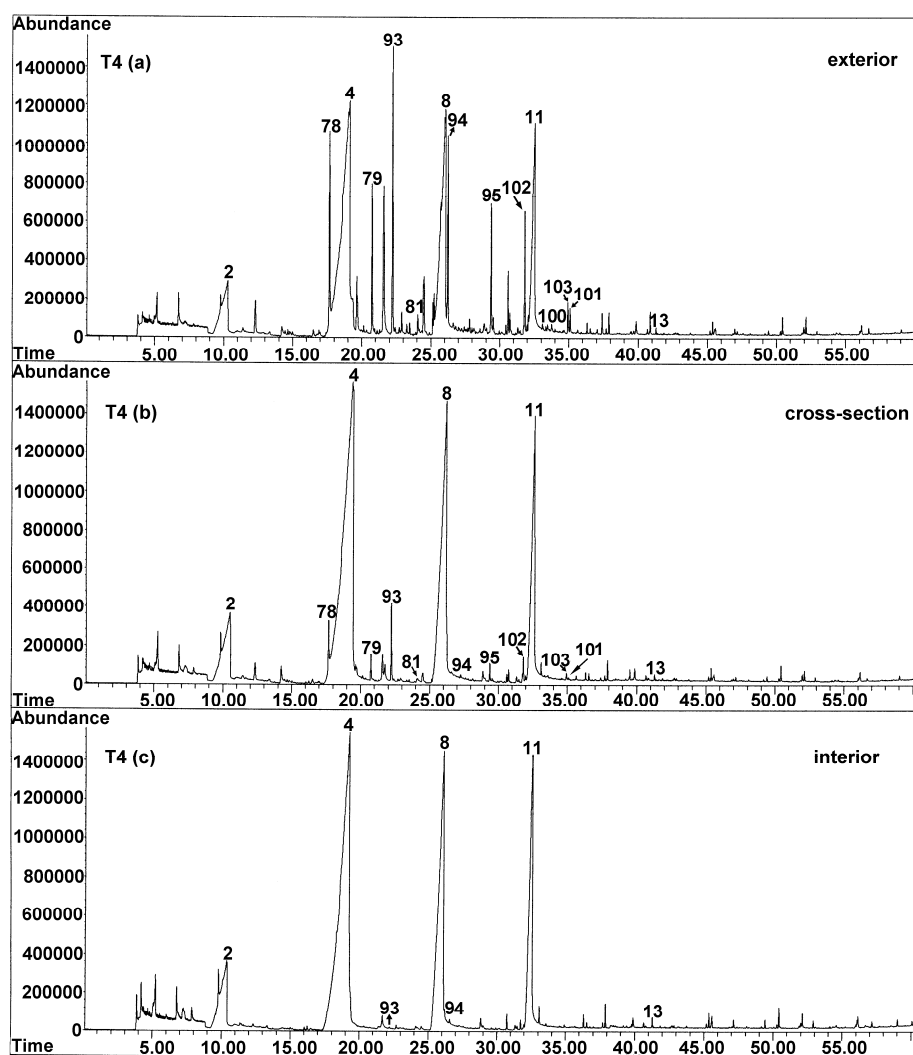


Figure 2.- Total ion current chromatogram of the components of the headspace of the exterior (a), cross-section (b) and interior regions (c) of T4 cheese sample, which contains the highest concentrations in acids. The numbers of the components agree with those in table I.

Likewise differences have been found between samples in relation to acid concentrations. So, in T1 and T4 headspace samples the concentration of acids is

much higher than in the other samples due to an accentuation of the lipolysis process. Table III gives the cheese headspace average abundances (A_a) of the main acids in samples T2, T3, T5 and T6. These data indicate that there is a great variability in the abundance of acids in the different cheeses, probably due to the accentuation of the lipolysis process in the manufacture of some samples. In spite of this, the average relative abundance (Ar_a) of significant acids of the six samples, expressed as percentages in relation to the total abundance, given in table III, reveal that these cheese showed a fairly homogeneous aromatic profile of acids, the main being hexanoic, octanoic and decanoic, in quite constant proportions.

The headspace of Palmero cheeses smoked with dry prickly pear shows some differences in relation with the headspace of Palmero cheeses smoked with pine needles [15]. In general the average concentrations of smoke components in the headspace of all samples of cheese smoked with dry prickly pear, and their standard deviations, were lower than in that of cheese smoked with pine needles; this fact indicates that both the smoking degree reached and the variability among samples is lower in the case of dry prickly pear. As the manufacture and smoking process of this cheese is artisanal both facts mentioned are related with the influence of the vegetable matter on the performance of the pyrolytic process for obtaining smoke with homogeneous composition and concentration. As previously commented there are also differences in relation to the presence or absence of components coming from the smoke. So, the absence of terpene and sesquiterpene compounds in the headspace of cheese smoked with dry prickly pear is noteworthy, as is the presence of biphenol derivatives, as well as a more accentuated presence of nitrogen and

syringol derivatives than in the headspace of cheese smoked with pine leaves. Differences in the headspace of Palmero cheese smoked with dry prickly pear and pine needles can be also found in the proportions of some phenolic derivatives such as 2-methylphenol in relation to phenol, 4-methylguaiacol and 4-ethylguaiacol in relation to guaiacol, and 4-methylsyringol in relation to syringol, due to the differences in the lignin composition of the vegetable matters used for the smoking. In relation with typical headspace cheese components such as acids it can be said that their number, their average concentrations and their standard deviations which represent the variability among samples, are also smaller in cheeses smoked with dry prickly pear than in those smoked with pine leaves.

4. CONCLUSIONS.

In conclusion, in the headspace of this cheese have been identified typical cheese components and typical smoke components. Among the first group of components only some of them are homogeneously distributed in the different cheese regions, the exterior region being generally, richer in components than the interior. Most of the components of the second group are present only in the exterior region, however some of them have diffused towards the interior region. It must be pointed out that although phenolic derivatives are not the main smoke components, nevertheless in the headspace exterior region these compounds were the smoke components detected in the highest proportions. In spite of the differences found in the headspace component concentrations of the exterior region, of the several samples, there is a certain homogeneity shown by similar proportions not only of the smoke components

but also of the main acids. The most significant differences in the headspace composition of Palmero cheese smoked with prickly pear and with pine leaves are that the first contains a higher number of syringol and nitrogenated derivatives than the second, and this latter contains terpene derivatives absent in the first. These differences in composition between Palmero cheese smoked with pine leaves and with dry prickly pear allows one to distinguish between both kinds of cheeses.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been supported by the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología and Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCYT, AGL2003-01838 and CAL00-054-C3-2) the Universidad del País Vasco (9/UPV 00101.125.13667/2001). G. Palencia thanks the Universidad del País Vasco for a predoctoral fellowships. We thank Palmero Artisans and the Consejo Regulador de la Denominacion de Origen Protegida de Queso Palmero for the cheese samples.

REFERENCES

- [1] Bosset J.O., Butikofer U., Gauch R., Sieber R., Occurrence of terpenes and aliphatic hydrocarbons in Swiss Gruyere and Etivaz alpine cheese using dynamic headspace GC-MS analysis of their volatile flavour compounds, *Schweiz. Milchwirt. Forsch.* 23 (1994) 37-42.
- [2] Bosset J.O., Butikofer U., Dafflon O., Koch H., Scheurer-Simonet L., Sieber R., Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in cheese with and without a smoked flavor, *Sci. Aliments* 18 (1998) 347-359.
- [3] Brandsaeter E., Abate V., Flavor compounds in goat milk and goat-whey cheese, *Meldinger Norg. Landbruks.* 38 (1959) 11 pp.
- [4] Careri M., Manini P., Spagnoli S., Barbieri G., Bolzoni L., Simultaneous distillation-extraction and dynamic headspace methods in the gas chromatographic analysis of Parmesan cheese volatiles, *Chromatographia* 38 (1994) 386-394.
- [5] De Frutos M., Sanz J. Martinez-Castro I., Characterization of artisanal cheeses by GC and GC/MS analysis of their medium volatility (SDE) fraction, *J. Agric. Food Chem.* 39 (1991) 524-530.
- [6] Engel E., Nicklaus S., Septier C., Salles C., Le Quéré J.L., Determination of the taste active compounds of a goat cheese water-soluble extract, in: 9th proceedings of the Weurman flavour research symposium, june 22-25, Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Garching, Germany, 1999, pp 84-88.
- [7] Engel E., Nicklaus S., Garem A., Septier C., Salles C., Le Quéré J.L., Taste active compounds in a goat cheese water-soluble extract. 1. Development and

- sensory validation of a model water-soluble extract, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 4252-4259.
- [8] Fresno M., Fernández M., Alvarez S., Darmanin N., Batista P., Pino V., Caracterización del proceso de ahumado del queso Palmero, *Alimentación, Equipos y Tecnología* 173 (2002) 87-92.
- [9] Gaborit P., Menard A., Morgan F., Impact of ripening strains on the typical flavour of goat cheeses, *Int. Dairy J.* 11 (2001) 315-325.
- [10] Guichard E., Berdagué J.L., Grappin R., Ripening and quality of Gruyere of Comte cheese. Change in the amounts of volatile compounds in relation to season of manufacture and ripening conditions, *Lait* 67 (1987) 319-337.
- [11] Guillén M.D., Errecalde M.C., Volatile components of raw and smoked black bream (*Brama raii*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) studied by means of solid phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry, *J. Sci. Food Agric.* 82 (2002) 945-952.
- [12] Guillén M.D., Ibargoitia M.L., Relationships between the maximum temperature reached in the smoke generation processes from *Vitis vinifera* L. shoot sawdust and composition of the aqueous smoke flavoring preparations obtained, *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 1302-1307.
- [13] Guillén M.D., Manzanos M.J., Study of the volatile composition of an aqueous oak smoke preparation, *Food Chem.* 79 (2002) 283-292.
- [14] Guillén M.D., Manzanos M.J., Ibargoitia M.L., Carbohydrate and nitrogenated compounds in liquid smoke flavorings, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 463-468.

- [15] Guillén M.D., Ibargoitia M.L., Sopelana P., Palencia G., Fresno M., Components detected by means of solid phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry in the headspace of artisan fresh goat cheese smoked by traditional methods, *J. Dairy Sci.* 87 (2004) 284-299.
- [16] Ha J.K., Lindsay R.C., Volatile branched-chain fatty acids and phenolic compounds in aged Italian cheese flavours, *J. Food Sci.* 56 (1991) 1241-1247, 1250.
- [17] Izco J.M., Torre P., Characterisation of volatile flavour compounds in Roncal cheese extracted by the “purge and trap” method and analysed by GC-MS, *Food Chem.* 70 (2000) 409-417.
- [18] Jaillais B., Bertrand V., Auger J., Cryo-trapping/ SPME/ GC analysis of cheese aroma, *Talanta* 48 (1999) 747-753.
- [19] Kubíčková J., Grosch W., Evaluation of potent odorants of Camembert cheese by dilution and concentration techniques, *Int. Dairy J.* 7 (1997) 65-70.
- [20] Larráyoz P., Ibañez F.C., Ordoñez A.I., Torre P., Barcina Y., Evaluation of supercritical fluid extraction as sample preparation method for the study of Roncal cheese aroma, *Int. Dairy J.* 10 (2001) 755-759.
- [21] Luebke M., Le Quéré J.L., Barron D., Prefractionation of aroma extracts from fat-containing food by high-performance size-exclusion chromatography, *J. Chromatogr. A.* 729 (1996) 371-379.
- [22] Martínez-Castro I., Sanz J., Amigo L., Ramos M., Martín-Alvarez P., Volatile components of Manchego cheese, *J. Dairy Res.* 58 (1991) 239-246.

- [23] Mehaia M.A., Manufacture of fresh soft white cheese (Domiaty-type) from ultrafiltered goats' milk, *Food Chem.* 79 (2002) 445-452.
- [24] Moinas M., Groux M.J.A., Hormann I., Aroma compositions for imparting a camembert or blue cheese flavor to foods, *Patentschrift (Switz.)*, CH552949, 1974.
- [25] Moio L., Piombino P., Addeo F., Odour-impact compounds of Gorgonzola cheese, *J. Dairy Res.* 67 (2000) 273-285.
- [26] Molimard P., Spinnler H.E., Review: Compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheeses: origins and properties, *J. Dairy Sci.* 79 (1996) 169-184.
- [27] Molina E., Ramos M., Alonso L., Lopez-Fandino R., Contribution of low molecular weight water soluble compounds to the taste of cheeses made of cows', ewes' and goats' milk, *Int. Dairy J.* 9 (1999) 613-621.
- [28] Parliment T.H., Kolor M.G., Rizzo D.J., Volatile components of Limburger cheese, *J. Agric. Food Chem.* 30 (1982) 1006-1008.
- [29] Pearl I.A., McCoy J.F., Vanillic acid esters as food preservatives, *Food Ind.* 17 (1945) 1458-61, 1600, 1602, 1604.
- [30] Salles C., Herve C., Septier C., Demaizieres D., Lesschaeve I., Issanchou S., Le Quéré J.L., Evaluation of taste compounds in water-soluble extract of goat cheese, *Food Chem.* 68 (2000) 429-435.
- [31] Salles C., Sommerer N., Septier C., Issanchou S., Chabanet C., Garem A., Le Quéré J.L., Goat cheese flavor: Sensory evaluation of branched-chain fatty acids and small peptides, *J. Food Sci.* 67 (2002) 835-841.

Manuscrito 3

COMPLEXITY AND UNIQUENESS OF THE AROMATIC PROFILE OF SMOKED AND UNSMOKED HERREÑO CHEESE.

Gemma Palencia*, Maria Luisa Ibargoitia*, Maria Fresno†, Patricia Sopelana* and
María Dolores Guillén*

*Tecnología de Alimentos, Facultad de Farmacia, Universidad del País Vasco, Paseo de la Universidad 7, 01006, Vitoria,
Spain.

†Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, La Laguna, Santa Cruz de Tenerife, Spain.

ABSTRACT: In this work, the volatile fraction of unsmoked and smoked Herreño cheese, a type of soft cheese from the Canary Islands, has been characterized for the first time. In order to evaluate if the position in the smokehouse could influence the volatile profile of the smoked variety, cheeses smoked at two different heights were studied. The volatile components were extracted by Solid Phase Microextraction using a divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane fiber, followed by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. In total, 228 components were detected. The most numerous groups of components in the unsmoked Herreño cheese were hydrocarbons, followed by terpenes and sesquiterpenes, whereas acids and ketones were the most abundant. It is worth noticing the high number of aldehydes and ketones, and the low number of alcohols and esters in this cheese in relation to others, as well as the presence of some specific unsaturated hydrocarbons, terpenes, sesquiterpenes and nitrogenated derivatives. The smoking process enriches the volatile profile of Herreño cheese with ketones and diketones, methyl esters, aliphatic and aromatic aldehydes, hydrocarbons, terpenes, nitrogenated compounds, and especially with ethers and phenolic derivatives. Among these, methyl indanones or certain terpenes like α -terpinolene, have not been detected previously in other types of smoked cheese. Lastly, the results obtained suggest a slightly higher smoking degree in the cheeses smoked at a greater height.

Keywords: smoked and unsmoked Herreño cheese; headspace components; solid phase microextraction; gas chromatography-mass spectrometry.

1. INTRODUCTION

Herreño cheese comes from El Hierro Island, the smallest of the Canary Islands. El Hierro Island has been a territory linked to cattle raising, in which herds were mixed, so its traditional cheese is manufactured with milk from different animal species. Concretely, the Herreño cheese is manufactured with a mixture of pasteurized milk from goat, cow and sheep (the three of Canary breed). This type of cheese occupies an important position in the Canary Islands market for smoked soft cheeses; however, its volatile fraction, known to be important in cheese flavour, has never been studied.

In spite of the great number of studies carried out, the knowledge about volatile cheese components has advanced very slowly. It is well known that the volatile component profile of a cheese sample can appear to be different depending on the technique and methodology used for its study. Some techniques are only able to extract volatile components of low molecular weight, and others are not able to extract components of certain functionality; moreover, there are significant differences in relation to the repeatability of the techniques used [1-3]. This makes difficult to compare the results obtained in different studies and, consequently, to compare the volatile composition of different types of cheese accurately. It should also be mentioned that, among the various techniques used for the study of cheese volatiles, Solid Phase Microextraction (SPME) coupled to Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS) has been increasingly used since its development in the nineties, due to the advantages that this technique offers regarding simplicity and speed of analysis [4, 5]. However, it is worth noticing that the type of fibre used can also lead to differences in the results obtained by SPME, since the different phases exhibit different affinity for the various cheese components, depending on their molecular weight or polarity, as example [4]. This technique has been used by some authors to determine absolute concentrations of free fatty acids in ewe cheese [6] and of a more varied group of components in white surface mould

cheeses [7]. Nevertheless, it is difficult to achieve an exact and reliable quantification when a high number of volatile compounds, belonging to different chemical families, is studied.

In this work, the study of the volatile fraction of unsmoked and smoked Herreño cheese has been carried out by means of SPME followed by GC/MS for the subsequent study of the extracted compounds. The purpose of this work is, on the one hand, to characterize the components of the headspace of unsmoked and smoked Herreño cheese, and, on the other hand, to know the influence of the smoking process on the volatile profile of this type of cheese. This will contribute to define the aromatic profile of this type of cheese and maybe to find specific markers that could be useful to distinguish Herreño cheese from other cheese varieties.

Furthermore, the influence of the cheese position in the smokehouse on the volatile components of the cheese is also subject of attention in this study. Finally, this study will add to knowledge about the volatile fraction of smoked cheeses. This has, to date, been studied very little.

2. RESULTS AND DISCUSSION

2.1. Characterization of the unsmoked and of the smoked Herreño cheese

Figure 1 shows the total ion chromatograms corresponding to the headspace of the exterior region of the unsmoked cheese (U) and of those smoked in both positions A and B, indicated in Figure 2. The numbers of the components agree with those in Tables 1 to 5. This figure shows that the volatile profiles of the smoked cheeses (A and B) were very similar, but clearly different from that of the unsmoked one; this latter was much poorer in volatile compounds.

The compounds identified in the studied Herreño cheeses, grouped in families according to their chemical nature, together with their average area counts, divided by 10^5 , are given in

Tables 1 to 5. Asterisked compounds were identified by comparison with commercial standard compounds. It is worth noticing the high number (228) of components detected, which show a broad range of molecular weights and volatilities.

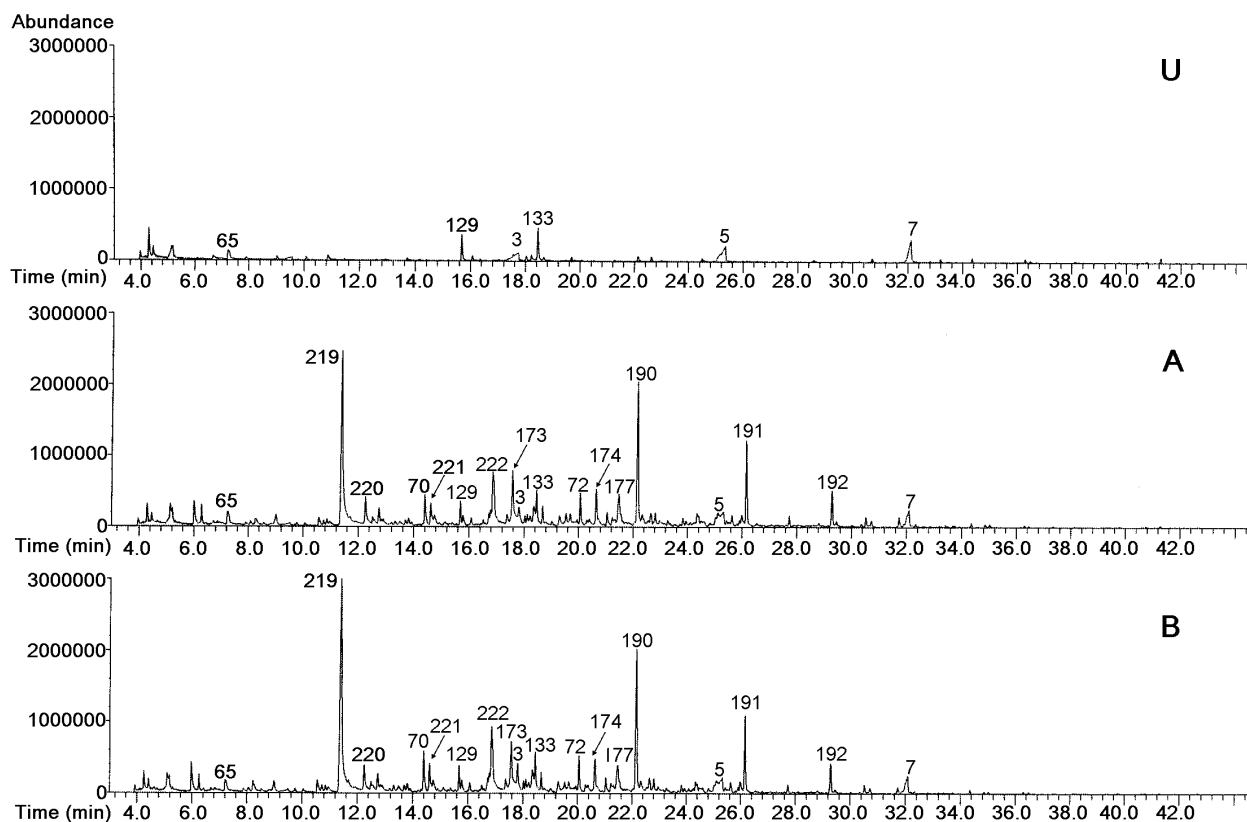


Figure 1. Total ion current chromatogram of the components of the headspace of the unsmoked cheese (U), and of the cheeses smoked in positions A and B.

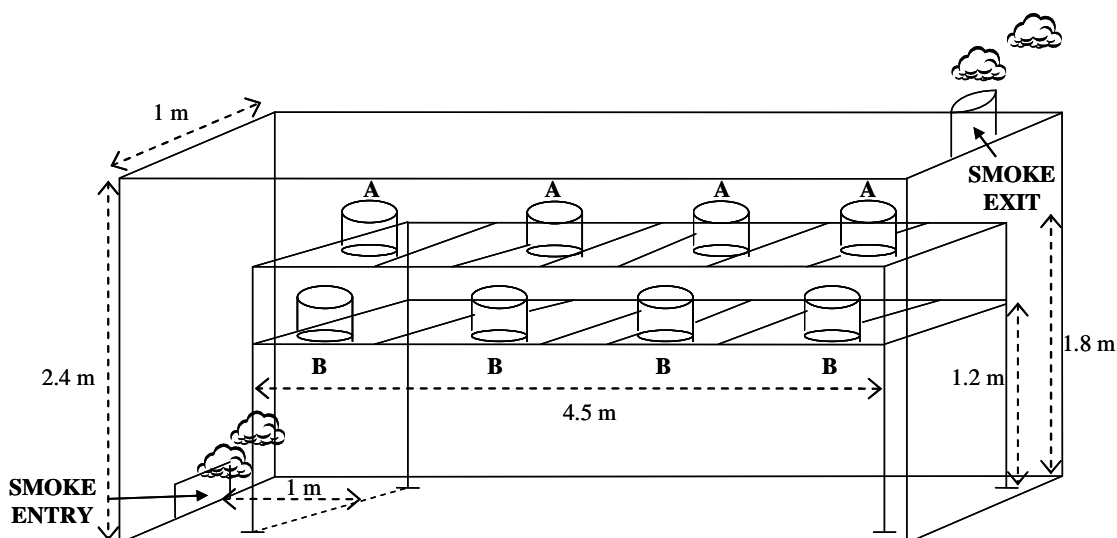


Figure 2. Scheme of the position of the A and B Herreño cheeses in the smokehouse.

Although the number of components in the unsmoked cheese (120) was much lower than in the smoked ones (221), in both cheese varieties the most numerous group was that of hydrocarbons.

Furthermore, in the unsmoked cheese, the groups of compounds having the highest area counts are acids and ketones, followed by alcohols and terpenes and sesquiterpenes; however, in the smoked cheeses, the groups with the highest area counts are by far ethers and phenolic derivatives, followed by ketones and diketones.

2.1.1. Acids, alcohols, esters and lactones

The compounds found of these groups are shown in Table 1. Although acids are common cheese components [8-10], it could be said that Herreño cheese is particularly rich in these components, since they are very numerous and have a high number of area counts. As it is usual, those of even number of carbon atoms, especially hexanoic and octanoic, are in much higher abundance than those of uneven number of carbon atoms [11], both in the unsmoked and in the smoked cheeses.

Table 1. Acids, alcohols, esters and lactones detected in the headspace of the exterior region of unsmoked (U) and smoked (A and B) Herreño cheeses studied, together with their molecular weight, the base peak of their mass spectra (Bp), their abundance, expressed as average area counts of their mass spectra base peak divided by 10^5 , and standard deviation.^a

Nº	Compounds (molecular weight) ^b	Bp	U	A	B
<i>Acids</i>					
<i>Linear</i>					
1	Acetic acid (60)*	43	18.09 ± 8.32 ^a	32.97 ± 7.13 ^a	31.60 ± 4.75 ^a
2	Butanoic acid (88)*	60	25.99 ± 2.82 ^b	14.11 ± 2.56 ^a	15.83 ± 1.22 ^a
3	Hexanoic acid (caproic acid) (116)*	60	56.21 ± 4.80 ^b	35.93 ± 3.88 ^a	41.75 ± 5.36 ^a
4	Heptanoic acid (130)*	60	1.24 ± 0.17 ^a	1.77 ± 0.32 ^a	1.70 ± 0.05 ^a
5	Octanoic acid (caprylic acid) (144)*	60	43.27 ± 0.93 ^a	35.94 ± 4.44 ^a	40.85 ± 4.08 ^a
6	Nonanoic acid (158)*	60	1.30 ± 0.14 ^a	1.09 ± 0.10 ^a	1.03 ± 0.21 ^a
7	Decanoic acid (capric acid) (172)*	60	28.55 ± 3.34 ^b	17.31 ± 2.67 ^a	21.27 ± 3.99 ^{ab}
8	Dodecanoic acid (lauric acid) (200)*	73	0.97 ± 0.07 ^b	0.55 ± 0.22 ^a	0.50 ± 0.01 ^a
9	Hexadecanoic acid (palmitic acid) (256)*	73	-	0.09 ± 0.03 ^a	0.16 ± 0.05 ^a
<i>Branched</i>					
10	2-Ethylhexanoic acid (144)	88	0.52 ± 0.00 ^b	0.35 ± 0.01 ^a	0.31 ± 0.04 ^a
<i>Aromatic</i>					
11	Benzoic acid (122)	105	10.94 ± 0.12 ^b	4.44 ± 1.12 ^a	5.03 ± 1.34 ^a
<i>Alcohols</i>					
<i>Aliphatic</i>					
12	Ethanol (46)*	45	79.86 ± 0.24 ^b	43.52 ± 6.46 ^a	45.12 ± 1.64 ^a
13	3-Methyl-1-butanol (88) (or isomer)	55	2.74 ± 0.55	-	-
14	1-Pentanol (amilol) (86)	42	1.16 ± 0.00	-	-
<i>Aromatic</i>					
15	Benzenemethanol (108)*		-	6.64 ± 0.76 ^a	7.08 ± 1.21 ^a
<i>Esters</i>					
<i>Aliphatic</i>					
16	Methyl acetate (74)	43	-	8.48 ± 0.26 ^a	10.86 ± 0.79 ^b
17	Methyl propenoate (86)	55	-	1.88 ± 0.27 ^a	2.91 ± 0.61 ^a
18	Methyl hydroxyacetate (90)	58	-	2.83 ± 0.41 ^a	1.95 ± 0.33 ^a
19	Methyl-2-butenolate (100)	69	-	3.88 ± 0.02 ^a	3.98 ± 0.84 ^a
20	Ethyl decanoate (200)*	88	0.17 ± 0.01 ^a	0.18 ± 0.01 ^a	0.21 ± 0.03 ^a
21	1-Methylethyl hexadecanoate (298)	43	-	0.27 ± 0.08 ^a	0.25 ± 0.24 ^a
<i>Aromatic</i>					
22	Phenyl acetate (136)	94	-	2.99 ± 0.54 ^a	3.18 ± 0.76 ^a
23	Methyl benzoate (136)	105	0.30 ± 0.02 ^a	5.92 ± 0.62 ^b	6.66 ± 0.89 ^b
24	Methyl 4-methylbenzoate (150)	119	-	1.49 ± 0.34 ^a	1.48 ± 0.11 ^a
<i>Lactones</i>					
<i>γ-Lactones</i>					
25	2(3H)-Dihydrofuranone (γ-butyrolactone) (86)	42	-	5.52 ± 0.64 ^a	5.13 ± 0.67 ^a
26	2(5H)-Furanone (γ-crotonolactone) (84)*	55	-	13.67 ± 1.93 ^a	11.48 ± 1.12 ^a
27	5-Methyl-2(5H)furanone (98)*	55	-	3.80 ± 0.32 ^a	3.74 ± 0.39 ^a
28	3-Methyl-2(5H)furanone (98)*	41	-	8.47 ± 0.66 ^a	8.45 ± 0.55 ^a
29	5-Methyl-5-ethylidihydro-2(3H)-furanone (128)	99	-	2.88 ± 0.42 ^a	2.53 ± 0.11 ^a
30	γ-Dodecalactone (198)*	85	-	0.31 ± 0.02 ^a	0.34 ± 0.06 ^a
<i>δ-Lactones</i>					
31	3,6-Dimethyl-2H-pyran-2-one (124)	68	-	2.06 ± 0.30 ^a	1.83 ± 0.18 ^a
32	3-Hydroxy-2-methyl-4H-pyran-4-one (maltol) (126)*	126	-	3.30 ± 0.67 ^a	2.60 ± 0.46 ^a
33	δ-Octalactone (148)	99	0.62 ± 0.04 ^a	0.67 ± 0.07 ^a	0.83 ± 0.10 ^a
34	δ-Decalactone (170)*	99	1.56 ± 0.09 ^a	1.62 ± 0.13 ^a	1.86 ± 0.06 ^a
35	δ-Dodecalactone (198)*	99	0.49 ± 0.03 ^a	0.50 ± 0.09 ^a	0.52 ± 0.02 ^a

^a Different letters in the same row indicate significant statistical differences (Tukey's Test, $p < 0.05$).

^b Asterisked compounds were identified by means of standard compounds.

The concentration of **acids** differs in the unsmoked and in the smoked cheeses. Thus, except acetic acid, most of them are in higher concentration in the former than in the latter; this indicates that the smoking process enriches the cheese headspace in acetic acid, a well known smoke component, while causing a decrease in most of the rest.

Concerning **alcohols**, it must be pointed out that Herreño cheese is poor in this type of components, above all the smoked one. Thus, among the three primary aliphatic alcohols detected in the unsmoked cheese, only ethanol is present in the smoked cheeses, and in significantly lower abundance than in the former, evidencing the influence of the smoking process on the occurrence of alcohols in this cheese. On the other hand, it should be noticed the presence in the smoked cheeses of benzenemethanol, a well known smoke component [12].

It is also noteworthy that the headspace of unsmoked Herreño cheese is almost free of **esters**, except for a few lactones, which are cyclic esters; this contrasts with that observed in the smoked cheeses, where esters are quite numerous. The esters detected in the smoked Herreño cheese are mainly methyl esters, above all aliphatic but also aromatic, being methyl acetate and methyl benzoate the most abundant within each group, respectively.

The presence of these compounds almost exclusively in the smoked cheeses indicates that their origin is in the smoking process, either as components coming from the smoke [13, 14] or as components resulting from reactions that can take place during this process between alcohols and acids present in cheese.

This latter hypothesis would be in agreement with the lower number and concentrations of alcohols, and also with the decrease in the concentrations of most acids in the headspace of the smoked cheeses in relation to the unsmoked one. As an example, it can be seen in Table 1

that, in the smoked cheeses, the increase in the concentration of methylbenzoate is in line with the decrease in benzoic acid.

Lactones, as commented above, are cyclic esters resulting from hydroxy acids and they can be divided into furanones and pyranones. Furanones (γ -lactones) are only present in the smoked cheeses; however, among the pyranones (δ -lactones), 3,6-dimethyl-2H-pyran-2-one and maltol are also smoke components, whereas δ -octalactone, δ -decalactone and δ -dodecalactone are present both in the smoked and in the unsmoked cheeses in similar concentrations. This seems to be in agreement with previous results since, in smoked Palmero cheese [12,15], these latter lactones were detected both in the exterior and in the interior of the cheeses in similar concentrations, pointing to another origin than smoke.

2.1.2. Aldehydes, ketones and diketones

Aldehydes constitute a very important group of components in both unsmoked and smoked Herreño cheese (see Table 2). Some of these aldehydes are well known smoke components [13] and, consequently, either they are only present in the smoked cheeses or are in these latter in higher proportions. Others, however, have generally similar concentrations in both cheese varieties. In short, as a consequence of the smoking process, the Herreño cheese is enriched greatly with aldehydes coming from the smoke.

Table 2. Aldehydes, ketones and diketones detected in the headspace of the exterior region of unsmoked (U) and smoked (A and B) Herreño cheeses studied, together with their molecular weight, the base peak of their mass spectra (Bp), their abundance, expressed as average area counts of their mass spectra base peak divided by 10^5 , and standard deviation. ^a

Nº	Compounds (molecular weight) ^b	Bp	U	A	B
<i>Aldehydes</i>					
<i>Aliphatic saturated</i>					
36	Pentanal (86)	44	0.69 ± 0.07 ^a	0.48 ± 0.04 ^a	0.54 ± 0.13 ^a
37	Hexanal (100)*	56	2.33 ± 0.18 ^b	1.08 ± 0.14 ^a	1.09 ± 0.13 ^a
38	Heptanal (114)	70	0.17 ± 0.01 ^a	0.26 ± 0.06 ^a	0.24 ± 0.03 ^a
39	Nonanal (142)*	57	2.51 ± 0.25 ^a	2.50 ± 0.29 ^a	3.18 ± 0.19 ^a
40	Decanal (156)	43	0.33 ± 0.04	-	-
41	Dodecanal (miristaldehyde) (184)	57	0.29 ± 0.01 ^a	0.28 ± 0.01 ^a	0.28 ± 0.03 ^a
42	Tridecanal (268)	57	-	0.10 ± 0.01 ^a	0.14 ± 0.06 ^a
43	Tetradecanal (212)	57	0.22 ± 0.01 ^a	0.24 ± 0.04 ^a	0.24 ± 0.05 ^a
<i>Aliphatic unsaturated</i>					
44	2-Butenal (crotonaldehyde) (70)	70	0.41 ± 0.04 ^a	57.18 ± 1.83 ^b	64.60 ± 16.91 ^b
45	2-Methyl-2-butenal (or isomer) (84)	84	-	1.84 ± 0.22 ^a	1.81 ± 0.29 ^a
46	2-Pentenal (84)	55	0.56 ± 0.00 ^a	3.95 ± 0.22 ^b	4.53 ± 1.15 ^b
47	2-Nonenal (140)	41	0.20 ± 0.02	-	-
<i>Aromatic</i>					
48	Benzaldehyde (106)*	105	2.04 ± 0.30 ^a	29.33 ± 3.31 ^b	33.04 ± 5.13 ^b
49	Benzeneacetaldehyde (phenylacetaldehyde) (120)*	91	1.13 ± 0.03 ^a	2.71 ± 0.54 ^b	3.07 ± 0.39 ^b
50	2-Hydroxy-benzaldehyde (salicylaldehyde) (122)	122	-	9.11 ± 1.63 ^a	10.75 ± 2.00 ^a
51	Methylbenzaldehyde (120)	119	-	9.28 ± 1.42 ^a	10.53 ± 1.72 ^a
52	Methylbenzaldehyde (120)	119	-	3.77 ± 0.76 ^a	4.12 ± 0.43 ^a
53	3-Hydroxy-4-methylbenzaldehyde (136)	136	-	3.41 ± 0.64 ^a	3.41 ± 0.55 ^a
54	4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (vanillin) (152)*	152	-	0.92 ± 0.09 ^a	0.82 ± 0.21 ^a
<i>Ketones and diketones</i>					
<i>Ketones</i>					
<i>Aliphatic</i>					
55	2-Propanone (58)*	43	27.89 ± 0.38 ^a	22.92 ± 6.68 ^a	25.49 ± 4.74 ^a
56	2-Butanone (72)*	43	7.28 ± 1.59 ^a	4.05 ± 0.64 ^a	4.91 ± 1.34 ^a
57	2-Pentanone (86)*	43	3.09 ± 0.07 ^a	6.29 ± 0.52 ^b	6.93 ± 1.42 ^b
58	4-Methyl-3-pentanone (100)	57	0.42 ± 0.02 ^a	2.08 ± 0.10 ^b	2.40 ± 0.66 ^b
59	3-Penten-2-ona (84)	69	-	8.97 ± 0.90 ^a	8.86 ± 1.42 ^a
60	2-Heptanone (114)*	43	5.95 ± 0.34 ^a	9.38 ± 0.10 ^b	9.33 ± 1.35 ^b
61	3,3-Dimethyl-2-butanone (100)	57	0.30 ± 0.02 ^a	22.48 ± 1.30 ^b	23.14 ± 3.97 ^b
62	2-Nonanone (142)*	58	3.37 ± 0.05 ^a	7.76 ± 0.61 ^b	7.77 ± 1.37 ^b
63	2-Undecanone (170)	58	0.33 ± 0.03 ^a	0.46 ± 0.03 ^b	0.50 ± 0.06 ^b
<i>Oxygenated aliphatic</i>					
64	1-Hydroxy-2-propanone (74)	43	2.94 ± 0.28 ^a	51.81 ± 7.23 ^b	48.59 ± 2.39 ^b
65	3-Hydroxy-2-butanone (acetoin) (88)*	45	48.84 ± 8.81 ^a	39.80 ± 16.25 ^a	32.64 ± 0.24 ^a
66	1-(Acetyloxy)-2-propanone (116)*	43	0.83 ± 0.05 ^a	59.52 ± 1.33 ^b	59.15 ± 9.49 ^b
<i>Cyclic</i>					
67	Cyclopentanone (84)* ^b	55	0.97 ± 0.02 ^a	4.96 ± 0.84 ^b	6.57 ± 1.00 ^b
68	Cyclohexanone (98)*	55	0.28 ± 0.00 ^a	3.69 ± 0.57 ^b	4.66 ± 0.67 ^b
69	2-Methylcyclopentanone (98)	69	0.14 ± 0.00 ^a	1.58 ± 0.09 ^b	1.47 ± 0.25 ^b
70	3-Methyl-2-cyclopenten-1-one (96)*	96	1.98 ± 0.01 ^a	43.49 ± 7.12 ^b	47.70 ± 6.44 ^b
71	2-Cyclohexen-1-one (96)	68	-	4.90 ± 0.82 ^a	5.31 ± 1.29 ^a
72	Dimethylcyclopent-2-en-1-one (110)	67	0.54 ± 0.01 ^a	6.84 ± 1.28 ^b	8.12 ± 0.93 ^b
73	Dimethylcyclopent-2-en-1-one (110)	95	-	7.57 ± 0.15 ^a	6.78 ± 0.53 ^a
74	2-Methyl-2-cyclopenten-1-one (96)*	96	0.72 ± 0.02 ^a	3.43 ± 0.20 ^b	3.37 ± 0.55 ^b
75	Dimethylcyclopent-2-en-1-one (110)	95	0.45 ± 0.04 ^a	11.94 ± 1.26 ^b	14.64 ± 2.71 ^b
76	3-Methyl-2-cyclohexen-1-one (110)	82	-	3.85 ± 0.45 ^a	4.33 ± 0.67 ^a
77	Trimethyl-2-cyclopenten-1-one (124)	109	-	9.84 ± 0.86 ^a	9.36 ± 1.01 ^a
78	Dimethylcyclopent-2-en-1-one (110)	67	1.22 ± 0.03 ^a	40.61 ± 3.46 ^b	41.45 ± 7.27 ^b

Table 2 (continued)					
79	Trimethyl-2-cyclopenten-1-one (124)	109	0.47 ± 0.01^a	15.75 ± 1.46^b	16.69 ± 2.65^b
<i>Aromatic</i>					
80	1-(Methylphenyl)-ethanone (134) (or isomer)	119	-	4.58 ± 0.46^a	4.23 ± 0.63^a
81	2,3-Dihydro-1H-inden-1-one (indanone) (132)	132	-	6.91 ± 1.25^a	5.34 ± 0.90^a
82	3-Methyl-1-indanone (146)	131	-	2.33 ± 0.27^a	1.77 ± 0.28^a
83	7-Methyl-1-indanone (146)	117	-	1.28 ± 0.16^a	0.98 ± 0.16^a
84	4-Methyl-1-indanone (146)	117	-	0.62 ± 0.12^a	0.50 ± 0.12^a
85	1-(2,6-Dihydroxy-4-methoxyphenyl)-ethanone (acetovanillona) (182)*	167	-	1.69 ± 0.33^a	1.17 ± 0.21^a
<i>Diketones</i>					
<i>Linear</i>					
86	2,3-Butanedione (diacetyl) (86)*	43	7.70 ± 4.19^a	6.19 ± 0.75^a	7.91 ± 0.94^a
87	2,3-Pentanedione (100)	43	-	4.53 ± 0.27^a	5.13 ± 1.04^a
88	2,5-Hexanedione (114)*	43	-	6.16 ± 0.36^a	6.32 ± 1.36^a
<i>Cyclic</i>					
89	Cyclopent-2-en-1,4-dione (96)	96	-	20.43 ± 3.14^a	23.86 ± 3.27^a
90	3-Methyl-1,2-cyclopentanedione (cyclohexene) (112)*	112	-	17.12 ± 3.42^a	12.98 ± 2.36^a
91	4-Ethyl-cyclopentan-1,2-dione (126)	97	-	9.18 ± 0.52^a	9.26 ± 1.64^a

^a Different letters in the same row indicate significant statistical differences (Tukey's Test, $p < 0.05$).

^b Asterisked compounds were identified by means of standard compounds

It can be observed in Table 2 that, among the aliphatic saturated aldehydes, which are the most numerous and abundant in the unsmoked cheese, nonanal and hexanal are those with the highest area counts numbers.

On the other hand, aliphatic unsaturated aldehydes and those aromatic ones are the most abundant in the smoked cheeses, being the area counts of benzaldehyde and, above all, of crotonaldehyde (2-butenal), the highest. Two aromatic aldehydes have also been found in the unsmoked cheese, although in significantly lower concentration than in the smoked variety, being benzaldehyde the most abundant.

The group of **ketones** is very numerous and, as it can be observed in Table 2, it is one of the majority group of volatiles in area counts, both in the smoked and in the unsmoked cheeses, being acetoin, a common cheese component [16], the most abundant in the unsmoked one.

Within the wide group of ketones, most of the aliphatic and cyclic ones are present both in the unsmoked and in the smoked cheeses; among these, there are several methylketones such

as 2-pentanone, 2-heptanone, 2-nonanone and 2-undecanone, which are well known cheese components [17].

With smoking, the presence of ketones is increased considerably. Thus, as can be observed in the smoked variety, the smoking process not only increases the concentration of aliphatic and cyclic ketones in relation to the unsmoked cheese, but also provides the Herreño cheese with several aromatic ketones; these are typical smoke components [13] and are absent in the unsmoked variety. Among all these, the highest abundances correspond to 3-methyl-2-cyclopenten-1-one, dimethyl- and some trimethyl-cyclopentenones.

Within the group of **diketones**, only diacetyl (2,3-butanedione), which is a common cheese component [16,17], has been detected in the unsmoked and in the smoked cheeses in similar concentration. The rest of diketones are only present in the smoked cheeses, being those cyclic more abundant than the linear ones.

2.1.3. Hydrocarbons, terpenes and sesquiterpenes

The headspace of the Herreño cheese contains a very high number of **hydrocarbons**, both **aliphatic** and **aromatic**, as Table 3 shows. Among the aliphatic hydrocarbons, most of them are in quite similar abundances in the unsmoked and in the smoked cheeses, even though 4-methyl-2-pentene is only present in the smoked variety, with a high number of area counts.

Table 3. Hydrocarbons, terpenes and sesquiterpenes detected in the headspace of the exterior region of unsmoked (U) and smoked (A and B) Herreño cheeses studied, together with their molecular weight, the base peak of their mass spectra (Bp), their abundance, expressed as average area counts of their mass spectra base peak divided by 10^5 , and standard deviation. ^a

Nº	Compounds (molecular weight) ^b	Bp	U	A	B
<i>Hydrocarbons</i>					
<i>Aliphatic</i>					
92	4-Methyl-2-pentene (84)	69	-	8.97 ± 0.90^a	8.86 ± 1.42^a
93	2-Heptene (98)	57	1.93 ± 0.34^a	2.02 ± 0.34^a	2.59 ± 0.34^a
94	Nonane (128)*	43	0.40 ± 0.02^a	0.59 ± 0.06^b	0.79 ± 0.07^b

Table 3 (continued)					
95	<i>cis</i> -3,7-Dimethyl-2-octene (140) (or isomer)	70	1.42 ± 0.12 ^a	1.14 ± 0.20 ^a	1.16 ± 0.26 ^a
96	Branched hydrocarbon	57	11.57 ± 2.82 ^a	14.52 ± 3.75 ^a	12.07 ± 2.59 ^a
97	Linear hydrocarbon	57	1.38 ± 0.29 ^a	2.95 ± 0.16 ^b	2.56 ± 0.06 ^b
98	Linear hydrocarbon	57	2.70 ± 0.15 ^a	3.87 ± 0.34 ^b	3.34 ± 0.32 ^b
99	Linear hydrocarbon	57	0.80 ± 0.11 ^a	1.01 ± 0.11 ^a	1.20 ± 0.20 ^a
100	Undecane (156)	43	0.43 ± 0.08 ^a	0.68 ± 0.02 ^{ab}	0.76 ± 0.17 ^b
101	Branched hydrocarbon	57	0.47 ± 0.07 ^a	0.68 ± 0.08 ^b	0.72 ± 0.09 ^b
102	Dodecane (170)*	57	0.52 ± 0.07 ^a	0.72 ± 0.08 ^b	0.76 ± 0.12 ^b
103	Tridecane (184)	43	0.28 ± 0.01 ^a	0.52 ± 0.02 ^b	0.54 ± 0.06 ^b
104	Tetradecane (198)*	57	2.88 ± 0.02 ^b	1.25 ± 0.10 ^a	1.34 ± 0.08 ^a
105	Pentadecane (212)*	57	0.32 ± 0.07 ^{ab}	0.26 ± 0.01 ^a	0.36 ± 0.01 ^b
106	Hexadecane (226)*	57	0.20 ± 0.01 ^a	0.23 ± 0.03 ^a	0.25 ± 0.04 ^a
107	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecene (phytene) (280)	70	0.23 ± 0.00 ^a	0.20 ± 0.12 ^a	0.21 ± 0.07 ^a
<i>Monoaromatic</i>					
108	Benzene (78)	78	0.50 ± 0.05 ^a	6.79 ± 1.63 ^b	8.72 ± 0.87 ^b
109	Toluene (92)*	91	12.52 ± 2.03 ^a	19.75 ± 3.62 ^b	20.45 ± 4.67 ^b
110	Dimethylbenzene (106)	91	0.95 ± 0.16 ^a	4.03 ± 0.66 ^b	4.33 ± 0.37 ^b
111	Dimethylbenzene (106)	91	2.89 ± 0.07 ^a	8.23 ± 1.37 ^b	10.78 ± 2.09 ^b
112	Styrene (104)*	104	1.75 ± 0.16 ^a	13.22 ± 3.67 ^b	12.25 ± 2.06 ^b
113	Methyl-methylethyl-benzene (isomer) (134)	119	2.27 ± 0.03 ^a	2.20 ± 0.36 ^a	2.60 ± 0.06 ^a
<i>Polyaromatic</i>					
114	1H-Indene (116)	130	0.35 ± 0.08 ^a	9.13 ± 1.60 ^b	11.42 ± 0.63 ^b
115	1-Methyl-1H-indene (130)	130	-	2.74 ± 0.69 ^a	2.80 ± 0.41 ^a
116	2-Methyl-1H-indene (130)	130	-	1.60 ± 0.20 ^a	1.80 ± 0.11 ^a
117	Azulene (128)	128	0.09 ± 0.05 ^a	2.49 ± 0.69 ^b	2.47 ± 0.24 ^b
118	Naphtalene (128)*	128	1.84 ± 0.56 ^a	37.49 ± 7.91 ^b	36.87 ± 2.67 ^b
119	Decahydro-naphtalene (138)	138	-	1.06 ± 0.19 ^a	0.86 ± 0.15 ^a
120	2-Methylnaphtalene (142)*	142	0.17 ± 0.06 ^a	3.09 ± 0.11 ^b	3.00 ± 0.29 ^b
121	1-Methylnaphtalene (142)*	142	0.10 ± 0.06 ^a	2.57 ± 0.45 ^b	2.09 ± 0.15 ^b
122	1,1'-Biphenyl (154)	154	-	1.07 ± 0.15 ^a	0.88 ± 0.06 ^a
123	Dimethylnaphtalene (156)	156	-	0.33 ± 0.05 ^a	0.28 ± 0.03 ^a
124	Dimethylnaphtalene (156)	156	-	0.40 ± 0.05 ^b	0.29 ± 0.01 ^a
125	Dimethylnaphtalene (156)	156	-	0.13 ± 0.02 ^a	0.10 ± 0.01 ^a
126	Acenaphthylene (152)*	152	-	0.99 ± 0.08 ^b	0.73 ± 0.06 ^a
<i>Terpenes</i>					
127	δ-3-Carene (136)	93	1.23 ± 0.13 ^a	0.89 ± 0.20 ^a	0.86 ± 0.09 ^a
128	α-Thujene (136)	93	0.73 ± 0.07 ^a	0.69 ± 0.18 ^a	0.70 ± 0.14 ^a
129	α-Pinene (136)*	93	34.91 ± 1.79 ^a	25.68 ± 5.49 ^a	24.71 ± 2.58 ^a
130	Camphene (136)*	93	1.65 ± 0.00 ^a	1.20 ± 0.20 ^a	1.09 ± 0.21 ^a
131	β-Terpinene (136)*	93	0.51 ± 0.06 ^a	0.59 ± 0.08 ^a	0.70 ± 0.05 ^a
132	β-Pinene (136)*	93	2.39 ± 0.06 ^a	4.86 ± 0.68 ^b	4.79 ± 0.64 ^b
133	Camphane (138)	95	29.33 ± 0.71 ^b	18.94 ± 3.08 ^a	20.81 ± 1.28 ^a
134	α-Phellandrene (136)*	93	3.78 ± 0.14 ^a	2.00 ± 0.20 ^a	2.41 ± 0.18 ^a
135	Menth-1-ene (138)	138	0.17 ± 0.00 ^a	0.98 ± 0.23 ^b	0.89 ± 0.03 ^b
136	<i>trans</i> -Carane (138) or <i>trans-p</i> -Menth-1-ene (138)	95	0.41 ± 0.01	-	-
137	α-Limonene (136)*	68	2.68 ± 0.12 ^a	5.78 ± 0.58 ^b	6.71 ± 1.62 ^b
138	α-Fenchene (136)	93	0.12 ± 0.02 ^a	0.73 ± 0.17 ^b	0.76 ± 0.05 ^b
139	Alloocimene (136)	121	-	0.87 ± 0.38 ^a	1.10 ± 0.17 ^a
140	α-Terpinolene (136)	136	-	1.73 ± 0.24 ^a	1.70 ± 0.41 ^a
141	α-Terpinene (136)*	136	-	0.26 ± 0.04 ^b	0.15 ± 0.02 ^a
142	β-Camphor (152)* ^c	152	-	0.32 ± 0.05 ^a	0.46 ± 0.11 ^a
<i>Sesquiterpenes</i>					
143	α-Copaene (or isomer) (204)	161	0.44 ± 0.01 ^b	0.32 ± 0.02 ^a	0.39 ± 0.05 ^{ab}
144	Cyperene (or isomer) (204)	204	0.21 ± 0.00 ^a	0.28 ± 0.02 ^{ab}	0.32 ± 0.06 ^b
145	α-Gurjunene (or isomer) (204)	161	0.06 ± 0.00 ^a	0.11 ± 0.00 ^b	0.13 ± 0.03 ^b
146	Junipene (or isomer) (204)	161	0.09 ± 0.01 ^a	0.11 ± 0.02 ^a	0.11 ± 0.04 ^a

Table 3 (continued)

147	<i>trans</i> -Caryophyllene (204)*	93	1.08 ± 0.02 ^a	1.06 ± 0.05 ^a	1.06 ± 0.37 ^a
148	Alloaromadendrene (or isomer) (204)	161	0.07 ± 0.00 ^a	0.12 ± 0.01 ^b	0.14 ± 0.03 ^b
149	α-Humulene (or isomer) (204)	93	0.21 ± 0.00 ^a	0.21 ± 0.01 ^a	0.22 ± 0.00 ^a
150	Widdrene (or isomer) (204)	119	0.16 ± 0.05 ^a	0.17 ± 0.02 ^a	0.20 ± 0.01 ^a
151	Calarene (or isomer) (204)	161	0.09 ± 0.02 ^a	0.13 ± 0.02 ^a	0.15 ± 0.03 ^a
152	β-Cadinene (or isomer) (204)	204	0.05 ± 0.00 ^a	0.04 ± 0.00 ^a	0.05 ± 0.01 ^a
153	Valencene (or isomer) (204)	161	0.07 ± 0.00 ^a	0.08 ± 0.01 ^a	0.09 ± 0.02 ^a

^a Different letters in the same row indicate significant statistical differences (Tukey's Test, $p < 0.05$).

^b Asterisked compounds were identified by means of standard compounds.

^c This terpene is not an hydrocarbon.

Regarding the aromatic hydrocarbons, their higher number and concentration in the smoked variety indicate that most of these come from the smoking process. Thus, although all the monoaromatic and some of the polyaromatic hydrocarbons have also been detected in the unsmoked cheese, they are, in general, in significantly lower concentrations than in the smoked ones.

It is worth noticing the high abundance of toluene in the unsmoked cheese; this could be related to environmental contamination, as some authors have suggested [18], or even to the metabolism of β-carotene in milk [19]. The ingestion of contaminated feed by the animals producers of the milk could also explain the presence of polyaromatic hydrocarbons in the unsmoked cheese [20].

The group of **terpenes and sesquiterpenes**, also shown in Table 3, is, together with hydrocarbons, one of the most numerous in the unsmoked Herreño cheese. Moreover, the great number of terpenes and sesquiterpenes present in the headspace of Herreño cheese, both unsmoked and smoked, could be considered a distinctive characteristic of this cheese. Many of these compounds are present in similar concentration in the unsmoked and in the smoked cheeses, being α-pinene and camphane those with the highest abundances, in both varieties. As it is known, these compounds are secondary metabolites of plants, especially of aromatic

plants, and their presence in both unsmoked and smoked Herreño cheese indicates that probably they were present in the milk used for cheese elaboration, and their origin could be associated with the feed of the folk.

However, as Table 3 shows, the smoking process also has a noticeable influence on the amount of terpenes in Herreño cheese. It not only enriches significantly its volatile profile in certain terpenes such as β -pinene or α -limonene, but also provides this cheese with new terpenes, not detected in the unsmoked variety, such as alloocimene, α -terpinolene, α -terpinene and β -camphor.

2.1.4. Nitrogenated derivatives

Another standing feature of the volatile composition of Herreño cheese is its content in nitrogen derivatives, shown in Table 4. They include nitrile and, above all, pyridine and pyrazine derivatives. Some of these components are present in the unsmoked cheese, but both their number and their concentration increase considerably with the smoking process, especially those of pyridine derivatives.

Table 4. Nitrogenated derivatives detected in the headspace of the exterior region of unsmoked (U) and smoked (A and B) Herreño cheeses studied, together with their molecular weight, the base peak of their mass spectra (Bp), their abundance, expressed as average area counts of their mass spectra base peak divided by 10^5 , and standard deviation.

N°	Compounds (molecular weight) ^b	Bp ^b	U	A	B
<i>Nitrogenated derivatives</i>					
<i>Nitrile derivatives</i>					
154	Benzonitrile (103)	103	1.66 ± 0.25^a	53.89 ± 5.98^b	63.61 ± 9.01^b
155	3-Methylbenzonitrile (117)	117	0.04 ± 0.02^a	1.50 ± 0.25^b	1.73 ± 0.20^b
156	Benzeneacetonitrile (117)	117	-	2.40 ± 0.38^a	2.34 ± 0.64^a
157	Benzenepropanenitrile (131)	91	-	2.14 ± 0.38^a	1.76 ± 0.25^a
<i>Pyridine and pyrazine derivatives and others</i>					
158	Pyrazine (80)	80	0.60 ± 0.04^a	6.79 ± 0.58^b	7.92 ± 1.51^b
159	Pyridine (79)*	79	2.16 ± 0.06^a	29.84 ± 0.43^b	34.88 ± 5.80^b
160	4-Methyl-pyridine (93)	93	0.71 ± 0.20^a	11.39 ± 1.54^b	13.61 ± 1.78^b
161	Methyl pyrazine (94)	94	0.73 ± 0.03^a	12.97 ± 1.02^b	15.13 ± 3.00^b
162	2-Methyl-pyridine (93)	93	0.61 ± 0.05^a	19.92 ± 2.50^b	22.55 ± 3.31^b
163	2,6-Dimethylpyridine (107)*	107	-	2.15 ± 0.36^a	2.08 ± 0.31^a

164	Table 4 (continued) 2-Ethylpyridine (107)*	106	0.19 ± 0.01 ^a	4.40 ± 1.00 ^b	5.64 ± 0.96 ^b
165	2,4-Dimethylpyridine (107)*	107	-	6.12 ± 1.06 ^a	7.76 ± 1.27 ^a
166	3,4-Dimethylpyridine (107)	107	-	2.49 ± 0.36 ^a	2.70 ± 0.32 ^a
167	3-Ethylpyridine (107)	92	-	2.49 ± 0.45 ^a	2.88 ± 0.42 ^a
168	3-Methoxypyridine (109)*	109	-	15.14 ± 0.64 ^a	15.81 ± 2.07 ^a
169	2-Ethyl-6-methylpyridine (121)	120	-	1.86 ± 0.30 ^a	1.86 ± 0.22 ^a
170	5-Ethyl-2-methylpyridine (121)*	120	-	2.02 ± 0.24 ^a	2.42 ± 0.48 ^a
171	2-Methoxy-3-methylpyrazine (124)	124	-	7.05 ± 0.53 ^a	6.58 ± 1.25 ^a
172	β-Nicotyrine (158)	158	0.53 ± 0.11 ^a	0.61 ± 0.12 ^a	0.60 ± 0.01 ^a

^a Different letters in the same row indicate significant statistical differences (Tukey's Test, $p < 0.05$).

^b Asterisked compounds were identified by means of standard compounds

Within this group of nitrogenated derivatives, the alkaloid β-nicotyrine is the only one whose abundance is almost the same in the smoked and in the unsmoked cheeses, so its origin would be probably different from smoke. This compound, whose presence in cheese has only been reported in Idiazabal [11], has been described as one of the alkaloids present in *Nicotiana paniculata* [21], a potential invading species that grows in the Canary Islands.

2.1.5. Phenol derivatives and ethers

Phenolic derivatives, shown in Table 5, are typical smoke components [13, 14] and, in fact, they are absent in the unsmoked Herreño cheese. They account for a high proportion of the total of volatile components in smoked Herreño cheese, both in number and in area counts. They are constituted by phenol and its derivatives, which are the most numerous, methoxy- and dimethoxy-phenol derivatives, being the most abundant guaiacol (2-methoxyphenol), phenol and their derivatives.

Table 5. Phenol derivatives and ethers detected in the headspace of the exterior region of unsmoked (U) and smoked (A and B) Herreño cheeses studied, together with their molecular weight, the base peak of their mass spectra (Bp), their abundance, expressed as average area counts of their mass spectra base peak divided by 10^5 , and standard deviation. ^a

N°	Compounds (molecular weight) ^b	Bp	U	A	B
<i>Phenol derivatives</i>					
<i>Phenol</i>					
173	Phenol (94)*	94	-	173.11 ± 18.44 ^a	149.26 ± 21.62 ^a
174	2-Methylphenol (108)	107	-	46.52 ± 7.71 ^a	39.09 ± 6.76 ^a

Table 5 (continued)

	3-Methylphenol (108)* +				
175	4-Methylphenol (108)*	107	-	79.36 ± 15.04 ^a	64.64 ± 10.73 ^a
176	2,6-Dimethylphenol (122)*	122	-	13.47 ± 1.23 ^a	12.22 ± 1.90 ^a
177	2-Ethylphenol (122)* + 2-Propylphenol (136)*	107	-	6.32 ± 0.90 ^a	5.37 ± 0.79 ^a
178	2,4-Dimethylphenol (122)*	122	-	12.32 ± 2.13 ^a	10.00 ± 2.05 ^a
179	2,5-Dimethylphenol (122)*	122	-	11.95 ± 1.78 ^a	9.88 ± 1.84 ^a
180	Dimethylphenol (122)	122	-	6.51 ± 1.17 ^a	5.53 ± 0.60 ^a
181	Dimethylphenol (122)	122	-	12.64 ± 2.34 ^a	13.09 ± 2.51 ^a
182	Dimethylphenol (122)	122	-	3.73 ± 0.59 ^a	2.98 ± 0.55 ^a
183	2-(1-Methylethyl)-phenol (136)	121	-	2.28 ± 0.13 ^a	1.97 ± 0.45 ^a
184	2,4,6-Trimethylphenol (136)*	121	-	1.73 ± 0.19 ^a	1.44 ± 0.27 ^a
185	2,3,5-Trimethylphenol (136)*	121	-	1.80 ± 0.19 ^a	1.49 ± 0.24 ^a
186	Diethylphenol (150)	135	-	1.93 ± 0.23 ^a	1.73 ± 0.17 ^a
187	3,4,5-Trimethylphenol (136)*	121	-	1.41 ± 0.22 ^a	1.25 ± 0.23 ^a
188	2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol (BHT) (220)*	205	-	0.29 ± 0.04 ^a	0.25 ± 0.00 ^a
189	2,4,5-Tri- <i>sec</i> -butylphenol (262)	203	-	0.32 ± 0.02 ^a	0.34 ± 0.06 ^a
	<i>Methoxyphenol derivatives</i>				
190	2-Methoxyphenol (guaiacol) (124)*	109	-	250.50 ± 24.70 ^a	231.94 ± 33.36 ^a
191	2-Methoxy-4-methylphenol (4-methylguaiacol) (138)*	123	-	107.65 ± 8.76 ^a	88.25 ± 13.92 ^a
192	4-Ethyl- 2-methoxyphenol (4-ethylguaiacol) (152)*	137	-	70.36 ± 9.01 ^a	55.65 ± 8.93 ^a
193	4-Vinyl-2-methoxyphenol (4-vinylguaiacol) (150)*	135	-	11.53 ± 0.95 ^a	9.76 ± 2.10 ^a
194	4-(2-Propenyl)-2-methoxyphenol (eugenol) (164)*	164	-	4.00 ± 0.62 ^a	3.25 ± 0.66 ^a
195	2-Methoxy-4-propylphenol (4-propylguayacol) (166)*	137	-	5.86 ± 0.67 ^a	4.66 ± 0.79 ^a
196	4-(1-Propenyl)-2-methoxyphenol (isoeugenol isomer) (164)*	164	-	1.50 ± 0.25 ^a	1.16 ± 0.30 ^a
197	4-(1-Propenyl)-2-methoxyphenol (isoeugenol isomer) (164)*	164	-	3.06 ± 0.42 ^a	2.15 ± 0.26 ^a
	<i>Dimethoxyphenol derivatives</i>				
198	Dimethoxyphenol (154) (isomer)	154	-	0.54 ± 0.01 ^a	0.52 ± 0.07 ^a
199	2,6-Dimethoxyphenol (syringol) (154)*	154	-	11.18 ± 0.22 ^a	11.31 ± 1.93 ^a
	<i>Ethers</i>				
	<i>Alkyl-aryl ethers</i>				
200	Methoxybenzene (108)	108	-	3.41 ± 0.38 ^a	3.91 ± 0.49 ^a
201	4-Methyl-1-methoxybenzene (122)	122	-	7.01 ± 2.03 ^a	8.82 ± 1.37 ^a
202	Ethoxy-benzene (122)	94	-	3.01 ± 0.76 ^a	3.49 ± 0.60 ^a
203	1,1-Dimethylethoxybenzene (150)	94	-	1.10 ± 0.08 ^a	0.96 ± 0.12 ^a
204	1,2-Dimethoxybenzene (veratrol) (138)*	123	-	5.39 ± 0.67 ^a	5.42 ± 1.26 ^a
205	1,4-Dimethoxybenzene (138)*	123	-	12.69 ± 0.73 ^a	11.81 ± 0.96 ^a
206	Dimethoxytoluene (152) (isomer)	152	0.13 ± 0.01 ^a	12.71 ± 2.14 ^b	11.49 ± 2.57 ^b
207	3,4-Dimethoxytoluene (152) (or isomer)	152	0.01 ± 0.00 ^a	3.01 ± 0.34 ^b	2.62 ± 0.27 ^b
208	5-Methyl-1,2,3-trimethoxybenzene (182)	182	-	1.14 ± 0.04 ^b	0.85 ± 0.17 ^a
209	Trimethoxybenzene (168) (isomer)	168	-	3.39 ± 0.39 ^a	2.94 ± 0.05 ^a
	<i>Furan derivatives</i>				
	<i>Benzofuran derivatives</i>				
210	Benzofuran (118)	118	1.52 ± 0.09 ^a	30.72 ± 4.44 ^b	36.01 ± 5.76 ^b
211	Methyl-benzofuran (132) (isomer)	131	0.12 ± 0.06 ^a	3.10 ± 0.66 ^b	3.47 ± 0.50 ^b
212	Methyl-benzofuran (132) (isomer)	131	0.35 ± 0.14 ^a	8.51 ± 2.04 ^b	9.42 ± 1.05 ^b
213	Methyl-benzofuran (132) (isomer)	131	0.45 ± 0.17 ^a	10.81 ± 2.11 ^b	11.34 ± 1.86 ^b
214	Dimethyl-benzofuran (146) (isomer)	146	0.09 ± 0.03 ^a	2.18 ± 0.24 ^b	2.52 ± 0.20 ^b
215	Dimethyl-benzofuran (146) (isomer)	146	0.16 ± 0.05 ^a	3.83 ± 0.95 ^b	3.81 ± 0.17 ^b
216	Methoxy-benzofuran (148)	148	-	1.25 ± 0.08 ^b	1.06 ± 0.09 ^a
	<i>Others</i>				
217	2-Methylfuran (82)	82	-	3.06 ± 0.15 ^a	6.36 ± 1.36 ^b
218	3-Furaldehyde (96)	95	-	3.35 ± 0.70 ^a	3.71 ± 0.86 ^a
219	2-Furancarboxaldehyde (96)* ^b	96	-	698.19 ± 105.95 ^a	725.90 ± 148.68 ^a
220	2-Furanmethanol (98)*	98	0.50 ± 0.16 ^a	47.23 ± 5.12 ^b	43.03 ± 7.10 ^b
221	1-2-(Furanyl)-ethanone (2-acetylfuran) (110)*	95	2.60 ± 0.09 ^a	81.61 ± 8.70 ^b	90.94 ± 12.94 ^b
222	5-Methyl-2-furancarboxaldehyde (110)*	110	0.96 ± 0.10 ^a	153.68 ± 20.11 ^b	144.53 ± 35.56 ^b

Table 5 (continued)

223	Methyl furancarboxylate (126)	95	-	38.37 ± 3.51^a	41.74 ± 7.58^a
224	1-(2-Furanyl)-1-propanone (124)	95	-	11.41 ± 0.50^a	11.86 ± 1.92^a
225	2-Butyltetrahydrofuran (128)	71	-	31.85 ± 2.25^a	30.46 ± 4.81^a
226	2-(2-Propenyl)-furan (108)	79	-	3.40 ± 0.49^a	3.77 ± 0.83^a
227	5-Hydroxymethyl-2-furancarboxaldehyde (126)*	97	-	9.10 ± 0.65^a	9.96 ± 2.26^a
228	2-(2-Furanylmethyl)-5-methylfuran (162)	162	-	0.92 ± 0.10^a	0.91 ± 0.01^a

^a Different letters in the same row indicate significant statistical differences (Tukey's Test, $p < 0.05$).

^b Asterisked compounds were identified by means of standard compounds.

Ethers, also shown in Table 5, are well known smoke components [14], although a few of them are also present in the unsmoked cheese, in much lower concentrations than in the smoked ones; among these, 2-acetylfuran can be mentioned due to its abundance.

This group includes alkyl-aryl ethers and furan derivatives, being these latter the most abundant in the smoked cheese. It is worth noticing the high abundance of 2-furancarboxaldehyde, which is the compound with the highest abundance, not only within this group of compounds, but also among all the volatile compounds detected in the smoked Herreño cheese.

2.2. Comparison of the unsmoked Herreño cheese with other types of goat cheeses

It is not easy to compare the volatile profile of different types of cheese when the technique used for the determination of such components is not the same. Besides, both the treatment of the milk or the cheese ripening degree influence to a great extent the volatile profile of each cheese. Despite this, some similarities have been found between the unsmoked Herreño cheese, produced mainly from goat milk, and other types of goat cheeses.

Some of the main components of the unsmoked Herreño cheese have also been found to be important in the volatile fraction of other goat cheeses; this is the case of **acids**, which constitute the main chemical family in some of them [22, 23]. Concretely, hexanoic acid, the most abundant in this Herreño cheese (see Table 1), was also the predominant acid in other

types of goat cheese such as the Spanish Ibores [22], the Turkish Gokceada cheese [23] or the Maltese goat cheese [24]. Moreover, acetic and butanoic acids, also quite abundant in the unsmoked Herreño cheese, were present at high concentrations in Ibores [22] and in Gokceada goat cheeses [23], being acetic acid the most abundant in Xinotyri [25] and Teleme goat cheeses [26].

On the other hand, **ketones**, which constitute another important group of volatile compounds in the unsmoked Herreño cheese, are among the major volatile components detected in Teleme goat cheese [26]. Among these, some methyl ketones such as 2-heptanone and 2-nonanone are present in different types of goat cheese [27-29]. It has also been found that acetoin, the most abundant ketone in the unsmoked Herreño cheese, was also among the most abundant in other goat cheeses [23, 30, 31]. Anyway, it should be noticed that the number of ketones detected in this Herreño cheese is higher than in other goat cheeses.

As commented above, one outstanding characteristic of this Herreño cheese is the low number of **alcohols**, which contrasts with the high abundance of alcohols in other goat milk cheeses [22, 25, 32]. According to the observations of Bontinis et al. (2012) [25], this difference could be due to the use of pasteurized milk for Herreño cheese production; in fact, in Teleme goat cheese [26] made also with pasteurized milk, alcohols were very scarce too. However, it is worth noticing that, irrespective of the alcohols abundance, both in raw and in pasteurized goat cheeses, ethanol is one of the most abundant [23, 25, 26], and this is also observed in Herreño cheese (see Table 1). The other two aliphatic alcohols present in the unsmoked Herreño cheese, 3-methyl-1-butanol and 1-pentanol, have also been found in other types of goat cheeses, above all the first one [23, 27, 31].

Esters also constitute another peculiar feature of unsmoked Herreño cheese since, in contrast with other goat cheeses [22, 23, 25], they are practically absent in Herreño cheese.

Although different **aldehydes** have been found in the headspace of other types of unsmoked goat cheese [23, 32], it could be said that the unsmoked Herreño cheese is richer in aldehydes than other goat cheeses.

Something similar could be said of **hydrocarbons** since, whereas in Herreño cheese this group of components is the most numerous (see Table 3), only a few hydrocarbons have been detected in other goat cheeses [25, 33]. It is worth noticing that none of the unsaturated hydrocarbons detected in Herreño cheese has been found in other types of goat cheese, except for phytene; the presence of this latter has been reported among the volatiles of other cheeses [11].

Although aromatic hydrocarbons come mainly from smoke, some of those detected in Herreño cheese like toluene, styrene and other alkylbenzene hydrocarbons (see Table 3) have also been detected in other unsmoked types of goat cheese [22, 23, 38].

As commented above, another characteristic of the volatile profile of the unsmoked Herreño cheese is the high number of **terpenes and sesquiterpenes** (see Table 3). Among these, α -pinene has been found in other goat cheeses [25], and the same can be said of limonene [22-24]. However, it must be noticed that the presence of so a high number of terpenes and sesquiterpenes as in this Herreño cheese had not been reported previously either in goat cheeses [22, 24, 29] or in other types of cheese [10,11], even though this type of components were also very numerous in La Serena cheese [34].

Concerning **nitrogenated derivatives**, it should be noticed that some of these components have been found in certain types of cheese, but not in goat cheeses; this is the case of benzonitrile [1] and of pyrazine and pyridine [35]. Finally, it only remains to add that some of the **lactones** and **furan derivatives** here detected have also been found in other types of goat cheese [25, 26, 36].

2.3. Comparison of the smoked Herreño cheese with other smoked cheeses

The first issue to be taken into account when trying to compare the volatile profile of smoked Herreño cheese with other smoked cheeses is the scarce studies published on the volatile fraction of smoked cheeses in general and, particularly, of smoked cheeses made with goat milk. In fact, as far as we know, the only scientific works published about this latter type of cheese are those dealing with another type of Canary cheese, Palmero cheese, smoked with pine needles [12] and with dry prickly pear [15].

Although the fibre used for the above mentioned study of smoked Palmero cheese was not the same as in this work, some similarities have been found between the volatile profile of Palmero and smoked Herreño cheese. Thus, in both types of cheese, typical smoke components such as phenolic derivatives, cyclic and aromatic ketones, alkyl-aryl ethers and furan derivatives are among the most numerous and/or abundant components. Moreover, as in the smoked Palmero cheeses studied previously in our laboratory [12, 15], the most abundant phenolic compounds in the smoked Herreño cheese are guaiacol, phenol and their derivatives. However, it must be noticed that among the aromatic ketones and diketones detected in smoked Herreño cheese, neither the methyl-indanones nor the cyclopent-2-en-1,4-dione had been detected in any of the Palmero cheeses studied previously or in other types of smoked cheese.

Although to a lesser extent than in the case of the above mentioned groups of components, the smoking process also enriches the volatile profile of Herreño cheese in esters, lactones, aldehydes, aromatic hydrocarbons and nitrogenated derivatives; these types of compounds were also present in smoked Palmero cheese [12, 15], and in Oscypek, a type of smoked Polish ewe cheese [37].

In relation to esters, it is worth remembering that most of the esters coming from the smoking process of Herreño cheeses were methyl esters, and something similar was observed in Palmero cheese [12, 15] and in Oscypek cheese [37]. Thus, the presence of methyl esters seems to be a characteristic of smoked cheeses since, in unsmoked cheeses, in general, ethyl esters are the predominant ones [8, 22, 23].

With regard to aldehydes, it is worth noticing that some of the aromatic aldehydes detected in smoked Herreño cheese, such as benzaldehyde, benzeneacetaldehyde or vanillin, were found in the headspace of smoked Palmero cheese [12, 15]. On the other hand, crotonaldehyde (2-butenal), the most abundant aldehyde in smoked Herreño cheese (see Table 2) was also detected in Oscypek cheese [37].

Some of the nitrogenated derivatives present in the headspace of smoked Herreño cheese, such as those of nitrile (see Table 4), were also found in smoked Palmero cheese [12, 15]; however, none of the pyridine and pyrazine derivatives detected in smoked Herreño cheese were found in Palmero cheese or in other types of smoked cheese.

Finally, the smoking process provides Herreño cheese with a few alcohols, aliphatic hydrocarbons and terpenes. Concerning aliphatic hydrocarbons, it is worth noticing that, 4-methyl-2-pentene, one of the most abundant in smoked Herreño cheese, was not present in any of the Palmero cheeses studied previously [12, 15]. Lastly, none of the four terpenes detected exclusively in the smoked Herreño cheese (see Table 3) was found in the headspace of Palmero cheese smoked with pine needles, despite terpenes were also quite abundant in this latter [12].

Taking into account that some of the components detected in the smoked Herreño cheese were not found in Palmero cheese smoked with dry prickly pear, which is one of the two

smoking materials used for Herreño cheese, it could be thought that their presence in this cheese is due to the other vegetable matter used to produce the smoke: the fig tree wood.

2.4. Influence of the position in the smokehouse on the volatile profile of smoked Herreño cheese

As Tables 1 to 5 show, the statistical treatment of the data does not reveal, in general, significant differences between the abundance of most of the volatile components in the cheeses smoked at A and B positions. However the observation of a similar tendency in the components of the same group of volatiles could lead one to suppose some influence of the position on the concentration of some volatiles. This could be the case of acids (Table 1), whose area counts are somewhat higher in cheeses smoked at B position than at A, and of phenolic derivatives (Table 5), which exhibit slightly higher abundances in cheeses A, revealing a slightly higher smoking degree in these latter. This inverse relationship between the abundance of acids and of phenolic compounds in cheeses A and B seems to be in accordance with the lower acid abundance observed in smoked cheeses in relation to the unsmoked one.

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. Cheeses and smoking process

The cheeses subject of study were eight smoked Herreño cheeses and another unsmoked one. All the cheeses were manufactured at the same time, with milk from the same batch that, as commented above, was a mixture of goat, cow and sheep. The proportion of each type of milk in the total volume was approximately 75% for goat, 15% for sheep and 10% for cow.

The manufacturing process, which has been described in detail elsewhere [38], was carried out in a local factory, following the traditional methods of production of this type of cheese.

The smoked cheeses were subjected to the smoking process one day after their production process was initiated. All of them were smoked at the same time, in a smokehouse with external smoke generation. The smokehouse (see Figure 2) consists of a small-sized room with two holes: one for the smoke entry in the lower part of the middle of one wall and another for the smoke exit (chimney) in the ceiling, close to the middle of the opposite wall. During the smoking process, the smoke was continuously being generated and expelled to the atmosphere through the chimney.

For the smoking of the cheeses, they were placed on metal grilles at two different heights (1.20 and 1.80 m from the floor), both of them above the smoke entry hole. The cheeses placed on the upper part were called A and those in the lower part B. Considering that smoke tends to go up, it was thought that A cheeses might be more exposed to the smoke action than B; for this reason, and with the aim of obtaining a similar smoking degree, B cheeses were kept in the chamber approximately 4 hours and A cheeses only 2. The situation of the studied cheeses in the smokehouse can also be seen in Figure 2.

The smoke used was produced by the combustion of a mixture of fig tree wood (*Ficus carica*) and dry prickly pear (*Opuntia ficus indica*) in a combustion chamber next to the smokehouse. The distance between the smoke source and the smokehouse was approximately 1 m.

3.2. Generation of the headspace and extraction of its components by SPME

The samples used for the study of the cheese volatiles were portions of the exterior of the cheeses (approximately 1 cm depth). This part was selected because the results obtained in previous studies carried out in our laboratory with other types of cheese revealed that this part

was the richest in volatile components [12,15]. The samples were chopped and approximately 1 g of the chopped sample was weighed into a 4 mL amber vial screw top (acquired from Supelco, Bellefonte, PA, USA), sealed with a hole cap polytetrafluoroethylene/silicone septum, and stored frozen until its study.

Each vial containing 1 g of the cheese sample was introduced into a water bath maintained at 50 °C; then, the fiber was exposed to the headspace of the sample and was maintained for 60 min. The fiber used was coated with divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (50/30 µm film thickness), and it was acquired from Supelco. The selection of the fiber type and the extraction conditions was based on previous studies carried out in our laboratory [11]. Each cheese was analysed in duplicate.

3.3. Study of the extracted compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry

The extracted components were desorbed in the injector of a Hewlett-Packard gas chromatograph model HP 6890 Series II equipped with a mass selective detector 5973 and a Hewlett-Packard Vectra XM Series 4 computer. A fused silica capillary column was used (60 m length x 0.25 mm inside diameter x 0.25 µm film thickness; from Hewlett-Packard, Palo Alto, CA), coated with a nonpolar stationary phase (HP-5MS, 5% phenyl methyl siloxane). The operation conditions were the same as in previous works [11,12,15].

The components were identified by their retention times and by comparison of their mass spectra either with those of standards or with spectra from a commercial library (Wiley 275.L, Mass Spectral Database, Rev. D.01.00, June 2000), as in previous studies [11,12,15].

Semi-quantification was based on arbitrary units of the base peak ion area counts divided by 10^5 .

The results given for the unsmoked cheese correspond to the average area counts of two different samples, whereas those given for the cheeses smoked at each position (A and B) are the average values of four cheeses; each of them was, in turn, analysed in duplicate.

3.4. Statistical analysis

The statistical treatment of the data was carried out using the SPSS 19.0 software package (SSPS Inc., Chicago, IL, USA). One-way analysis of variance (ANOVA) was applied to the data to determine the presence of significant differences among volatile compounds of smoked and unsmoked cheeses (Tukey's test, significant level $P < 0.05$).

4. CONCLUSIONS

Unsmoked Herreño cheese exhibits a very complex volatile profile, very rich in components, among which hydrocarbons, terpenes and sesquiterpenes deserve special attention due to their number, whereas acids and ketones are the most abundant. Although the unsmoked Hereño cheese has some volatile components that are common to other goat cheeses, such as acids, ketones and aldehydes, these are, in general, more numerous in Herreño cheese. In contrast, this cheese is poor in some groups of volatiles that are important in the aroma of other goat cheeses, such as alcohols and esters. Lastly, it is worth noticing the presence of a high number of hydrocarbons, including some unsaturated ones, of terpenes and sesquiterpenes and of nitrogenated derivatives, which can be considered characteristic of the unsmoked Herreño cheese, since they are very scarce or practically absent in other types of goat cheese.

Even more complex is the volatile profile of the smoked Herreño cheese, since it is enriched in other components coming from the smoking process, many of which are not present in the

unsmoked one, such as phenolic derivatives and many ethers, ketones and diketones. On the other hand, the use of fig tree wood in combination with dry prickly pear for the smoking of Herreño cheese provides the smoked variety with specific components, among which special attention should be paid to pyridine and pyrazine derivatives due to their high number, and to others not detected previously in other types of smoked cheese, such as the methyl indanones, the diketone cyclopent-2-en-1,4-dione, the unsaturated hydrocarbon 4-methyl-2-pentene and the four terpenes alloocimene, α -terpinolene, α -terpinene and β -camphor.

The high number of terpenes and sesquiterpenes both in unsmoked and smoked Herreño cheeses, which constitutes a distinguishing feature of this cheese, could be attributed to a great extent to the diet of the animals that produce the milk used for cheese production, based principally on autochthonous vegetation. Moreover, the presence of certain compounds from the characteristic flora of El Hierro Island, such as β -nicotyrine, could contribute to define markers specific for this type of cheese.

Therefore, it could be said that the milk used in the manufacture of the cheese, together with the smoking process performed on the island of El Hierro, results in two different varieties of Herreño cheese, each with well-defined characteristic volatile profiles that could be distinguished from those of other types of cheese.

Lastly, the position of the Herreño cheeses in the smokehouse does not seem to have a great influence on their volatile profile, given that statistically significant differences have not been found between cheeses A and B. However, the results obtained suggest a slightly higher smoking degree of the cheeses smoked at a greater height.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge the financial support of the Spanish Ministry of Science and Technology (CAL02-075-C3-2) and of the Basque Government (EJ-GV, GIC10/IT-463-10). G. Palencia thanks the University of the Basque Country for a predoctoral fellowship.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Barbieri, G.; Bolzoni, L.; Careri, M.; Mangia, A.; Parolari, G.; Spagnoli, S.; Virgili, R. Study of the volatile fraction of Parmesan cheese. *J Agric Food Chem* **1994**, *42*, 1170-1176.
2. Kubíčková, J.; Grosch, W. Evaluation of potent odorants of Camembert cheese by dilution and concentration techniques. *Int Dairy J* **1997**, *7*, 65-70.
3. Rychlik, M.; Bosset, J.O. Flavour and off-flavour compounds of Swiss Gruyère cheese. Evaluation of potent odorants. *Int Dairy J* **2001**, *11*, 895-901.
4. Pérès, C.; Viallon, C. ; Berdagué, J. L. (2001) Solid-phase microextraction-mass spectrometry: A new approach to the rapid characterization of cheeses. *Analytical Chemistry*, *73*, 1030-1036.
5. Pinho, O.; Ferreira, I.M.P.L.V.O.; Casal, S.; Fernandes, J.O.; Oliveira, M.B.P.P.; Ferreira, M.A. Method optimization for analysis of the volatile fraction of ewe cheese by solid-phase microextraction. *Chromatographia* **2001**, *53*, S390–S393.
6. Pinho, O.; Ferreira, I. M. P. L. V. O.; Ferreira, M. A. (2002) Solid-phase microextraction in combination with GC/MS for quantification of the major volatile free fatty acids in ewe cheese. *Analytical Chemistry*, *74*, 5199-5204.
7. Vítová, E.; Loupancová, B.; Štoudková, H.; Zemanová, J. Application of SPME-GC method for analysis of the aroma of white surface mould cheeses. *J Food Nutr Res.* 2007, *46*, 84-90.
8. Delgado, F.J.; González-Crespo, J.; Cava, R.; García-Parra, J.; Ramírez, R. Characterisation by SPME-GC-MS of the volatile profile of a Spanish soft cheese P.D.O. Torta del Casar during ripening. *Food Chem* **2010**, *118*, 182-189.
9. Ferreira, I.M.P.L.V.O.; Pinho, O.; Sampaio, P. Volatile fraction of DOP “Castelo Branco” cheese: Influence of breed. *Food Chem* **2009**, *112*, 1053-1059.

10. Wolf, I.V.; Perotti, M.C.; Bernal, S.M.; Zalazar, C.A. Study of the chemical composition, proteolysis, lipolysis and volatile compounds profile of commercial Reggianito Argentino cheese: Characterization of Reggianito Argentino cheese. *Food Res Int* **2010**, *43*, 1204-1211.
11. Guillén, M.D.; Abascal, B. Nature and distribution of the volatile components in the different regions of an artisanal ripened sheep cheese. *J Dairy Res* **2012**, *79*, 102-109.
12. Guillén, M.D.; Ibargoitia, M.L.; Sopelana, P.; Palencia, G.; Fresno, M. Components detected by means of solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry in the headspace of artisan fresh goat cheese smoked by traditional methods. *J Dairy Sci* **2004**, *87*, 284-299.
13. Guillén, M.D.; Ibargoitia, M.L. Volatile Components of Aqueous Liquid Smokes from *Vitis vinifera* L Shoots and *Fagus sylvatica* L Wood. *J Sci Food Agric* **1996**, *72*, 104-110.
14. Guillén, M.D.; Ibargoitia, M.L. New components with potential antioxidant and organoleptic properties, detected for the first time in liquid smoke flavoring preparations. *J Agric Food Chem* **1998**, *46*, 1276-1285.
15. Guillén, M.D.; Ibargoitia, M.L.; Sopelana, P.; Palencia, G. Components detected by headspace-solid phase microextraction in artisanal fresh goat's cheese smoked using dry prickly pear (*Opuntia ficus indica*). *Lait* **2004**, *84*, 385-397.
16. McSweeny, P.L.H.; Sousa, M.J. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Lait* **2000**, *80*, 293-324.
17. Curioni, P.M.G.; Bosset, J.O. Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *Int Dairy J* **2002**, 959-984.
18. Bosset, J.O.; Gubler, M.; Bütikofer, U.; Gauch, R. Mono-, di and trimethyl benzene in frozen cheese samples: Natural metabolites or environmental pollutants. *Mitt Lebensmittelunters Hyg* **2000**, *91*, 287-299.

19. Molimard, P.; Spinnler, H.E. (1996). Review: compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheese: origins and properties. *J Dairy Sci* **1996**, *79*, 169-184.
20. Grova, N.; Feidt, C.; Crepineau, C.; Laurent, C.; Lafargue, P.E.; Hachimi, A.; Rychen, G. Detection of polycyclic aromatic hydrocarbon levels in milk collected near potential contamination sources. *J Agric Food Chem* **2002**, *50*, 4640-4642.
21. Gonzalez, A.G.; Rodriguez Diaz, F. Alkaloids in plants of the Canary Island. VII. *Nicotiana glauca* and *N. paniculata*. *Anales Real Soc Espan Fis Quim* **1962**, *58*, 431-436.
22. Delgado, F.J.; González-Crespo, J.; Cava, R.; Ramírez, R. Formation of the aroma of a raw goat milk cheese during maturation analysed by SPME-GC-MS. *Food Chem* **2011**, *129*, 1156-1163.
23. Hayaloglu A.A.; Tolu, C.; Yasar, K.; Sahingil, D. Volatiles and sensory evaluation of goat milk cheese Gokceada as affected by goat breeds (Gokceada and Turkish Saanen) and starter culture systems during ripening. *J Dairy Sci* **2013**, *96*, 2765-2780.
24. Chiofalo, B.; Zumbo, A.; Costa, R.; Liotta, L.; Mondello, L.; Dugo, P.; Chiofalo, V. (2004). Characterization of Maltese goat milk cheese flavour using SPME-GC/MS. *S Afri J Ani Sci* **2004**, *34*, 176-180.
25. Bontinis, Th.G.; Mallatou, H.; Pappa, E.C.; Massouras, Th.; Alichanidis, E. Study of proteolysis, lipolysis and volatile profile of a traditional Greek goat cheese (Xinotyri) during ripening. *Small Ruminant Res* **2012**, *105*, 193-201.
26. Massouras, T.; Pappa, E.C.; Mallatou, H. Headspace analysis of volatile flavour compounds of Teleme cheese made from sheep and goat milk. *Int J Dairy Technol* **2006**, *59*, 250-256.
27. Attaie, R. Quantification of Volatile Compounds in Goat Milk Jack Cheese Using Static Head Space Gas Chromatography. *J Dairy Sci* **2009**, *92*, 2435-2443.

28. Concurso, C.; Verzera, A.; Romeo, V.; Ziino, M.; Conte, F. Solid-phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry analysis of dairy product volatiles for the determination of shelf-life. *Int Dairy J* **2008**, *18*, 819-825.
29. Mondello, L.; Costa, R.; Tranchida, P. Q.; Chiofalo, B.; Zumbo, A.; Dugo, P.; Dugo, G. (2005). Determination of flavor components in Sicilian goat cheese by automated HS-SPME-GC. *Flavour Frag J* **2005**, *20*, 659-665.
30. Carunchia-Whetstine, M.E.; Karagul-Yuceer, Y.; Avsar, Y.K.; Drake, M.A. (2003). Identification and quantification of character aroma components in fresh Chevre-style goat cheese. *J Food Sci* **2003**, *68*, 2441-2447.
31. Castillo, I.; Calvo, M.V.; Alonso, L.; Juarez, M.; Fontecha, J. Changes in lipolysis and volatile fraction of a goat cheese manufactured employing a hygienized rennet paste and a defined strain starter. *Food Chem* **2007**, *100*, 590-598.
32. Serhan, M.; Linder, M.; Hosri, C.; Fanni, J. Changes in proteolysis and volatile fraction during ripening of Darifayeh, a Lebanese artisanal raw goat's milk cheese. *Small Ruminant Res* **2010**, *90*, 75-82.
33. Sablé, S.; Letellier, F.; Cottenceau, G. (1997). An analysis of the volatile flavour compounds in a soft raw goat milk cheese. *Biotechnol Lett* **1997**, *19*, 143-145.
34. Fernández-García, E.; Imhof, M.; Schlichtherle-Cerny, H.; Bosset, J.O.; Nuñez, M. Terpenoids and benzenoids in La Serena cheese made at different seasons of the year with a *Cynara cardunculus* extract as coagulant. *Int Dairy J* **2008**, *18*, 147-157.
35. Frank, D.C.; Owen, C.M.; Patterson, J. Solid phase microextraction (SPME) combined with gas-chromatography and olfactometry-mass spectrometry for characterization of cheese aroma compounds. *LWT - Food Sci Technol* **2004**, *37*, 139-154.

36. Poveda, J.M.; Sánchez-Palomo, E.; Pérez-Coello, M.S.; Cabezas, L. Volatile composition, olfactometry profile and sensory evaluation of semi-hard Spanish goat cheeses. *Dairy Sci Technol* **2008**, *88*, 355-367.
37. Majcher, M.A, Goderska, K.; Pikul, J.; Jeleń, H.H. Changes in volatile, sensory and microbial profiles during preparation of smoked ewe cheese. *J Sci Food Agric.* **2011**, *91*, 1416-1423.
38. Guillén, M.D.; Palencia, G.; Ibargoitia, M. L.; Fresno, M.; Sopelana, P. Contamination of cheese by PAHs in traditional smoking. Influence of the position in the smokehouse on the contamination level of smoked cheese. *J. Dairy Sci.* **2011**, *94*, 1679–1690.

Manuscrito 4

**OCCURRENCE OF POLYCYCLIC
AROMATIC HYDROCARBONS IN
ARTISANAL PALMERO CHEESE SMOKED
WITH TWO TYPES OF VEGETABLE
MATTER.**

M. D. Guillén*, G. Palencia*, P. Sopelana* and M. L. Ibargoitia*

*Tecnología de Alimentos, Facultad de Farmacia, Universidad del País Vasco, Paseo de la Universidad 7, 01006, Vitoria, Spain.

Journal of Dairy Science, **2007**, 90, 2717-2725.

ABSTRACT

Palmero cheese is a fresh smoked cheese from the isle of Palma (Canary Islands), manufactured with goat's milk. To guarantee its safety, the occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in artisanal Palmero cheese smoked with two types of vegetable matter (almond shells and dry prickly pear), was studied. The determination of PAHs includes extraction and clean-up steps, followed by separation, identification and quantification of PAHs by gas chromatography-mass spectrometry in SIM mode. The most abundant PAHs are those with 2 and 3 aromatic rings. Even though the highest total PAH concentrations correspond to the cheeses smoked with almond shells, the degree of PAH contamination of the cheeses studied is lower than that found in other cheeses smoked in a traditional way. The nature of the vegetable material used for smoking also seems to have an influence on the type of PAHs formed, especially on alkylderivatives and some light PAHs. However, despite the artisanal and, consequently, variable production process of these cheeses, many similarities have been found among their PAH profiles. In fact, relatively constant relations are observed between the concentrations of certain pairs of PAHs. Benzo(a)pyrene is only present in two samples, in very low concentrations, and far lower than the maximum allowed legal limits. Therefore, according to the results obtained, it could be said that it is possible to obtain a safe product, without renouncing either the artisanal character or the sensory properties of this type of cheese.

Key Words: Palmero smoked cheese, PAHs, gas chromatography-mass spectrometry

1. INTRODUCTION

Palmero cheese is an artisanal fresh smoked cheese, produced on the Isle of Palma (Canary Islands). This is one of the cheeses protected by a Denomination of Origin (Orden de 31 de agosto, 2001) and manufactured in the Iberian Peninsula from unpasteurized Palmera goat milk (Freitas et al., 2000). When smoking this kind of cheese, four types of vegetable matter can be used: almond shells (*Prunus dulcis*), dry prickly pear (*Opuntia ficus indica*), and the wood or needles of Canary pine (*Pinus canariensis*).

In addition to conferring special and much appreciated organoleptic characteristics to products, smoking can lead to contamination with polycyclic aromatic hydrocarbons (**PAH**) if the process is not carefully controlled) (Maga, 1988). Polycyclic aromatic hydrocarbons are lipophilic and given the high proportion of fat in cheese, contamination with PAHs during the smoking process can occur. However, little research has been done on the occurrence of PAHs in this type of food. Moreover, most of the studies focus on only a low number of PAHs (between 5 and 14) (Panalaks, 1976; Joe et al., 1984; Riha et al., 1992; Bosset et al., 1998; De Martin et al., 1998) or even exclusively on benzo(a)pyrene (Pagliuca et al., 2003; Anastasio et al., 2004). Nevertheless, despite their limitations in giving a complete view of the PAH profile of the cheeses studied, all these studies reveal the presence of PAHs in smoked cheese and, in some cases, in unsmoked cheese too.

There is increasing interest in assuring the safety of smoked foods, and especially of those manufactured following traditional methods. For this reason, and in order to evaluate the PAH level of Palmero cheese, this paper studies several types of Palmero cheeses produced by different artisans and smoked with two of the four types of vegetable matter permitted by the Origin Denomination Norms (Orden de 31 de agosto, 2001). Possible relationships between the PAH contamination level of these samples and the degree of smoking, were also studied.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. *Samples*

The samples subject of study were eight smoked Palmero cheeses manufactured by different artisans. Four of them were smoked with almond shells (AS2, AS4, AS5 and AS6) and the other four with dry prickly pear (PP2, PP3, PP4 and PP5). Previous studies (Guillén and Sopelana, 2004) have shown that most PAH contamination in smoked cheese is concentrated in the outer part. For this reason, and taking into account that the Palmero cheese is fresh and does not have a well defined rind, the portions studied, which weighted approximately 20 g, were taken from the outer part of the cheeses, with a width of approximately 1 cm. Two aliquots were taken from each cheese.

2.2. **Reagents**

The solvents employed were cyclohexane and methanol, both HPLC grade (99.9+%). Other reagents and materials used were potassium hydroxide, sodium chloride, anhydrous sodium sulphate, sodium tungstate dihydrate, and Supelclean LC-Si SPE (Solid Phase Extraction) tubes 3 mL (500 mg). All solvents, reagents and materials mentioned are commercially available from Aldrich (Steinheim, Germany), Panreac (Barcelona, Spain) and Supelco (Bellefonte, Pennsylvania, USA).

2.3. *Standards*

The PAH standards used were the following: a commercial mixture of PAH standards dissolved in a mixture of dichloromethane:benzene (75:25), containing naphthalene, acenaphthene, acenaphthylene, fluorene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, benzo(c)phenanthrene, benz(a)anthracene, chrysene, 7,12-dimethylbenz(a)anthracene, benzo(b)fluoranthene, benzo(j)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, benzo(a)pyrene, indeno(1,2,3-cd)pyrene, dibenz(a,h)anthracene, benzo(ghi)perylene, dibenzo(a,l)pyrene, dibenzo(a,i)pyrene and dibenzo(a,h)pyrene, in concentrations of approximately 500 µg/mL;

commercial individual cyclohexane solutions of 1,7-dimethylnaphthalene, 1,4-dimethylnaphthalene, 1,5-dimethylnaphthalene, 1-methylphenanthrene, 2,3-dimethylantracene, 9,10-dimethylphenanthrene, 2-methylfluoranthene, 1-methylfluoranthene, 11H-benzo(c)fluorene and 1-methylpyrene, in concentrations of 10 µg/mL approximately; and a mixture of pure PAHs dissolved in dichloromethane, containing 2,6-dimethylnaphthalene, 2,3-dimethylnaphthalene, *o*-terphenyl, 2-methylantracene, 9-methylantracene, 3,6-dimethylphenanthrene, *m*-terphenyl, *p*-terphenyl, 11H-benzo(a)fluorene, 11H-benzo(b)fluorene, benzo(e)pyrene and perylene, in concentrations ranging from 100 to 247.5 µg/mL.

Naphthalene-d₈, acenaphthene-d₁₀, phenanthrene-d₁₀, pyrene-d₁₀, *p*-terphenyl-d₁₄, chrysene-d₁₂, perylene-d₁₂ and benzo(ghi)perylene-d₁₂ were used as internal standards. The purity of these standards ranged from 97 to 99.5%.

All the above mentioned standards were used in the identification and quantification of the PAHs present in the samples. All pure standards and solutions were obtained from Sigma, Aldrich (Steinheim, Germany), Supelco (Bellefonte, Pennsylvania, USA) and Synta (Madrid, Spain).

2.4. Determination of PAHs.

The methodology employed for the study of the samples was the same described elsewhere (Guillén and Sopolana, 2004). This basically includes the addition of a mixture of deuterated internal standards to the ground cheese, extraction of fat with cyclohexane in an ultrasonic bath, filtration, alkaline treatment of the fat with boiling methanolic potassium hydroxide during 4 hours under reflux, extraction of PAHs by shaking with cyclohexane in a separator funnel, washings of the extract, clarification with sodium tungstate, filtration, drying with anhydrous sodium sulphate, and purification with solid phase extraction tubes filled with silica. The final extract was studied by gas chromatography-mass spectrometry in selected ion

monitoring (SIM) mode. This was carried out by means of a Hewlett-Packard gas chromatograph model HP 6890 Series, equipped with a Mass Selective Detector 5973 and a Hewlett-Packard Vectra XM Series 4 computer. The column used was a fused-silica capillary column (60 m long x 0.25 mm inner diameter x 0.25 μ m film thickness), coated with a non-polar stationary phase (HP-5MS, 5% phenyl methyl siloxane). The operation conditions were the following: the oven temperature was set initially at 50 °C (0.50 min hold), increased to 130 °C at 8 °C/min and again increased to 290 °C (70 min hold) at a rate of 5 °C/min; the temperatures of the ion source and the quadrupole mass analyzer were kept at 230 and 150 °C, respectively; Helium with a purity of 99.999% was used as carrier gas at a constant flow of 1.0 mL/min; injector and transference line temperatures were held at 280 °C and 300 °C, respectively; pulsed splitless mode was used for injection with a pressure pulse of 30 psi, and 1 μ l of each sample was introduced into the gas chromatograph. The data acquisition mode employed to identify and quantify the PAHs present was SIM. Scan mode was occasionally used in order to ascertain the type of compounds present in the samples.

Identification of the compounds was based on their retention times and on the relative abundances of the ions selected for their identification. Quantification in SIM mode is based on the measurement of the peak area correspondent to the most abundant ion of each compound, and was carried out by means of the deuterated internal standards previously mentioned. Thus, naphthalene- d_8 was used for quantification of naphthalene and its alkylderivatives, acenaphthene- d_{10} for acenaphthylene and acenaphthene, phenanthrene- d_{10} for fluorene, phenanthrene, anthracene and their alkylderivatives, pyrene- d_{10} for fluoranthene and pyrene, *p*-terphenyl- d_{14} for *m*-terphenyl, *p*-terphenyl, benzofluorenes and methyl-fluoranthenes/-pyrenes, chrysene- d_{12} for benz(a)anthracene and chrysene, perylene- d_{12} for benzofluoranthenes and benzopyrenes and, lastly, benzo(ghi)perylene- d_{12} for PAHs with higher molecular weights.

2.5. *Headspace volatile components semiquantification.*

This was accomplished by using solid phase microextraction (SPME) for isolation of the headspace components and gas chromatography-mass spectrometry for separation, identification and semiquantification, in the same way as that described in previous papers, and employing the same standard compounds (Guillén et al., 2004a,b).

2.6. *Statistical Analysis.*

T-Student analysis of independent samples was used to compare the results from the two groups of cheeses with regard to the smoking material. The statistical analysis was performed using the SPSS v.14.0 software package for Windows.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The compounds detected and their concentrations in the cheeses smoked with almond shells and with dry prickly pear, together with their concentrations, in $\mu\text{g}/\text{kg}$ of outer part, are shown in Table 1. Results are given as the mean value of the results corresponding to four cheeses per each vegetal matter, considering two aliquots per cheese (\pm standard deviation), together with the range of concentrations observed. As expected, the results obtained reveal that the outer parts of all the cheeses studied contain PAHs, even though the total PAH concentrations vary among much lower values in the samples smoked with dry prickly pear (29.21-193.11 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and higher ones in those smoked with almond shells (42.46-739.55 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Table 1. PAHs identified in the outer part of the smoked cheeses studied and their concentrations, in $\mu\text{g}/\text{kg}$. Results are given as the mean value of four cheeses per each vegetal matter, considering two aliquots per cheese, \pm standard deviation, together with the range of concentrations observed.

PAH	Almond shells	Dry prickly pear
Naphthalene ¹	39.11 \pm 43.38 (10.05-103.58)	19.29 \pm 14.54 (7.10-40.14)
Methylnaphthalenes	53.03 \pm 70.22 (7.87-157.57)	17.52 \pm 15.21 (6.54-40.03)
2-Methylnaphthalene	29.62 \pm 38.41 (4.72-86.81)	10.39 \pm 8.98 (3.98-23.70)
1-Methylnaphthalene	23.41 \pm 31.81 (3.15-70.76)	7.13 \pm 6.23 (2.56-16.33)
Dimethylnaphthalenes	77.22 \pm 107.02 (12.63-237.28)	22.96 \pm 16.55 (8.49-46.81)
2,6-Dimethylnaphthalene	19.11 \pm 24.42 (4.31-55.63)	6.36 \pm 4.87 (2.25-13.43)
1,7-Dimethylnaphthalene	17.65 \pm 23.35 (3.60-52.57)	5.33 \pm 3.82 (1.80-10.73)
1,6-Dimethylnaphthalene	25.97 \pm 38.10 (4.72-83.05)	5.97 \pm 4.32 (2.23-12.20)
1,4-+2,3-Dimethylnaphthalenes	10.18 \pm 14.75 (n.d.-32.09)	3.85 \pm 2.71 (1.66-7.79)
1,5-Dimethylnaphthalene	4.32 \pm 6.48 (n.d.-13.94)	1.45 \pm 0.91 (0.55-2.66)
Acenaphthylene	12.99 \pm 22.22 (1.07-46.29)	3.29 \pm 5.18 (0.39-11.03)
Acenaphthene	2.32 \pm 3.34 (0.29-7.32)	0.84 \pm 0.98 (0.31-2.31)

Table 1 (continued)

PAH	Almond shells	Dry prickly pear
Fluorene	7.84 ± 12.60 (0.48-26.71)	2.85 ± 4.08 (0.41-8.92)
Phenanthrene	14.67 ± 22.40 (2.34-48.23)	6.99 ± 7.55 (1.73-18.09)
Anthracene	3.57 ± 6.30 (n.d. ² -13.01)	1.33 ± 1.90 (0.18-4.16)
Methyl-phenanthrenes/-anthracenes	14.50 ± 19.52 (3.73-43.75)	6.01 ± 4.33 (2.36-11.56)
3-Methylphenanthrene	2.24 ± 2.85 (0.68-6.51)	1.22 ± 0.77 (0.49-1.91)
2-Methylphenanthrene	3.89 ± 4.89 (1.13-11.22)	2.04 ± 1.38 (0.77-3.45)
2-Methylanthracene	1.45 ± 2.73 (n.d.-5.53)	0.44 ± 0.88 (n.d.-1.76)
9-Methylphenanthrene	2.26 ± 2.55 (0.78-6.07)	1.27 ± 0.78 (0.57-2.12)
1-Methylphenanthrene	4.67 ± 6.52 (0.81-14.42)	1.06 ± 0.85 (0.53-2.32)
Dimethylphenanthrenes or isomers	9.88 ± 14.52 (1.45-31.60)	1.19 ± 0.92 (n.d.-2.23)
Dimethylphenanthrene or isomer (1)	0.37 ± 0.75 (n.d.-1.49)	n.d.
Dimethylphenanthrene or isomer (2)	0.26 ± 0.52 (n.d.-1.04)	n.d.
Dimethylphenanthrene or isomer (3)	0.24 ± 0.49 (n.d.-0.97)	n.d.
Dimethylphenanthrene or isomer (4)	1.22 ± 0.87 (0.53-2.49)	0.09 ± 0.17 (n.d.-0.34)

Table 1 (continued)

PAH	Almond shells	Dry prickly pear
Dimethylphenanthrene or isomer (5)	1.20 ± 1.47 (0.32-3.39)	0.08 ± 0.17 (n.d.-0.33)
Dimethylphenanthrene or isomer (6)	1.86 ± 1.55 (0.27-3.29)	0.88 ± 0.71 (n.d.-1.56)
Dimethylphenanthrene or isomer (7)	4.73 ± 9.47 (n.d.-18.93)	0.09 ± 0.18 (n.d.-0.35)
Dimethylphenanthrene or isomer (8)	n.d.	0.06 ± 0.13 (n.d.-0.25)
Fluoranthene	2.29 ± 3.32 (0.46-7.25)	1.28 ± 0.97 (0.50-2.50)
Pyrene	1.83 ± 2.70 (0.35-5.88)	0.93 ± 0.71 (0.33-1.81)
Methyl-fluoranthenes/-pyrenes	0.94 ± 1.62 (n.d.-3.36)	0.21 ± 0.42 (n.d.-0.84)
2-Methylfluoranthene	0.15 ± 0.29 (n.d.-0.58)	0.03 ± 0.06 (n.d.-0.12)
Methyl-fluoranthene/-pyrene (1)	0.17 ± 0.21 (n.d.-0.46)	0.03 ± 0.07 (n.d.-0.13)
Methyl-fluoranthene/-pyrene (2)	n.d.	0.04 ± 0.07 (n.d.-0.14)
Methyl-fluoranthene/-pyrene (3)	0.18 ± 0.37 (n.d.-0.73)	0.04 ± 0.08 (n.d.-0.15)
Methyl-fluoranthene/-pyrene (4)	0.20 ± 0.41 (n.d.-0.81)	0.04 ± 0.08 (n.d.-0.16)
1-Methylpyrene	0.24 ± 0.37 (n.d.-0.78)	0.04 ± 0.07 (n.d.-0.14)
<i>o</i> -Terphenyl	0.85 ± 0.16 (0.70-1.06)	0.78 ± 0.74 (0.36-1.88)

Table 1 (continued)

PAH	Almond shells	Dry prickly pear
<i>m</i> -Terphenyl	0.35 ± 0.09 (0.24-0.44)	0.11 ± 0.15 (n.d.-0.31)
<i>p</i> -Terphenyl	0.03 ± 0.05 (n.d.-0.10)	0.04 ± 0.05 (n.d.-0.08)
1- Methylfluoranthene+11H-Benzo(a)fluorene	n.d.	0.14 ± 0.29 (n.d.-0.57)
11H-Benzo(b)fluorene	0.23 ± 0.46 (n.d.-0.91)	0.03 ± 0.07 (n.d.-0.13)
11H-Benzo(c)fluorene	0.13 ± 0.14 (n.d.-0.32)	0.03 ± 0.05 (n.d.-0.10)
Benz(a)anthracene ¹	0.33 ± 0.46 (0.05-1.01)	0.13 ± 0.11 (0.03-0.28)
Chrysene ¹ +Triphenylene	0.49 ± 0.57 (0.14-1.33)	0.26 ± 0.15 (0.11-0.46)
Benzo(b)fluoranthene ¹	0.10 ± 0.21 (n.d.-0.41)	0.03 ± 0.06 (n.d.-0.12)
Benzo(j+k)fluoranthenes ¹	0.17 ± 0.34 (n.d.-0.68)	0.04 ± 0.07 (n.d.-0.14)
Benzo(a)fluoranthene	0.05 ± 0.11 (n.d.-0.21)	n.d.
Benzo(e)pyrene	0.11 ± 0.21 (n.d.-0.42)	0.00 ± 0.07 (n.d.-0.13)
Benzo(a)pyrene ¹	0.13 ± 0.26 (n.d.-0.51)	0.02 ± 0.04 (n.d.-0.08)
Perylene	0.03 ± 0.07 (n.d.-0.13)	n.d.
Indeno(1,2,3-cd)pyrene ¹	0.07 ± 0.13 (n.d.-0.26)	0.01 ± 0.03 (n.d.-0.05)

Table 1 (continued)

PAH	Almond shells	Dry prickly pear
Benzo(ghi)perylene	0.07 ± 0.15 (n.d.-0.29)	0.01 ± 0.03 (n.d.-0.05)
TOTAL PAHs	243.31 ± 331.87 (42.46-739.55)	86.35 ± 73.18 (29.21-193.11)
PARENT PAHs	87.75 ± 119.11 (16.78-265.99)	38.45 ± 36.40 (11.82-91.64)
ALKYLATED PAHs	155.57 ± 212.80 (25.68-473.56)	47.90 ± 36.88 (17.39-101.47)

¹ Results are given as the mean value of 4 cheeses per each vegetable matter, considering 2 aliquots per cheese (\pm SD) together with the range of concentrations observed.

² PAH with a certain degree of carcinogenicity according to the classification of the IARC (IARC, 1983, 2002; Straif et al., 2005)

² n.d.: Not detected

The presence of very light PAHs (naphthalene or acenaphthylene), and heavy PAHs (benz(a)anthracene, chrysene and even of benzopyrenes or benzo(ghi)perylene in some samples, such as AS5 and PP3) is worth noting (Table 1). Naphthalene and its alkyl derivatives are the main PAH present in these cheese samples as well as in commercial smoke flavorings (Guillén et al., 2000a), smoke flavorings generated from different kinds of wood (Guillén et al., 2000b), smoke produced from several vegetable matters (Conde et al., 2005), and commercial smoked cheeses (Guillén and Sopelana, 2004).

As reported in a previous study on the occurrence of PAHs in commercial smoked cheeses (Guillén and Sopelana, 2004), both the number and the concentrations of light PAHs are much higher than those of heavier PAHs. Thus, the highest concentrations in these Palmero cheese samples correspond to the lightest PAHs, above all naphthalene and, in general, as the

molecular weight of the compounds rises so their concentrations decrease. Consequently, PAHs with four aromatic rings or more are in much lower concentrations. It must also be noticed that the samples with higher concentrations of light PAHs generally contain higher concentrations of heavier PAHs too. In accordance with their higher number of PAHs, samples AS5 and PP3 also present the highest total PAH contents (739.55 and 193.11 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of outer part) within the cheeses smoked with almond shells and with dry prickly pear, respectively.

In agreement with the above-mentioned studies, particularly noteworthy is the high number of alkylated PAHs, which, in this work, account for a proportion of the total PAH concentration ranging from 60.5 to 67.0%, even though this group of PAHs are hardly considered in the studies related to smoked cheese or to food in general. They are mainly derivatives of naphthalene, but there are also others derived from phenanthrene and fluoranthene or pyrene. A high proportion of alkyl derivatives had also been observed in other types of smoked cheeses studied previously (Guillén and Sopelana, 2004).

It is worth pointing out that though each sample was manufactured by a different artisan and presents a different PAH contamination degree, some common features can be observed in their PAH profile. Table 2 shows the ratios between the concentrations of some pairs of isomers in all the samples studied, together with their total PAH content, in $\mu\text{g}/\text{kg}$ of outer part. With respect to unsubstituted or parent PAHs, it should be noticed that there is a very close relation between the concentrations of some pairs of isomers. Thus, as can be seen in Table 2, phenanthrene is always in higher concentration than anthracene, although the proportion between these two PAHs seems to vary depending on their concentrations; specifically in samples AS5 and PP3, which are those with the highest total PAH concentrations within each group of cheeses, the values of the ratio between both PAHs are

lower than in the rest. In a similar way, the sum of chrysene and triphenylene is always higher than the concentration of benz(a)anthracene.

Table 2. Ratios between the concentrations of some pairs of isomers in the different cheeses studied, together with their total PAH content, expressed in $\mu\text{g}/\text{kg}$ of outer part^a.

	Ph/A	Ft/P	C+T/BaA	BFts/BPs	BPer/IP	2-MN/1-MN	PAH content
Almond shells							
AS5	3.7	1.2	1.3	1.4	1.1	1.2	739.55
AS6	6.2	1.3	3.0	-	-	1.3	105.52
AS4	6.6	1.2	1.8	-	-	1.5	85.71
AS2	-	1.4	2.8	-	-	1.5	42.46
Dry prickly pear							
PP3	4.3	1.4	1.6	1.2	1.0	1.5	193.11
PP5	8.9	1.3	1.7	-	-	1.4	70.75
PP2	7.6	1.4	3.7	-	-	1.5	52.31
PP4	9.6	1.5	3.0	-	-	1.6	29.21

^a Ph: phenanthrene; A: anthracene; Ft: fluoranthene; P: pyrene; C+T: chrysene + triphenylene; BaA: benz(a)anthracene; BFts: benzo(b)fluoranthene + benzo(j)fluoranthene + benzo(k)fluoranthene + benzo(a)fluoranthene; BPs: benzo(e)pyrene + benzo(a)pyrene; BPer: benzo(ghi)perylene; IP: indeno(1,2,3-cd)pyrene; 2-MN: 2-metilnaphthalene; 1-MN: 1- metilnaphthalene.

The most outstanding pair of isomers is that comprising fluoranthene and pyrene, whose concentrations almost always maintain the same proportion, between 1.2 and 1.5, independently of their concentrations, fluoranthene being slightly more abundant. It is also worth pointing out that, when the concentrations of fluoranthene and pyrene are lower than 1

µg/kg, neither benzo(a)fluoranthenes nor benzopyrenes nor PAHs with higher molecular weight are detected.

Finally, Table 2 also shows that the concentrations of benzo(a)fluoranthenes and benzopyrenes on the one hand, and of indeno(1,2,3-cd)pyrene and benzo(ghi)perylene on the other hand, are of the same order.

There is also a similar trend in the concentrations of alkylated PAHs (Table 2), as can be seen for the 2 monomethylnaphthalenes; the ratio of their concentrations ranged between 1.2 and 1.6. With regard to dimethylnaphthalenes, it can be observed (Table 1) that their concentrations are lower than those of monomethyl derivatives. Whereas the levels of 2,6-, 1,7-, and 1,6-dimethylnaphthalenes are, in general, very similar, the rest of the isomers are in lower concentrations, especially 1,5-dimethylnaphthalene. It must also be pointed out that, although the individual concentrations of both monomethyl- and dimethyl-naphthalenes are lower than that of naphthalene, the same is not observed for the total concentrations of both groups of alkyl derivatives. So, in the case of monomethyl derivatives, their sum is higher than naphthalene in AS5 (the sample with the highest PAH concentrations); whereas in the rest of the samples this sum could be considered as being of the same order as the concentration of naphthalene. On the other hand, the total of dimethylnaphthalenes is always higher than both the amount of naphthalene and the sum of monomethylnaphthalenes.

If alkyl derivatives of phenanthrene and anthracene are considered, it is observed in Table 2 that the concentrations of 3- and 9-methylphenanthrenes are very similar, and that the level of 2-methylanthracene is always lower than that of methylphenanthrenes; this could be expected given that the concentration of anthracene is also below that of phenanthrene. As for the sum of monomethyl-phenanthrenes/-anthracenes, it can be said that, in general, this is of a similar order to the concentration of phenanthrene. In relation to the dimethyl derivatives, unlike that

observed for dimethylnaphthalenes, the total is lower than the sum of monomethyl derivatives and than the concentration of phenanthrene.

Finally, the individual concentrations of methyl-fluoranthenes/-pyrenes and also their sum are always lower than the concentrations of their parent PAHs. Moreover, it was observed that when the levels of fluoranthene and pyrene are below 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, their alkyl derivatives are hardly detected.

If the results here obtained are compared with those of other authors, it must be taken into account that not only does the number of PAHs considered vary from one study to another, but also that this number is always lower than in this work. Anyway, it could be said that the levels reported here are, in general, lower than those found in other Spanish commercial cheeses smoked in a traditional way, where total PAH concentrations ranged from 36.31 to 1,037.23 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Guillén and Sopelana, 2004). Therefore, these results confirm that, if the smoking process is controlled, it is possible to reduce the PAH levels of smoked cheese and obtain a safe product, without renouncing either the artisanal character or the sensory properties of the product.

To evaluate if there was a relationship between the type of vegetable matter used in the smoking process and the PAH profile of the smoked cheeses, the ratios between the concentrations of certain PAHs have been calculated and are shown in Table 3. The first four ratios make reference to relations between some PAHs and their alkylated derivatives (alkylation ratios), whereas the others (5-8) concern pairs of PAHs which differ in one aromatic ring (aromaticity ratios). It can be observed from this table that the values corresponding to the alkylation ratios are somewhat higher in the cheeses smoked with dry prickly pear than in those smoked with almond shells, especially in the case of ratio 4 (phenanthrene/dimethylphenantrenes), which ranges from 2.4 to 8.1 in the former and from 0.8 to 1.9 in the latter. This indicates that the formation of alkylated PAHs during the process of

smoke generation, particularly of dimethylphenanthrenes, seems to be more favoured when almond shells are used, resulting in higher amounts of these derivatives in relation to their parent PAHs. Furthermore, it can also be noticed that the values of ratios 1 and 2 in the cheeses manufactured by different artisans are less variable in the samples smoked with dry prickly pear; in contrast, in the case of ratios 3 and 4, the variation is lower in the cheeses smoked with almond shells. Otherwise, it can be said that the values of the alkylation ratios reflect all that commented above on alkylated derivatives.

As pointed out before, Table 3 also shows some ratios between pairs of PAHs which differ in one aromatic ring (5-8). These PAHs have been selected taking into account one of the mechanism proposed for the formation of PAHs during the pyrolysis of wood. According to this mechanism, during combustion at high temperatures and with a relatively low oxygen content, organic matter breaks down, leading to the formation of smaller fragments, most of them free radicals, which recombine to form PAHs as the temperature increases. Thus, the successive recombination of radicals such as acetylene (C_2) and 1,3-butadiene (C_4) results in the formation of non substituted PAHs (Badger et al., 1960; Crittenden and Long, 1976) and, once the lightest PAHs have been formed, heavier PAHs can be formed from these latter by addition of more small units to aryl radicals (Frenklach and Warnatz, 1987). In fact, both the formation of phenanthrene from naphthalene and of benzo(a)pyrene from pyrene have been pointed out by some authors (Möhler, 1980).

It can be observed from Table 3 that, in samples AS5 and PP3, where the total PAH concentrations are the highest among the cheeses smoked with almond shells and with dry prickly pear respectively, the values of ratios 5 and 6 are lower than in the rest of the samples smoked with each type of vegetal matter. This indicates that the formation of both acenaphthylene and phenanthrene from naphthalene is favoured in the smoke generation process applied to cheeses AS5 and PP3. Besides, in these same samples, both ratios are very

similar. In contrast, in the rest of the samples smoked with each type of vegetal matter, the higher values of these two ratios point to a lower trend of naphthalene to form heavier PAHs;

Table 3. Ratios between the concentrations of some pairs of PAHs in the different cheeses studied.

Ratio	AS5	AS6	AS4	AS2	PP3	PP5	PP2	PP4
Alkylation ratios ¹								
1- N/MNs	0.7	0.8	1.0	1.3	1.0	1.4	1.1	1.1
2- N/DMNs	0.4	0.8	0.7	0.8	0.9	1.0	0.7	0.8
3- Ph/MPhs	1.1	0.6	0.9	0.6	1.6	0.7	1.0	0.7
4- Ph/DMPs	1.5	0.8	1.9	1.6	8.1	4.0	2.4	-
Aromaticity ratios ²								
5- N/Al	2.2	16.4	5.9	9.4	3.6	14.1	31.8	14.8
6- N/Ph	2.1	7.1	4.0	4.3	2.2	3.3	4.4	4.1
7- Ph/Pyr	8.2	9.8	6.4	6.3	10.0	4.4	7.6	5.2
8- Pyr/B(a)pyr	11.5	-	-	-	22.6	-	-	-

¹ N: naphthalene; MNs: methylnaphthalenes; DMNs: dimethylnaphthalenes; Ph: phenanthrene; MPhs: methylphenanthrenes; DMPs: dimethylphenanthrenes

² N: naphthalene; Al: acenaphthylene; Ph: phenanthrene; Pyr: pyrene; B(a)pyr: benzo(a)pyrene

on the other hand, the lower values of ratio 6 in relation to 5 suggest more formation of phenanthrene against acenaphthylene with both vegetal matters. Finally, it can also be noticed that, in general, the values of ratio 5 in the cheeses smoked with almond shells, which range from 2.2 to 16.4, are lower than in the cheeses smoked with dry prickly pear, which vary between 3.6 and 31.8, revealing a higher trend to form acenaphthylene in the pyrolysis process of almond shells.

In connection with ratio 7, which would express the formation of pyrene from phenanthrene, it could be said that its values are in the same range in the cheeses smoked with almond shells (6.3-9.8) as in those smoked with dry prickly pear (4.4-10.0). Finally, it should be pointed out that the value of ratio 8 in sample AS5 (11.5) is lower than in sample PP3 (22.6), showing a higher proportion of benzo(a)pyrene in the cheese smoked with almond shells.

Bearing in mind all commented above, it can be concluded that, in spite of the differences in the smoking processes applied by different artisans and in the vegetable matter used for smoke generation, the PAH profile of all the cheeses studied could be considered quite regular. In fact, there are some relations between certain PAHs which remain practically constant from one sample to another, what could be useful to predict or estimate the levels of some PAHs from others. Nevertheless, it must be pointed out that the relation existing between the concentrations of phenanthrene and anthracene, seem to be influenced to a certain extent by their concentrations. In contrast, there are also others isomers, such as fluoranthene and pyrene, which maintain the same relation in all samples, irrespective of the smoking process and of their concentrations. The concentration level also seems to affect somehow the formation of acenaphthylene and phenanthrene from naphthalene.

However, despite the numerous similarities found among all the samples studied, it must be remarked that there are also some differences between the PAH profiles of the cheeses smoked with almond shells and with dry prickly pear. Thus, dimethyl derivatives of both naphthalene and phenanthrene are slightly more abundant in the cheeses smoked with almond shells. These differences in the content of alkylated PAHs infer that during the pirolization of dry prickly pear alkyl derivatives are produced to a lesser extent than in the pirolization of almond shells, influencing, in turn, the proportion of these compounds in the smoked cheeses. In fact, it has already been observed that, in the same combustion conditions, some woods

produce smoke with higher concentrations of alkylated PAHs than others (Guillén et al., 2000). From these results it could be said that nature of the vegetal matter used for smoking seems to affect to a certain extent the formation of some PAHs, and influence on the PAH profile obtained, especially on those compounds of low molecular weight.

In order to study if the apparent differences observed between the two groups of cheeses were statistically significant, a T-Student analysis was used to compare the values of ratios 1 to 7 from Table 3. The results obtained did not show any significant differences between both groups of samples for any of the ratios considered, probably due to the high variability existing among the cheeses smoked with the same vegetal matter but produced by different artisans. This variability in the PAH concentration level of the cheeses studied could be attributed to the smoking conditions applied by each artisans. The factors that determine the PAH level in smoked foods are very numerous; these include the vegetable matter used to produce the smoke and all the parameters involved in the pyrolysis process, the composition of the food submitted to the smoking process, the way this process is carried out and its intensity. In order to discuss possible relations between the vegetable matter used, smoking degree of food and its contamination by PAHs, Table 4 shows the concentrations of some groups of typical smoke components in the headspace of these cheeses, which are related to the smoking degree, together with the concentrations of heavy, light and total PAHs. Among the smoke components the group of carbonyl derivatives (group 1) includes: furanmethanol, cyclotene and maltol; the group of phenol and derivatives (group 2): phenol, 2-methylphenol, 4- + 3-methylphenols, 2,6-dimethylphenol, 2,3-dimethylphenol, 2,4- + 2,5-dimethylphenols, 2,4,6-trimethylphenol, 2-ethylphenol and 4-propylphenol; the group of guaiacol (2-methoxyphenol) and derivatives (group 3): guaiacol, 4-methylguaiacol, 4-ethylguaiacol, 4-vinylguaiacol, 4-(2-propenyl)-guaiacol (eugenol), 4-propylguaiacol and two isomers of 4-(1-propenyl)-guaiacol (isoeugenol); and in the group of syringol (2,6-dimethoxyphenol) and

derivatives (group 4) are found: syringol, 4-methylsyringol, 4-ethylsyringol and three isomers of 4-(2-propenyl)-syringol.

Table 4. Concentrations of some groups of typical smoke components in the headspace of the cheeses studied, expressed in area counts/10⁵, together with the concentrations of heavy, light and total PAHs, given in µg/kg of outer part

Sample	SMOKE COMPONENTS					PAHs		
	Carb. der. ¹	Phenolic derivatives			Total	Heavy ²	Light ³	Total
AS5	66.9	1,155.5 ⁴	1,778.1 ⁵	146.3 ⁶	3,146.8	5.25	734.30	739.55
AS4	51.6	530.5	1,685.4	112.2	2,379.6	0.74	84.97	85.71
AS6	35.1	444.6	933.1	60.3	1,473.1	0.20	105.32	105.52
AS2	10.9	108.4	326.7	38.7	484.7	0.19	42.27	42.46
PP3	116.8	1,098.6	1,722.9	544.6	3,483.0	1.31	191.80	193.11
PP4	26.2	342.8	292.1	89.5	750.6	0.28	28.93	29.21
PP5	11.0	271.1	319.5	34.0	635.6	0.38	70.37	70.75
PP2	27.2	161.8	225.1	64.2	478.3	0.14	52.17	52.31

¹ Carb. der.: Carbonyl derivatives (group 1)

² Heavy PAHs: from benz(a)anthracene onwards

³ Light PAHs: from naphthalene to benz(a)anthracene

⁴ Group 2: Phenol and derivatives

⁵ Group 3: Guaiacol (2-methoxyphenol) and derivatives

⁶ Group 4: Syringol (2,6-dimethoxyphenol) and derivatives

The influence of the vegetable matter is very noticeable in the samples submitted to the highest degree of smoking intensity. It is evident that samples AS5 and PP3, having a similar total content of smoke components and, in consequence, a similar smoking degree, have

different concentrations both of heavy (from benz(a)anthracene onwards) and of light (from naphthalene to benz(a)anthracene) PAHs. However this influence is not clear in the samples submitted to a lower smoking degree.

Among the cheeses smoked with the same type of vegetable matter, the smoking degree seems to influence mainly the concentration of the heavy PAHs. So, in general, as Table 4 shows, decreasing values in total smoke components concentrations are associated with decreasing values in heavy PAH concentrations.

In relation to the presence of carcinogenic PAHs, it must be pointed out that there are compounds with different degree of carcinogenicity in all the samples studied. Thus, naphthalene, recently considered as “*possibly carcinogenic to humans*” by the IARC (group 2B) (IARC, 2002), and benz(a)anthracene, considered as “*probably carcinogenic to humans*” by this same organization (group 2A) (IARC, 1983), are present in the outer part of all the cheeses studied. It should be mentioned that, whereas the level of benz(a)anthracene is very low in all cases (0.03-1.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$), naphthalene, instead, is the most abundant PAH in practically all cheeses. Despite naphthalene not being considered carcinogenic for many years, in the year 2000 it was shown that this PAH showed carcinogenic activity in rats (NTP, 2002); in consequence, international agencies such as IARC or USEPA reclassified this compound, considering it as a potential carcinogen in humans (Preuss et al., 2003). Therefore, although the determination of this compound is not usually made and though, until now, no limit for its concentration in food has been suggested in international law, its presence cannot be ignored.

As well as naphthalene and benz(a)anthracene, other PAHs with higher molecular weight considered as “*possibly carcinogenic to humans*” by the IARC have been found in the outer part of samples AS5 and PP3 in very low concentrations. Among these, benzofluoranthenes

or indeno(1,2,3-cd)pyrene can be mentioned (IARC, 1983), even though these latter are in very low concentrations (0.05-0.68 µg/kg).

It must also be taken into account that although most of the alkylated PAHs, especially those derived from light PAHs, are not classified as for their carcinogenicity, some authors have commented that the presence of alkyl groups can confer or intensify the carcinogenic potential of PAHs (Irwin et al., 1998). However, until now, these compounds are also completely ignored in international food regulations.

Benzo(a)pyrene, one of the most carcinogenic PAHs according to different classifications (Guillén and Sopelana, 2003), and recently included by the IARC in group 1 (carcinogen to humans) (Straif et al., 2005), has been identified in two of the samples (AS5 and PP3), in concentrations of 0.51 and 0.08 µg/kg, respectively. These values are far from the limit in the rind of ripened smoked cheese established by Spanish law, which is 10 µg/kg (Orden de 29 de noviembre, 1985). On the other hand, if the concentrations of benzo(a)pyrene in the cheeses here studied are compared with those reported by other authors, it must be taken into account that, in some cases, data correspond to the rind of the cheeses, the most contaminated zone, whereas, in other cases, the rind has been removed before taking the sample or even the rind is taken together with the paste. In spite of this, it could be said that, in general, the values here obtained are in the range of those found by other authors in commercial or traditionally smoked cheeses, which range from 0.04 to 7.8 µg/kg (Potthast, 1977; Lintas et al., 1979; Joe et al., 1984; De Martin et al., 1998; Michalski and Germuska, 2003; Pagliuca et al., 2003; Anastasio et al., 2004).

4. CONCLUSIONS

As mentioned above, the results presented here correspond only to the outer part of the cheeses, which is the most contaminated zone. Taking into account, on the one hand, the results of a previous study (Guillén and Sopelana, 2004), according to which benzo(a)pyrene

was concentrated almost exclusively in the exterior part of the cheese piece and, on the other hand, the proportion of this part in relation to the whole cheese, the benzo(a)pyrene concentrations corresponding to the whole product were calculated. Thus, considering that the percentages of the external part are 32.2% in AS5 and 37.1 % in PP3, the concentrations of benzo(a)pyrene per kg of whole cheese would be 0.16 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in AS5 and 0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in PP3. These values are much lower than the maximum of 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ recently established by the European Union for smoked meat products and some smoked fish products (Regulation N° 208/2005 of 4 of February, 2005), but it must be emphasized that this Regulation makes no reference to smoked cheese. It is also worth pointing out that the concentration of benzo(a)pyrene in PP3 complies with the maximum level of 0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$ permitted in food smoked with smoke flavourings (Council Directive 88/388/EEC of 22 of June, 1988), whereas in AS5, the amount of benzo(a)pyrene (0.16 $\mu\text{g}/\text{kg}$) is only slightly higher than this limit. Anyway, it must be taken into account that this legal matter does not concern cheeses smoked with smoke.

ACKNOWLEDGEMENT

This work has been supported by the Ministerio de Ciencia y Tecnología (AGL2006-01381; CAL02-075-C3-2) and the Universidad del País Vasco (GIU05/25). G. Palencia thanks the Universidad del País Vasco for a predoctoral fellowship. The authors thank the Palmero artisans and the Consejo Regulador de la Denominación de Origen Protegida de Queso Palmero for the cheese samples.

REFERENCES

- Anastasio, A., R. Mercogliano, L. Vollano, T. Pepe, and M. L. Cortesi. 2004. Levels of benzo[a]pyrene (BaP) in "Mozzarella di Bufala Campana" cheese smoked according to different procedures. *J. Agric. Food Chem.* 52: 4452-4455.
- Badger, G. M., R. W. L. Kimber, and T. M. Spotswood. 1960. Mode of formation of 3,4-benzopyrene in human environment. *Nature* 187: 663-665.
- Bosset, J. O., U. Bütikofer, O. Dafflon, H. Koch, L. Scheurer-Simonet, and R. Sieber. 1998. Teneur en hydrocarbures aromatiques polycycliques de fromages avec et sans flaveur de fumée. *Sci. Aliments* 18: 347-359.
- Council Directive 88/388/EEC of 22 of June of 1988 on the approximation of the laws of the Member States relating to flavorings for use in foodstuffs and to source materials for their production. *O.J.E.U. L* 184, 15.07.1988.
- Crittenden, B. D., and R. Long. 1976. The mechanism of formation of polynuclear aromatic compounds in combustion systems. Pages 209-223 in *Carcinogenesis-A Comprehensive Survey*. Vol. 1. R. I. Freudenthal and P. W. Jones, ed. Raven Press, New York, USA.
- De Martin, S., P. Matcovich, D. Nanut, S. Zulian, and V. Siardi. 1998. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in smoked foods. *Boll. Chim. Igien., Parte Sci.* 49: 177-181.
- Freitas, C., and F. X. Malcasa. 2000. Microbiology and biochemistry of cheeses with Appellation d'Origine Protégée and manufactured in the Iberian Peninsula from ovine and caprine milks. *J. Dairy Sci.* 83: 584-602.
- Frenklach, M., and J. Warnatz. 1987. Detailed modelling of PAH profiles in a sooting low-pressure acetylene flame. *Comb. Sci. and Technol.* 51: 265-283.

- Guillén, M. D., and P. Sopelana. 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbons in diverse foods. Pages 175-198 in *Food Safety: contaminants and toxins*. J. P. F. D’Mello, ed. CABI Publishing, Oxon, United Kingdom.
- Guillén, M. D. and P. Sopelana. 2004. Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked cheese. *J. Dairy Sci.* 87: 556-564.
- Guillén, M. D., P. Sopelana, and M. A. Partearroyo. 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid smoke flavorings obtained from different types of wood. Effect of storage in polyethylene flasks on their concentrations. *J. Agric. Food Chem.* 48: 5083-5087.
- Guillén, M. D., M. L. Ibargoitia, P. Sopelana, G. Palencia, and M. Fresno. 2004a. Components detected by means of solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry in the headspace of artisan fresh goat cheese smoked by traditional methods. *J. Dairy Sci.* 87: 284-299.
- Guillén, M. D., M. L. Ibargoitia, P. Sopelana, and G. Palencia. 2004b Components detected by headspace-solid phase microextraction in artisanal fresh goat’s cheese smoked using dry prickly pear (*Opuntia ficus indica*). *Lait* 84: 385-397.
- IARC. 1983. Polynuclear aromatic compounds, part 1: chemical, environmental and experimental data. In *IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans*. Vol. 32. IARC, Lyon, France.
- IARC. 2002. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. In *IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans*. Vol. 82. IARC, Lyon, France.
- Irwin, R. J., M. VanMouwerik, L. Stevens, M. D. Seese, and W. Basham. 1998. *Environmental Contaminants Encyclopedia*. National Park Service, Water Resources Division, Fort Collins, Colorado. Distributed on the Internet via the Nature Net portion of

the Park Service Home Page (www.nps.gov). Also distributed by the NPS and/or NTIS via CD-ROM.

Joe, F. L., Jr., J. Salemme, and T. Fazio. 1984. Liquid chromatographic determination of trace residues of polynuclear aromatic hydrocarbons in smoked foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 67: 1076-1082.

Lintas, C., M. C. De Matthaëis, and F. Merli. 1979. Determination of benzo[a]pyrene in smoked, cooked and toasted food products. *Food Cosmet. Toxicol.* 17: 325-328.

Maga, J. A. 1988. *Smoke in Food Processing*; CRC Press: Boca Raton, Florida, USA.

Michalski, R. and R. Germuska. 2003. The content of benzo(a)pyrene in Slovakian smoked cheese. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 12: 33-37.

Möhler, K. 1980. *El ahumado*; Acribia: Zaragoza, Spain.

National Toxicology Programme. 2002. NTP technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of naphthalene in F344/N rats (inhalation studies). NIH publication No. 01-4434.

Orden de 29 de noviembre de 1985 por la que se aprueban las normas de calidad para quesos y quesos fundidos destinados al mercado interior. B.O.E. 292, 6.12.1985.

Orden de 31 de agosto de 2001 por la que se ratifica el Reglamento de la Denominación de Origen "Queso Palmero" y de su Consejo Regulador. B.O.E. 218, 11.9.2001.

Pagliuca G., T. Gazzotti, E. Zironi, G. P. Serrazanetti, D. Mollica, and R. Rosmini. 2003. Determination of high molecular mass polycyclic aromatic hydrocarbons in a typical Italian smoked cheese by HPLC-FL. *J. Agric. Food Chem.* 51: 5111-5115.

Panalaks, T. 1976. Determination and identification of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked and charcoal-broiled food products by high pressure liquid chromatography and gas chromatography. *J. Environ. Sci. Health B11*: 299-315.

- Potthast, K. 1977. Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products. An application of a new method. *Acta Aliment. Pol.* 3: 195-201.
- Preuss, R., J. Angerer, and H. Drexler. 2003. Naphthalene-an environmental and occupational toxicant. *Int. Arch. Occ. Env. Health.* 76: 556-576.
- Regulation (EC) N° 208/2005 of the Commission of 4 of February of 2005 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards polycyclic aromatic hydrocarbons. *O.J.E.U. L* 34, 8.02.2005.
- Riha, W. E., W. L. Wendorff, and S. Rank. 1992. Benzo(a)pyrene content of smoked and smoked-flavored cheese products sold in Wisconsin. *J. Food Prot.* 55: 636-638.
- Straif, K., R. Baan, Y. Grosse, B. Secretan, F. El Ghissassi and V. Cogliano. 2005. Carcinogenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *The Lancet* 6: 931-932.

Manuscrito 5

CONTAMINATION OF CHEESE BY PAHS IN TRADITIONAL SMOKING. INFLUENCE OF THE POSITION IN THE SMOKEHOUSE ON THE CONTAMINATION LEVEL OF SMOKED CHEESE.

M. D. Guillén*, G. Palencia*, M. L. Ibargoitia*, M. Fresno† and P. Sopelana*

*Tecnología de Alimentos, Facultad de Farmacia, Universidad del País Vasco, Paseo de la Universidad 7, 01006, Vitoria, Spain.

†Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, La Laguna, Santa Cruz de Tenerife, Spain.

Journal of Dairy Science, **2011**, 94, 1679-1690.

1 ABSTRACT

2 This paper sets out to determine the PAH contamination degree of a traditionally smoked
3 cheese: Herreño cheese, which comes from one of the Canary Islands. Its PAH profile is
4 thoroughly studied by means of gas chromatography-mass spectrometry in SIM mode, and
5 compared with that of an unsmoked cheese. Furthermore, a parameter not previously studied
6 is evaluated, namely the influence of the position of the individual cheeses in the smokehouse
7 on their PAH contamination level. Heavy PAHs, among which are included most of the
8 carcinogens, are very scarce and their concentrations low. In fact, benz(a)anthracene, together
9 with chrysene+triphenylene, are the only heavy PAHs detected in all the smoked samples
10 studied. The concentration of benzo(a)pyrene, detected only in one of the samples, is below
11 the limit established in Spain for the rind of smoked cheese. In contrast, high concentrations
12 of light PAHs have been found, especially of naphthalene and its alkylderivatives, whose
13 impact on human health is not yet well established. The results derived from the analysis of
14 the PAH profile suggest the potential usefulness of certain ratios between some pairs of PAHs
15 (phenanthrene/anthracene, naphthalene/acenaphthylene) in order to provide information on
16 the PAH contamination source. Furthermore, differences have been found depending on the
17 position of the cheeses in the smokehouse, those placed in the path followed by the smoke
18 being more contaminated. Therefore, the findings of this study could help in improving the
19 design of smokehouses, in order to reduce the PAH contamination degree of smoked cheese.

20

21 **Key words:** Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, smoked Herreño cheese, gas
22 chromatography-mass spectrometry, position in the smokehouse.

1 **1. INTRODUCTION**

2 Traditionally manufactured food products are, in general, much appreciated by consumers.
3 Consequently, there is a great interest in characterizing these types of products and
4 standardizing their production process to establish the conditions which best obtain
5 homogeneous and high-quality products. What is more, both producers and consumers are
6 increasingly aware of the need for food safety, especially when it undergoes technological
7 treatments that can result in the formation of contaminating compounds. In particular,
8 smoking, which confers food specific sensory properties, as well as acting as a preservation
9 treatment, can lead to the contamination of food with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
10 (**PAHs**) if it is not sufficiently controlled (Maga, 1988). PAHs include compounds with a
11 wide range of molecular weights, which can be divided into light (from naphthalene to
12 benz(a)anthracene) and heavy PAHs (from benz(a)anthracene onwards). The risk of
13 contamination with PAHs has special importance in the case of fatty foods such as cheese,
14 due to the lipophilic nature of these contaminants.

15 Cheese can be smoked either by using smoke flavorings or by traditional smoking, although
16 the use of smoke flavorings for the smoking of cheese is not allowed in Spain. Traditional
17 smoking involves smoke generation and the random deposit of its components on the cheese
18 surface. This methodology is used not only by artisans but also in certain cheese factories. It
19 is widely known that the PAH contamination degree reached by cheese or any food product in
20 traditional smoking depends on very different factors, such as the temperature, the oxygen
21 content, the vegetable matter used for smoke generation or the composition of the food
22 product (Maga, 1988; Bosset et al., 1998; Pagliuca et al., 2003; Anastasio et al., 2004; Guillén
23 et al., 2007).

24 Taking as an example of a cheese smoked traditionally in a factory, this paper studies the
25 PAH contamination degree of Herreño cheese. This cheese comes from El Hierro Island, the

1 smallest of the Canary Islands, and occupies an important position in the Canary Islands
2 market for smoked soft cheeses; however, there are hardly any studies concerning this product
3 (Fresno et al., 2004). This cheese has been traditionally manufactured with milk from
4 different animals, since flocks on this island contain more than one species. This particular
5 cheese is produced from a mixture of goat, cow and sheep milk, either pasteurized or raw. It is
6 usually marketed as a fresh or a soft cheese, though the demand for ripened cheeses is
7 bringing about the recovery of ripened Herreño cheese. Herreño cheese can be smoked or
8 unsmoked. The smoking process, which is usually performed one or two days after making
9 the cheese (Fresno et al., 2004), uses fig tree wood (*Ficus carica*) and dry prickly pear
10 (*Opuntia ficus indica*), common vegetable materials which are typical of the islands and
11 contribute specific characteristics to these cheeses. The chemical composition of these two
12 vegetable materials has scarcely been studied (Rodríguez-García et al., 2007).

13 In this paper, the PAH content of some smoked Herreño cheeses is studied and compared
14 with that of an unsmoked one. This will allow us to know how traditional smoking affects the
15 PAH contamination level of this kind of cheese.

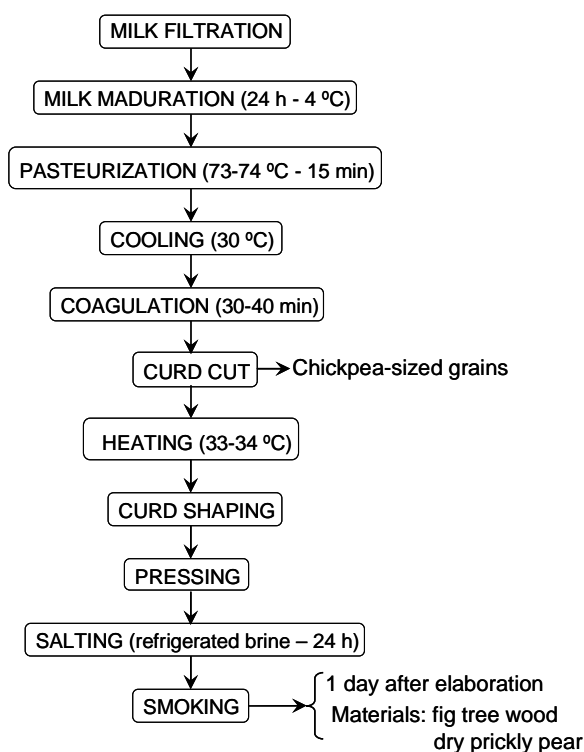
16 The Scientific Committee on Food (SCF) reviewed the presence and toxicity of PAHs in
17 food and issued an opinion on 4 December 2002 (SCF, 2002). The SCF concluded that
18 benzo(a)pyrene may be used as a marker of occurrence and effect of the carcinogenic PAHs
19 in food. Afterwards, the Commission asked Member States to monitor PAHs (and in
20 particular the 15 priority substances identified by SCF as potentially genotoxic and
21 carcinogenic to humans) in Commission Recommendation 2005/108/EC. The European Food
22 Safety Authority (EFSA) collected the data submitted in the framework of this
23 recommendation and issued a Report where it was stated that the conclusion made by SCF
24 that benzo(a)pyrene is a good indicator for PAH occurrence could not be demonstrated by the
25 monitoring data from the Member States. This statement was based on the fact that

1 benzo(a)pyrene was not detected in about 30% of the samples where other PAHs among the
 2 15 SCF priority ones were detected. Therefore, nowadays, benzo(a)pyrene alone is not
 3 considered a suitable indicator for the occurrence and toxicity of genotoxic and carcinogenic
 4 PAHs. Taking this into account, the study includes most of the PAHs that can appear in
 5 smoked foods, both light and heavy compounds, together with their alkylderivatives.
 6 The other objective of the study was to evaluate the influence of position of cheese in the
 7 smokehouse on the PAH contamination as there are no studies on this topic.

8 2. MATERIALS AND METHODS

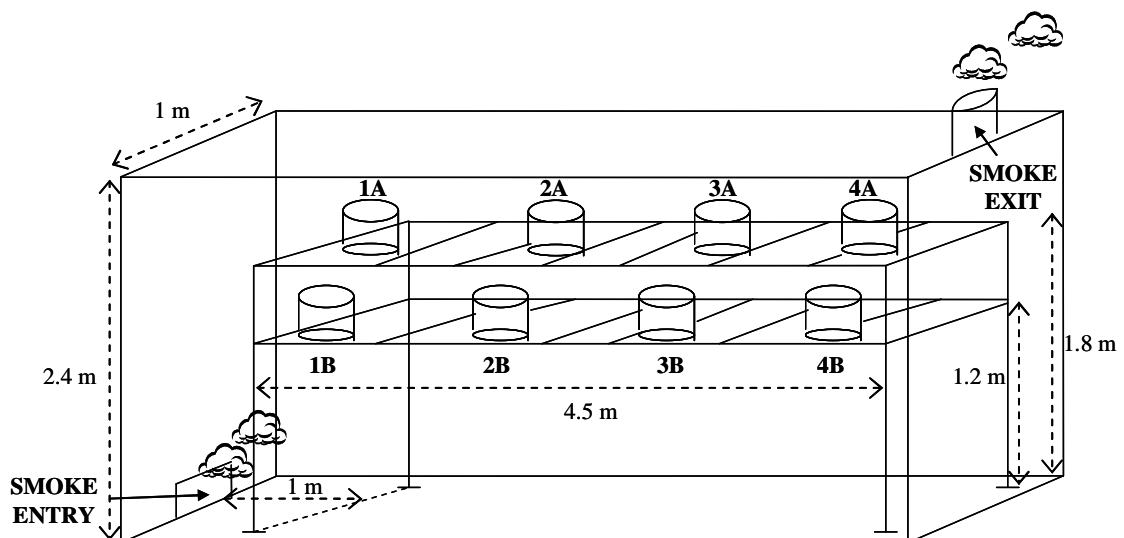
9 2.1. Samples

10 The samples subject of study were six smoked Herreño cheeses, named 1A, 2A, 4A, 1B, 3B
 11 and 4B, and another unsmoked one. The weight of the cheeses varied between 2 and 3 kg. A
 12 scheme of the elaboration process of Herreño cheese (Fresno et al., 2004) is shown in Figure
 13 1.



23 **Figure 1.** Scheme of the elaboration process of Herreño cheese (Fresno et al., 2004)

1 Cheeses were placed on metal grilles at two different heights (1.20 and 1.80 m from the
 2 floor), both of them above the smoke entry hole. The cheeses placed on the upper part were
 3 called A and those in the lower part B. Both cheeses A and B were assigned numbers from 1
 4 to 4 according to their distance to the smoke entry. Thus, cheeses with number 1 were the
 5 nearest to the smoke entry (approximately 1 m distance) and those with number 4 the most
 6 distant (approximately 5.5 m). Considering that smoke tends to go up, it was thought that A
 7 cheeses might be more exposed to the smoke action than B; for this reason, and with the aim
 8 of obtaining a similar smoking degree, B cheeses were kept in the chamber approximately 4
 9 hours and A cheeses only 2. The situation of the studied cheeses in the smokehouse can be
 10 seen in Figure 2.



20 **Figure 2.** Scheme of the smokehouse for the smoking of the cheeses and position of the
 21 cheeses studied.

22 All the cheeses were manufactured at the same time, with milk from the same batch which,
 23 as is usual on El Hierro Island, was a mixture of goat, cow and sheep milk. The
 24 manufacturing process was carried out in a local factory, following the traditional methods of
 25 production of this type of cheese.

1 The cheeses were smoked at the same time, in a smokehouse with external smoke
2 generation. The smoke used was produced by the combustion of a mixture of fig tree wood
3 (*Ficus carica*) and dry prickly pear (*Opuntia ficus indica*) in a combustion chamber next to
4 the smoking chamber. The distance between the smoke source and the smokehouse was
5 approximately 1 m. The smokehouse (see Figure 2) consists of a small-sized room with two
6 holes: one for the smoke entry in the lower part of the middle of one wall and another for the
7 smoke exit (chimney) in the ceiling, close to the middle of the opposite wall. During the
8 smoking process, the smoke was continuously being generated and expelled to the
9 atmosphere through the chimney.

10 The temperature of the smoke was 47 °C and the temperature in the smokehouse
11 approximately 40 °C. The temperature of the cheeses, which was initially 4 °C, increased, by
12 approximately, 4.6 °C.

13 The samples used for the study of PAHs were those placed at the ends of the grilles (1A,
14 1B, 4A and 4B), as well as one cheese A and another B chosen among those placed in the
15 middle. The number of experimental trials was two. Two samples were taken in each trial and
16 these were analyzed in duplicate.

17 **2.2. Preparation of the samples**

18 The samples for the study were prepared 10 days after they were smoked. Taking into
19 account that the cheese region exhibiting a higher PAH contamination degree was the outer
20 part (Guillén and Sopelana, 2004a), the portions studied were taken from this part, to a depth
21 of approximately 1 cm, and then chopped. The outer part of the cheeses accounted for a
22 percentage relative to the whole cheese ranging from 49 to 62%. Two aliquots of
23 approximately 20 g were taken from each cheese after chopping the samples.

2.3. *Reagents and Materials*

The solvents employed for PAH analysis were cyclohexane and methanol, both HPLC grade (99.9+%). Other reagents and materials used were potassium hydroxide, sodium chloride, anhydrous sodium sulphate, sodium tungstate dehydrate and Supelclean LC-Si SPE (Solid Phase Extraction) tubes 3 mL (500 mg). All solvents, reagents and materials mentioned are commercially available from Aldrich (Steinheim, Germany), Panreac (Barcelona, Spain) and Supelco (Bellefonte, PA, USA).

2.4. *PAH standards*

The PAH standards used were the following: a commercial mixture of PAH standards dissolved in a mixture of dichloromethane:benzene (75:25), containing naphthalene, acenaphthylene, acenaphthene, fluorene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, benzo(c)phenanthrene, benz(a)anthracene, chrysene, 7,12-dimethylbenz(a)anthracene, benzo(b)fluoranthene, benzo(j)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, benzo(a)pyrene, indeno(1,2,3-cd)pyrene, dibenz(a,h)anthracene, benzo(ghi)perylene, dibenzo(a,l)pyrene, dibenzo(a,i)pyrene and dibenzo(a,h)pyrene, in concentrations of approximately 500 µg/mL; commercial individual cyclohexane solutions of 1,7-dimethylnaphthalene, 1,4-dimethylnaphthalene, 1,5-dimethylnaphthalene, 1-methylphenanthrene, 3,6-dimethylphenanthrene, 2,3-dimethylantracene, 9,10-dimethylphenanthrene, 2-methylfluoranthene, 1-methylfluoranthene, 11H-benzo(c)fluorene, 1-methylpyrene, 6-methylbenz(a)anthracene, 7-methylbenz(a)anthracene, 1-methylchrysene, 2-methylchrysene, 3-methylchrysene, 4-methylchrysene, 5-methylchrysene, 6-methylchrysene, dibenz(a,j)anthracene, benzo(b)chrysene, picene, anthanthrene, coronene and dibenzo(a,e)pyrene, in concentrations of 10 µg/mL approximately; and a mixture of pure PAHs dissolved in dichloromethane, containing 1-methylnaphthalene, 2-methylnaphthalene, 1,6-dimethylnaphthalene, 2,6-dimethylnaphthalene, 2,3-dimethylnaphthalene, *o*-terphenyl, 2-

1 methylanthracene, 9-methylanthracene, *m*-terphenyl, *p*-terphenyl, 11H-benzo(a)fluorene,
2 11H-benzo(b)fluorene, benzo(e)pyrene and perylene, in concentrations ranging from 100 to
3 247.5 µg/mL.

4 Naphthalene-d₈, acenaphthene-d₁₀, phenanthrene-d₁₀, pyrene-d₁₀, *p*-terphenyl-d₁₄, chrysene-
5 d₁₂, perylene-d₁₂ and benzo(ghi)perylene-d₁₂ were used as internal standards. The purity of
6 these standards ranged from 97 to 99.5%.

7 All the above mentioned standards were used in the identification and quantification of the
8 PAHs present in the samples. All pure standards and solutions were obtained from Sigma,
9 Aldrich (Steinheim, Germany), Supelco (Bellefonte, Pennsylvania, USA) and Symta (Madrid,
10 Spain).

11 **2.5. Determination of PAHs**

12 The methodology employed for the study of the samples was the same described elsewhere
13 (Guillén and Sopolana, 2004a). This basically includes the addition of a mixture of deuterated
14 internal standards to the ground cheese, extraction of fat with cyclohexane in an ultrasonic
15 bath, filtration, alkaline treatment of the fat with boiling methanolic potassium hydroxide for
16 4 hours under reflux, extraction of PAHs by shaking with cyclohexane in a separator funnel,
17 washings of the extract, clarification with sodium tungstate, filtration, drying with anhydrous
18 sodium sulphate, and purification with solid phase extraction tubes filled with silica. The final
19 extract was studied by gas chromatography-mass spectrometry in selected ion monitoring
20 (**SIM**) mode. The chromatographic analysis of the samples was carried out by means of a
21 Hewlett-Packard gas chromatograph model HP 6890 Series, equipped with a Mass Selective
22 Detector 5973 and a Hewlett-Packard Vectra XM Series 4 computer. The column used was a
23 fused-silica capillary column (60 m long x 0.25 mm inner diameter x 0.25 µm film thickness),
24 coated with a non-polar stationary phase (HP-5MS, 5% phenyl methyl siloxane). The

1 chromatographic conditions were the same described elsewhere for the study of Palmero
2 cheese (Guillén et al., 2007).

3 Identification of the compounds was based on their retention times and on the relative
4 abundances of the ions selected for their identification. Quantification in SIM mode is based
5 on the measurement of the peak area correspondent to the most abundant ion of each
6 compound, and was carried out by means of the deuterated internal standards previously
7 mentioned. Thus, naphthalene-d₈ was used for quantification of naphthalene and its
8 alkylderivatives, acenaphthene-d₁₀ for acenaphthylene and acenaphthene, phenanthrene-d₁₀
9 for fluorene, phenanthrene, anthracene and their alkylderivatives, pyrene-d₁₀ for fluoranthene
10 and pyrene, *p*-terphenyl-d₁₄ for *m*-terphenyl, *p*-terphenyl, benzofluorenes and methyl-
11 fluoranthenes/-pyrenes, chrysene-d₁₂ for benz(a)anthracene and chrysene, perylene-d₁₂ for
12 benzofluoranthenes and benzopyrenes and, lastly, benzo(ghi)perylene-d₁₂ for PAHs with
13 higher molecular weights.

14 **3. RESULTS AND DISCUSSION**

15 The results obtained reveal that the outer parts of the Herreño cheeses studied, both the
16 smoked and the unsmoked one, contain PAHs. The compounds detected, together with their
17 concentrations, in µg/kg of outer part, are shown in Table 1, in decreasing order of
18 contamination. It can be observed in this table that light PAHs (2 or 3 aromatic rings), above
19 all naphthalene and its alkylderivatives, but also acenaphthylene or phenanthrene, are the
20 most abundant. It is worth noting the high proportion of alkylated PAHs, all of them derived
21 from light PAHs. The PAH profile of the cheeses studied will be analysed in detail later in a
22 separated section.

1 **Table 1.** PAHs detected in the outer part of the Herreño cheeses studied and their concentrations, expressed in $\mu\text{g}/\text{kg}$. Results are given as mean value
 2 \pm standard deviation. Samples 1A, 2A and 4A correspond to the cheeses placed on the upper shelf of the smokehouse and samples 1B, 3B and 4B
 3 correspond to the cheeses placed on the lower shelf. The numbers refer to the position of the samples; 1: the nearest to the smoke entry; 4: the most
 4 distant to the smoke entry; 2 and 3: intermediate positions

Compound	1B	2A	4A	1A	3B	4B	UNSMOKED ¹
Naphthalene ²	401.17 \pm 2.12	217.73 \pm 21.40	171.91 \pm 52.98	146.41 \pm 27.90	119.51 \pm 18.19	170.42 \pm 20.96	15.97 \pm 12.68
Methylnaphthalenes	684.26	364.87	276.94	162.72	153.95	116.64	6.11
2-Methylnaphthalene	418.90 \pm 27.07	222.88 \pm 75.69	170.62 \pm 11.53	77.13 \pm 15.39	96.59 \pm 21.59	67.35 \pm 2.59	3.78 \pm 0.72
1-Methylnaphthalene	265.36 \pm 20.04	141.99 \pm 56.69	106.32 \pm 5.23	85.59 \pm 3.53	57.36 \pm 10.95	49.29 \pm 11.94	2.33 \pm 0.53
Dimethylnaphthalenes or isomers	681.15	372.54	271.70	142.64	119.90	77.60	5.95
2,6-Dimethylnaphthalene	187.82 \pm 20.52	105.50 \pm 52.49	76.24 \pm 2.40	38.12 \pm 7.11	36.32 \pm 4.77	23.34 \pm 6.68	2.46 \pm 0.28
1,7-Dimethylnaphthalene	190.59 \pm 19.50	102.51 \pm 64.07	73.66 \pm 2.21	32.89 \pm 7.29	31.56 \pm 4.56	19.86 \pm 4.51	1.71 \pm 0.53
1,6-Dimethylnaphthalene	137.44 \pm 15.86	73.74 \pm 42.03	53.38 \pm 1.65	45.87 \pm 3.56	24.64 \pm 2.07	20.58 \pm 0.50	1.78 \pm 0.58
1,4-+2,3-Dimethylnaphthalene	79.15 \pm 0.16	64.63 \pm 47.14	49.22 \pm 5.44	19.07 \pm 4.44	13.77 \pm 1.91	10.21 \pm 2.44	- ³
1,5-Dimethylnaphthalene	31.59 \pm 1.94	26.16 \pm 18.97	19.20 \pm 2.71	6.69 \pm 1.28	5.30 \pm 0.81	3.61 \pm 1.09	-
Dimethylnaphthalene or isomer	54.56 \pm 20.86	-	-	-	8.31 \pm 0.17	-	-

Table 1 (continued)							0.25 ± 0.07
Acenaphthylene	49.22 ± 6.46	33.49 ± 1.35	22.63 ± 4.84	20.07 ± 0.17	15.57 ± 4.92	20.65 ± 2.30	0.19 ± 0.04
Acenaphthene	8.85 ± 1.59	5.85 ± 1.34	4.25 ± 1.52	3.74 ± 0.05	2.37 ± 0.46	3.15 ± 0.27	0.23 ± 0.05
Fluorene	18.46 ± 4.04	19.23 ± 8.98	10.61 ± 3.83	16.04 ± 3.56	3.57 ± 0.71	10.48 ± 2.67	1.03 ± 0.28
Phenanthrene	29.95 ± 3.55	23.14 ± 8.25	15.28 ± 5.39	12.67 ± 0.69	5.83 ± 0.32	7.59 ± 2.57	0.03 ⁴
Anthracene	7.13 ± 1.15	5.65 ± 2.01	3.77 ± 1.38	3.15 ± 0.19	1.33 ± 0.14	2.75 ± 0.65	1.86
Methyl-phenanthrenes/-anthracenes	17.30	13.62	8.86	6.51	5.07	6.95	0.46 ± 0.12
3-Methylphenanthrene ⁵	3.49 ± 0.47	3.07 ± 1.71	1.88 ± 0.74	1.13 ± 0.10	1.15 ± 0.43	1.26 ± 0.29	0.62 ± 0.19
2-Methylphenanthrene ⁵	4.78 ± 0.38	3.85 ± 1.80	2.53 ± 0.99	1.84 ± 0.23	1.66 ± 0.56	1.94 ± 0.54	-
2-Methylanthracene	2.54 ± 0.29	1.79 ± 0.79	1.13 ± 0.51	0.97 ± 0.24	0.35 ± 0.01	0.96 ± 0.46	0.39 ± 0.09
9-Methylphenanthrene ⁵	2.91 ± 0.46	2.71 ± 1.59	1.71 ± 0.65	1.22 ± 0.14	1.06 ± 0.30	1.41 ± 0.51	0.39 ± 0.08
1-Methylphenanthrene	3.58 ± 0.17	2.20 ± 0.89	1.61 ± 0.65	1.35 ± 0.22	0.85 ± 0.06	1.38 ± 0.45	0.90
Dimethyl-phenanthrenes/-anthracenes	5.02	2.88	1.18	0.49	1.29	2.15	-
Dimethylphen. ⁶ or isomer (1)	0.54 ⁴	-	-	-	-	-	-
Dimethylphen. or isomer (2)	0.38 ⁴	-	-	-	-	-	-
Dimethylphen. or isomer (3)	1.26 ± 0.13	-	-	-	-	-	0.43 ± 0.03
Dimethylphen. or isomer (4)	1.16 ± 0.11	1.11 ⁴	-	-	0.54 ± 0.15	0.78 ± 0.23	

							0.27 ⁴
Table 1 (continued)	-	0.92 ⁴	-	-	0.36 ± 0.13	0.58 ± 0.20	0.20 ⁴
Dimethylphen. or isomer (5)	1.68 ± 0.08	0.85 ^d	1.18 ± 0.51	0.49 ± 0.08	0.39 ± 0.09	0.79 ± 0.27	0.29 ± 0.07
Dimethylphen. or isomer (6)	3.14 ± 0.28	2.51 ± 0.76	1.71 ± 0.64	1.55 ± 0.05	0.59 ± 0.04	1.20 ± 0.21	0.25 ± 0.01
Fluoranthene	2.85 ± 0.33	2.30 ± 0.83	1.62 ± 0.58	1.15 ± 0.06	0.46 ± 0.02	1.03 ± 0.11	0.04
Pyrene	2.85 ± 0.33	1.06	0.79	0.68	0.33	0.78	-
Methyl-fluoranthenes/-pyrenes	0.31 ± 0.08	-	-	0.06 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.03 ± 0.01	-
2-Methylfluoranthene	0.33 ± 0.01	-	-	0.06 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.07 ± 0.02	-
Methylflt. ⁷ or isomer (1)	0.35 ± 0.00	0.16 ± 0.07	0.08 ± 0.01	0.10 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.10 ± 0.03	-
Methylflt. or isomer (2)	0.52 ± 0.00	0.29 ± 0.11	0.22 ± 0.02	0.16 ± 0.04	0.04 ± 0.00	0.20 ± 0.00	0.04 ± 0.00
Methylflt. or isomer (3)	0.47 ± 0.04	0.30 ± 0.12	0.25 ± 0.00	0.14 ± 0.04	0.06 ± 0.01	0.19 ± 0.03	-
Methylflt. or isomer (4)	0.50 ± 0.05	0.31 ± 0.09	0.24 ± 0.05	0.16 ± 0.02	0.04 ± 0.02	0.19 ± 0.04	0.24 ± 0.02
1-Methylpyrene	0.66 ± 0.23	0.31 ± 0.07	0.80 ± 0.10	2.75 ± 1.29	0.50 ± 0.11	0.90 ± 0.58	0.13 ± 0.01
<i>o</i> -Terphenyl	0.45 ± 0.05	0.20 ± 0.06	0.20 ± 0.08	0.17 ± 0.01	0.19 ± 0.03	0.15 ± 0.01	0.05 ⁴
<i>m</i> -Terphenyl	0.26 ± 0.01	0.12 ± 0.02	0.10 ± 0.04	0.05 ± 0.02	0.11 ± 0.09	0.06 ± 0.01	-
<i>p</i> -Terphenyl	0.92 ± 0.21	0.59 ± 0.24	0.35 ± 0.09	0.25 ± 0.03	0.03 ± 0.00	0.24 ± 0.04	-
1-Methylflt.+11H-Benzo(a)fluorene	0.16 ± 0.03	0.18 ± 0.03	0.14 ± 0.03	0.07 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.09 ± 0.04	

Table 1 (continued)							
11H-Benzo(b)fluorene	0.19 ± 0.07	0.12 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.06 ± 0.00	0.09 ± 0.01	-
11H-Benzo(c)fluorene	0.44 ± 0.17	0.44 ± 0.12	0.39 ± 0.13	0.17 ± 0.05	0.07 ± 0.01	0.17 ± 0.02	0.13 ± 0.04
Benz(a)anthracene ²	1.10 ± 0.04	0.67 ± 0.18	0.57 ± 0.20	0.32 ± 0.06	0.15 ± 0.00	0.30 ± 0.01	-
Chrysene ² +Triphenylene	-	-	0.14 ± 0.05	-	-	-	-
Benzo(b)fluoranthene ²	-	-	0.09 ± 0.03	-	-	-	-
Benzo(j+k)fluoranthenes ²	-	-	0.21 ± 0.02	-	-	-	-
Benzo(a)pyrene ²	-	-	0.04 ± 0.01	-	-	-	-
Indeno(1,2,3-cd)pyrene ²	-	-	0.05 ± 0.01	-	-	-	33.65
Benzo(ghi)perylene	1,915.16	1,067.50	794.41	521.69	430.92	423.39	14.86
TOTAL PAHs	1,390.21	754.97	559.47	313.04	280.54	204.12	16.10
ALKYLATED PAHs	402.71	218.84	173.35	146.90	119.73	170.89	0.13
CARCINOGENIC PAHs	1.54	1.11	1.44	0.49	0.22	0.47	33.52
HEAVY CARCINOGENIC PAHs ⁸	1,913.62	1,066.39	792.92	521.20	430.70	422.92	0.13
LIGHT PAHs ⁹	1.54	1.11	1.49	0.49	0.22	0.47	
HEAVY PAHs ¹⁰							

1 ¹Unsmoked cheese.

2 ²PAH with a certain degree of carcinogenicity according to the classification of the IARC (IARC, 2002, 2010).

- 1 ³ - : Not detected.
- 2 ⁴ Detected only in one of the samples.
- 3 ⁵ Isomers identified by comparison of their retention times with those of Baumard et al. (1999), using the same chromatographic conditions than these authors.
- 4 ⁶ Dimethylphen.: Dimethylphenanthrene.
- 5 ⁷ Methylflt.: Methylfluoranthene.
- 6 ⁸ Without naphthalene.
- 7 ⁹ From naphthalene to benz(a)anthracene (not included).
- 8 ¹⁰ From benz(a)anthracene onwards.

Among all the PAHs monitored in the study, 9-methylanthracene, 2,3-dimethylanthracene, 9,10-dimethylphenanthrene, 3,6-dimethylphenanthrene, benzo(c)phenanthrene, 6-methylbenz(a)anthracene, 7-methylbenz(a)anthracene, 1-methylchrysene, 2-methylchrysene, 3-methylchrysene, 4-methylchrysene, 5-methylchrysene, 6-methylchrysene, 7,12-dimethylbenz(a)anthracene, benzo(e)pyrene, perylene, dibenz(a,j)anthracene, dibenz(a,h)anthracene, benzo(b)chrysene, picene, anthanthrene, coronene, dibenzo(a,l)pyrene, dibenzo(a,e)pyrene, dibenzo(a,i)pyrene and dibenzo(a,h)pyrene were not detected in any of the samples studied.

PAH contamination degree of the smoked cheeses studied: Influence of the position of the cheeses in the smokehouse

Although all the smoked Herreño cheeses studied were manufactured at the same time, and smoked simultaneously in the same smokehouse, the total PAH concentrations of these cheeses are considerably different (1,915.16 µg/kg in 1B and 423.39 µg/kg in 4B). The unsmoked cheese has a considerably lower contamination degree (33.65 µg/kg).

According to the scheme of the positions of the cheeses in the smokehouse (Figure 1), the cheese 1B, which is the most contaminated one, was the nearest to the smoke entry and, what is more, it was kept in the smokehouse for almost double the time than cheeses A. Nevertheless, leaving aside cheeses 1B and 1A, it can be observed that, despite their longer smoking time, the samples placed in the lower part (3B and 4B) show total PAH concentrations lower than the samples placed above (2A and 4A). It can also be noticed that, except for sample 1A, the cheeses closest to the smoke entry are the most contaminated. These differences could be due to the path followed by the smoke in the smokehouse, basically determined by the natural flow established between the entry and the exit. Thus, smoke tends to go up and, as it gets cold, PAHs can condense, mainly on the surface of the cheeses placed in the main path of the smoke. In fact, the cheeses that could be considered as

placed in such a path (1B, 2A and 4A) are the most contaminated, whereas those placed further away from that path (1A, 3B and 4B), show a lower contamination degree. Therefore, it could be concluded that the position of the cheeses within the smokehouse seems to have some influence on their PAH contamination degree. This influence seems more relevant than that of the duration of the process since, in general, the PAH content is higher in the cheeses placed in the main path of the smoked from the entry to the exit of the smokehouse. In this context, it seems evident that the entry of the smoke through different heights and sides of the smokehouse could provide a more homogeneous distribution of the smoke on the cheese surface and, consequently, a more homogeneous smoking degree of the cheeses. Furthermore, an extension of the distance between the smoke generation source and the smokehouse would probably avoid or, at least, reduce the deposit of these contaminants.

It is difficult to compare the PAH contamination degree of these Herreño cheeses with that of other smoked cheeses studied by different authors, because the number of PAHs determined here is far higher. In fact, most of the studies concerning PAHs in food focus on a few PAHs, or even only on benzo(a)pyrene, the sole PAH classified as “*Carcinogenic to humans*” (group 1) by the International Agency for Research on Cancer (IARC, 2010). However, it must not be forgotten that PAHs appear in complex mixtures that include a large number of compounds, and that there is no evidence in relation to the carcinogenicity of many of them. Therefore, their potential presence should not be ignored.

If the total PAH concentrations of these smoked Herreño cheeses (423.39-1,915.16 µg/kg) are compared with those found previously in another type of Canary smoked cheese: Palmero (29.21-739.55 µg/kg) (Guillén et al., 2007), and in other Spanish commercial smoked cheeses (36.31-1,037.23 µg/kg) (Guillén and Sopelana, 2004a), it can be observed that the highest values generally correspond to Herreño cheeses. However, it must be pointed out, as will be discussed later, that the main contribution is due to the concentrations of the lightest PAHs,

particularly naphthalene and its alkylderivatives. By contrast, heavy PAHs, among which most of the carcinogenic compounds are found, are very scarce.

The lower proportion of heavy PAHs in comparison with the Palmero cheese (Guillén et al., 2007) could be related to the smoking procedure used in each case: while Palmero cheese is smoked on a grill directly placed on a barrel where the smoke is produced, Herreño cheese is smoked in a smokehouse separated from the place where smoke is produced, so there is a greater distance between the smoke source and the cheeses. This may affect the level of PAH deposits, especially of the heaviest ones, on the cheese surface.

PAH contamination degree of the unsmoked cheese

As can be seen in Table 1, the smoked Herreño cheeses and the unsmoked one differ considerably in the number of PAHs and in their concentrations. As could be expected, the total PAH content of the unsmoked cheese is far lower (33.65 µg/kg).

At first, the occurrence of PAHs in the unsmoked cheese could seem strange; however, other scientists have also found variable concentrations of some PAHs, even of high molecular weight, in unsmoked cheese (Bosset et al., 1998; Pagliuca et al., 2003). Unlike that observed here, in the studies from the mentioned authors, benz(a)anthracene was present in all the unsmoked cheeses analyzed; in contrast, naphthalene, the most abundant compound in our samples, was not detected in any case.

The occurrence of PAHs in the unsmoked cheese could be due to the presence of these compounds in the milk used to produce the cheese, concentrating in the fatty fraction of the cheese during its manufacturing process. In fact, the presence of PAHs in milk has been revealed by the studies of several authors (Grova et al., 2000, 2002; Kishikawa et al., 2003), even though there are great differences between the results obtained. Thus, while Grova and coworkers (2000, 2002) did not find PAHs with more than 4 aromatic rings in any of the milk samples studied and, in some cases, neither benz(a)anthracene nor chrysene, the studies of

other authors have revealed the presence of the carcinogenic benzo(a)pyrene in milk of diverse origin (Kishikawa et al., 2003).

The presence of PAHs in the unsmoked cheese reveals the need to control the milk, in order to avoid the incorporation of these contaminants into cheese.

PAH profile of the cheeses studied

As mentioned above, Table 1 shows that the most abundant compounds in the studied Herreño cheeses are the light PAHs, among which naphthalene, acenaphthylene or phenanthrene can be cited. This correlates well with the results of previous studies on the occurrence of PAHs in other types of Spanish smoked cheeses (Guillén and Sopelana, 2004a; Guillén et al., 2007). Moreover, except for cheese 4A, no PAH with more than 4 aromatic rings has been detected in these cheeses. It can also be observed that, as in Palmero cheese (Guillén et al., 2007) and in other types of Spanish commercial smoked cheeses (Guillén and Sopelana, 2004a), the concentrations of light PAHs are much higher than those of heavy PAHs, and that PAH concentrations tend to decrease as the molecular weight of the compounds increases.

Alkylated PAHs are in high proportions, accounting for more than the 60% of the total PAH concentration in most of the samples, except for cheese 4B and the unsmoked one, where these types of compounds are less abundant (48.2 and 44.2%, respectively). The alkyl derivatives that most contribute to this sum are methyl- and dimethyl-naphthalenes, which represent almost 100% of the alkylated PAHs. The individual concentrations of alkylated compounds are lower than those of their respective parent PAHs, the dimethyl derivatives being less abundant than the monomethyl derivatives. The concentration of 2-methylnaphthalene is slightly higher than that of naphthalene only in samples 1B and 2A (the most contaminated ones). All these findings are in agreement with previous works on smoked cheese (Guillén et al., 2004a; Guillén et al., 2007).

In contrast to that observed for the individual concentrations of alkyl derivatives, it can be seen in Table 1 that, as in other types of Spanish smoked cheeses (Guillén and Sopelana, 2004a; Guillén et al., 2007), the total concentrations of mono- and di-methylnaphthalenes are, in general, higher or of the same order than those of naphthalene, except for sample 4B and the unsmoked cheese. However, in the case of phenanthrene/anthracene, the total of both mono- and di-methyl derivatives is lower than the concentration of phenanthrene in all the samples except for the unsmoked cheese. Moreover, the sum of dimethyl derivatives is lower than that of monomethyl derivatives. The same can be observed for the total of methylfluoranthenes/-pyrenes in relation to the concentrations of their respective parent PAHs. This also coincides with concentrations previously observed in other types of Spanish smoked cheeses (Guillén and Sopelana, 2004a; Guillén et al., 2007).

To make matters concerning alkylated PAHs clearer, Table 2 shows the ratios between the concentrations of some PAHs and their alkyl derivatives in the cheeses studied. It can be observed that, in the smoked cheeses the first three ratios (N/MN, N/DMN and Ph/MPh) generally present very close values in most of the samples. The figures for ratios N/MN and N/DMN are of the same order as those observed in smoked Palmero cheese (Guillén et al., 2007), whereas the ratio Ph/MPh shows a little bit higher values in the Herreño cheese, what points to a lower proportion of methyl derivatives of phenanthrene/anthracene in relation to their parent PAHs in the latter. Moreover, as the concentration level of PAHs decreases (higher in 1B and lower in 4B), the values of the ratios N/MN and N/DMN increase, whereas those of the ratio Ph/MPh, in general, decrease; this reveals a lower proportion of naphthalene alkyl derivatives, but a higher one of phenanthrene derivatives in the samples with lower contamination degree. The ratio Ph/DMPH, as observed in Palmero cheese (Guillén et al., 2007), is more variable, suggesting that phenanthrene dimethyl derivatives could be more affected by variations in the smoking process than the rest of compounds included in these

Table 2. Ratios between the concentrations of some PAHs and their alkylderivatives in the Herreño cheeses studied ¹.

	N/MN	N/DMN	Ph/MPh	Ph/DMPH
SMOKED CHEESES				
1B	0.6	0.6	1.7	6.0
2A	0.6	0.6	1.7	3.7
4A	0.6	0.6	1.7	12.9
1A	0.9	1.0	1.9	25.9
3B	1.0	1.0	1.2	4.5
4B	1.5	2.2	1.1	3.5
Variation coefficient	41.1	62.0	20.7	93.5
UNSMOKED CHEESE	2.6	2.7	0.6	1.1

¹ N: naphthalene; MN: methyl naphthalenes; DMN: dimethyl naphthalenes; Ph: phenanthrene; MPh: methyl phenanthrenes; DMPH: dimethyl phenanthrenes.

² Samples 1A, 2A, and 4A correspond to the cheeses placed on the upper shelf of the smokehouse and samples 1B, 3B, and 4B correspond to the cheeses placed on the lower shelf. The numbers refer to the position of the samples: 1: the nearest to the smoke entry; 4: the most distant from the smoke entry; 2 and 3: intermediate positions.

ratios. On the other hand, if the unsmoked cheese is compared with the smoked ones, it can be seen that the ratios N/MN and N/DMN are higher in the former, following the tendency that the lower the contamination the higher the ratios N/MN and N/DMN; by contrast, those corresponding to phenanthrene are lower, following the opposite tendency.

Studies performed previously (Guillén and Sopelana, 2004a; Guillén et al., 2007) have revealed the existence of relationships between the concentrations of certain pairs of PAH isomers. Table 3 shows the values of these ratios in the cheeses of this study. It can be observed that, despite the difference in the PAH contamination degree of the cheeses studied, there is a very constant ratio between the concentrations of some pairs of isomers.

Specifically, the value of the ratio Ph/A, which was found to vary depending on the PAH concentration level in smoked Palmero cheese (Guillén et al., 2007), is practically the same in all the smoked cheeses (4.0-4.4), except for 4B (2.8). In the unsmoked cheese, this ratio (34.3) is far higher than in the smoked ones, which reveals a lower proportion of anthracene in relation to phenanthrene in the former. This could be considered as an indicator of the different origin of the contamination in the unsmoked cheese. In fact, values of the ratio Ph/A higher than 10 have been considered characteristic of PAH mixtures with a petrogenic and not a pyrolytic origin (Ke et al., 2002).

Table 3 also shows that in the smoked cheeses the sum of chrysene and triphenylene is always higher than the benz(a)anthracene concentration, and that the values of the ratio C+T/BaA (1.5-2.5) are within the range observed in Palmero cheese (Guillén et al., 2007).

As noted in the study of Palmero cheese (Guillén et al., 2007), the ratio which remains most constant is that between the concentrations of fluoranthene and pyrene (Ft/P) (1.1-1.3), also of the same order as in Palmero cheeses (Guillén et al., 2007). The value of this ratio is practically equal both in all the smoked cheeses (1.1-1.3) and in the unsmoked one (1.2). The same can be said about the ratio between the concentrations of the two monomethylnaphthalenes (2MN/1MN), which remains practically constant in most of the smoked cheeses (1.4-1.7), and the unsmoked one (1.6).

In relation to the ratios between the sums of benzofluoranthenes and benzopyrenes (BFts/BPs) on the one hand, and between the concentrations of benzo(ghi)perylene and indeno(1,2,3-cd)pyrene (BPer/IP) on the other hand, it must be pointed out that these are also of the same order as in Palmero cheeses (Guillén et al., 2007), in the one sample where these compounds were detected (4A).

Table 3. Ratios between the concentrations of certain PAH isomers in the Herreño cheeses studied ¹.

	Ph/A	Ft/P	C+T/BaA	BFts/BPs	BPer/IP	2MN/1MN
SMOKED CHEESES						
1B ²	4.2	1.1	2.5	-	-	1.6
2A	4.1	1.1	1.5	-	-	1.6
4A	4.1	1.1	1.5	1.4	0.8	1.6
1A	4.0	1.3	1.9	-	-	0.9
3B	4.4	1.3	2.1	-	-	1.7
4B	2.8	1.2	1.8	-	-	1.4
UNSMOKED CHEESE	34.3	1.2	-	-	-	1.6

¹ Ph: phenanthrene; A: anthracene; Ft: fluoranthene; P: pyrene; C: chrysene; T: triphenylene; BaA: benz(a)anthracene; BFts: benzo(a)fluoranthene; BPs: benzopyrenes; BPer: benzo(ghi)perylene; IP: indeno (1,2,3-cd)pyrene; 2MN: 2-methylnaphthalene; 1MN: 1-methylnaphthalene.

² Samples 1A, 2A, and 4A correspond to the cheeses placed on the upper shelf of the smokehouse and samples 1B, 3B, and 4B correspond to the cheeses placed on the lower shelf. The numbers refer to the position of the samples: 1: the nearest to the smoke entry; 4: the most distant from the smoke entry; 2 and 3: intermediate positions.

Previous works have also revealed the existence of a certain relationship between the concentrations of some pairs of PAHs that differ in one aromatic ring, such as pyrene and benzo(a)pyrene, in charbroiled hamburguers (Greenberg et al., 1993) or liquid smoke flavorings (Guillén et al., 2000a,b). In further studies on the occurrence of PAHs in different types of smoked cheese (Guillén and Sopelana, 2004a; Guillén et al., 2007), additional ratios between other pairs of PAHs were studied. It was observed from these studies that the values of some ratios varied depending on the PAH contamination degree and also on the vegetable matter used for smoking, whereas others such as that between phenanthrene and pyrene remained quite constant in all the samples studied.

With the double objective of advancing the study of the usefulness of these types of ratios as well as of making a more thorough comparison of the PAH profile of the smoked Herreño cheese both with that of the unsmoked cheese and with other Spanish smoked cheeses, the ratios between the concentrations of some pairs of PAHs were calculated. These are shown in Table 4.

Table 4. Ratios between the concentrations of some pairs of PAHs that differ in one aromatic ring in the Herreño cheeses studied ¹.

	N/Al	N/Ph	Ph/P	P/BaP
SMOKED CHEESES				
1B	8.2	13.4	10.5	-
2A	6.5	9.46	10.1	-
4A	7.6	11.3	9.4	7.7
1A	7.3	11.6	11.0	-
3B	7.7	20.5	12.7	-
4B	8.3	22.52	7.4	-
Variation coefficient	8.6	36.5	17.3	-
UNSMOKED CHEESE	63.9	15.5	4.1	-

¹N: naphthalene; Al: acenaphthylene; Ph: phenanthrene; P: pyrene; BaP: benzo(a)pyrene.

As expected, given that the six smoked cheeses were subjected to similar smoking conditions, the values of the ratios N/Al, N/Ph and Ph/P are, in general, very similar in most of these smoked cheeses. The lower values of the ratio N/Al against N/Ph suggest a greater tendency to form acenaphthylene than phenanthrene from naphthalene in the smoke generation process employed in the smoking of Herreño cheeses; this contrasts with that

observed in Palmero cheese (Guillén et al., 2007) and this difference could be due to the vegetable matter used for smoking. Together with N/Al, the ratio which exhibits fewer variations is Ph/P. This agrees well with the results of previous works (Guillén and Sopelana, 2004a; Guillén et al., 2007) and also with those of Suchanová and coworkers (2008). These authors studied a large number of smoked cheese samples and found that while the ratio Ph/P stayed quite constant, the ratio P/BaP differed from some samples to others depending on the smoking technology used. To be precise, the values for the ratio Ph/P in smoked Herreño cheese (7.4-12.7) are within the same range as those determined by Suchanová et al. (2008) in cheese samples smoked following different technologies (4-14). On the other hand, our only value for the ratio P/BaP (7.7) is close to the values found by these authors in samples smoked with “liquid smoke” (6) and in those subjected to a “household wood burning” (14). According to the results of these authors, these types of smoking technologies led to the highest BaP concentration in relation to pyrene. However, regarding this latter ratio (P/BaP), we can draw hardly any conclusions because of the low number of cheese samples among those studied by our research group where benzo(a)pyrene was detected (Guillén and Sopelana, 2004a, Guillén et al., 2007).

In relation to the unsmoked cheese, the ratio N/Al (63.9) is much higher than in the smoked cheeses, revealing a lower proportion of acenaphthylene in relation to naphthalene in the former. By contrast, the value of the ratio Ph/P (4.1) is lower in the unsmoked cheese, revealing a higher concentration of pyrene in relation to phenanthrene. These differences could again point to a different origin for the contamination in the unsmoked cheese.

In conclusion, it can be said that the PAH profile of the smoked Herreño cheese studied is very similar to that of other Spanish smoked cheeses. This leads us to think that the formation of PAHs during smoke generation and their incorporation to cheese during the smoking process seems to have certain regularity, resulting in a very similar PAH profile, provided that

smoke is not subjected to an additional treatment (for example, filtration) before coming into contact with the product.

The results of this work contribute to the concept that certain ratios between some pairs of PAHs could be useful to provide information on the contamination source (Guillén et al., 2007).

Carcinogenic PAHs

In relation to the presence of carcinogenic PAHs, naphthalene and chrysene, considered as “*possibly carcinogenic to humans*” by the IARC (group 2B) (IARC, 2002, 2010), are present in all the cheeses studied, both smoked and unsmoked. Benz(a)anthracene, included by the IARC in the group 2B too, has been detected in all the smoked samples, but not in the unsmoked one. Other PAHs also included in group 2B, such as benzo(b)fluoranthene, benzo(j)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene or indeno(1,2,3-cd)pyrene are present only in cheese 4A.

Table 5 shows the proportions, expressed in percentage relative to the total concentration of PAHs, of total carcinogenic PAHs and heavy carcinogenic ones (without including naphthalene), in the cheeses studied. This table shows that although the percentage of carcinogenic PAHs is about 21% in the three most contaminated cheeses (1B, 2A and 4A), in the less contaminated ones this percentage is higher, above all in 4B. Moreover, the unsmoked cheese exhibits the greatest percentage of carcinogenic compounds (48%). The explanation for this is the contribution of naphthalene, the most abundant compound in all the studied cheeses, to the total of carcinogenic PAHs. In fact, the percentage of heavy carcinogenic PAHs in samples 1A, 3B and 4B (0.05-0.11) is of the same order or even lower than in the rest of smoked cheeses, where this value varies between 0.08 and 0.18%.

Table 5. Percentages of both total and heavy carcinogenic PAHs in the Herreño cheeses studied.

	% Total carcinogenic PAHs	% Heavy carcinogenic PAHs ¹
SMOKED CHEESES ²		
1B	21.0	0.08
2A	20.4	0.10
4A	21.8	0.18
1A	28.2	0.09
3B	27.8	0.05
4B	40.4	0.11
UNSMOKED CHEESE	47.9	0.39

¹ Without naphthalene.

² Samples 1A, 2A and 4A correspond to the cheeses placed on the upper shelf of the smokehouse and samples 1B, 3B and 4B correspond to the cheeses placed on the lower shelf. The numbers refer to the position of the samples; 1: the nearest to the smoke entry; 4: the most distant to the smoke entry; 2 and 3: intermediate positions.

It must be pointed out that while the percentage of total carcinogenic PAHs is within the range of those found in Palmero cheeses (11.2-48.3), the percentages of heavy carcinogenic ones is considerably lower in the Herreño cheeses.

Benzo(a)pyrene was only detected in cheese 4A, in a concentration of 0.21 µg/kg. This value is within the range of those found in other Spanish smoked cheeses, such as Palmero cheese (Guillén et al., 2007) and other commercial ones (Guillén and Sopelana, 2004a), and in other types of smoked cheese, where concentrations varied between 0.03 and 3.8 µg/kg (Potthast, 1977; Lintas et al., 1979; Joe et al., 1984; De Martin et al., 1998; García Falcón et al., 1999; Michalski and Germuska, 2003; Pagliuca et al., 2003; Anastasio et al., 2004; Naccari et al., 2008; Suchanová et al., 2008). However, it must be pointed out that values vary

greatly depending on the smoking process conditions and even on the part of the cheese studied, reaching concentrations of 7.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in some cheeses (Michalski and Germuska, 2003). In contrast, there are also studies where benzo(a)pyrene has not been detected in any of the samples studied (Riha et al., 1992).

The benzo(a)pyrene concentration in the outer part of cheese 4A is far lower than the maximum limit of 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ allowed in Spain in the rind of ripened smoked cheeses (Real Decreto 1113/2006, de 29 de septiembre). Nevertheless, considering that benzo(a)pyrene is mainly concentrated in the outer part (Guillén and Sopelana, 2004a) and that the outer part accounted for 49.36% of the whole cheese in sample 4A, the concentration corresponding to the whole sample would be 0.10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. This value is considerably lower than the maximum of 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ established for other types of smoked foods (Commission Regulation No 208/2005), although higher than that allowed in foods smoked with smoke flavorings (Council Directive 88/388/EEC). However, in Spain, none of the limits mentioned affect smoked cheese.

As mentioned above, benzo(a)pyrene has only been detected in one of the samples studied. In contrast, other PAHs considered “possibly carcinogenic to humans” by the IARC (group 2B), such as benz(a)anthracene or chrysene, are present in all of them, and the same has been observed in previous works (Guillén and Sopelana, 2004a; Guillén et al., 2007). These findings contribute to the idea that benzo(a)pyrene alone does not seem to be a suitable indicator for the occurrence and toxicity of genotoxic and carcinogenic PAHs.

Although heavy PAHs, especially those with 5 or more aromatic rings, are the most studied because of their mutagenicity, genotoxicity and/or carcinogenicity in experimental animals, the potential contribution of light PAHs to the genotoxic and/or carcinogenic effects of PAH contaminated food should not be ignored, since these latter are the most abundant in all the food samples studied by our research group, both smoked (Guillén and Sopelana, 2004a;

Guillén et al., 2007) and unsmoked (Guillén and Sopelana, 2004b; Guillén et al., 2004). In this context, naphthalene deserves special attention, since it accounts for a percentage of the total PAH concentration ranging from 20 to 47% in the samples of this study; moreover, as mentioned above, it has been included in group 2B of the IARC (IARC, 2002) and the National Toxicology Program (NTP) has recently evaluated this PAH and classified it as “reasonably anticipated to be a human carcinogen” (NTP, 2004). Alkylated derivatives, which account for a high proportion of the total PAH concentration, should not be ignored either due to their wide distribution, since methyl substitution in some compounds could result in hydrocarbons of very great carcinogenic potency (Guillén and Sopelana, 2003).

On the other hand, there are some PAHs which, despite their inability to produce tumours *per se*, contribute to an increase in the incidence of some types of tumours produced by complete carcinogens such as benzo(a)pyrene when administered together with them; fluoranthene and pyrene can be cited as examples (Guillén and Sopelana, 2003).

3. CONCLUSIONS.

In conclusion, it can be said that the traditional smoking process applied to the Herreño cheese studied here results in a very low content of heavy carcinogenic PAHs. However, it would be desirable to optimize this process in order to reduce the concentrations of light and alkylated PAHs, whose effects on human health have not been definitively established yet. Moreover, the study of the PAH profile of the cheese reveals that there are some ratios between the concentrations of certain pairs of PAHs, such as Ft/P or Ph/P, which remain practically constant independently of the smoking process and of the PAH contamination level; in contrast, other ratios such as N/MN, N/DMN or Ph/MPh, seem to be influenced by the PAH concentration level. Finally, there are some ratios, such as Ph/A or N/AI, which can help us to distinguish between PAH contamination coming from smoking or from other sources.

Thus, although the occurrence of PAHs in food commodities has been studied for many decades, the presence of this type of contaminants still constitutes a cause for concern, since there are very few exhaustive studies on the whole PAH profile and, consequently, there is a lack of data about the presence of these contaminants in food. This information is necessary to evaluate the possible risk derived from the consumption of foods and, in fact, SCF stressed that data collection on the whole PAH profile should continue in order to be able to evaluate the contamination of food commodities and any future change in the PAH profile. Moreover, further toxicological studies should be carried out in order to know the risk derived from the ingestion of the most abundant PAHs in food. Meanwhile, PAH contamination of food should be kept to the minimum possible. In this context, the findings of this work show that the position of the cheeses in the smokehouse can have an influence on their PAH contamination degree. Therefore, improving the design of smokehouses might contribute to reducing the PAH contamination of smoked cheese.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been supported by the Ministerio de Ciencia y Tecnología (CAL02-075-C3-2, AGL2009-09904) and the Gobierno del País Vasco (GIC10/IT-463-10). G. Palencia thanks the Universidad del País Vasco for a predoctoral fellowship.

REFERENCES

- Anastasio, A., R. Mercogliano, L. Vollano, T. Pepe, and M. L. Cortesi. 2004. Levels of benzo[a]pyrene (BaP) in "Mozzarella di Bufala Campana" cheese smoked according to different procedures. *J. Agric. Food Chem.* 52: 4452-4455.
- Baumard, P., H. Budzinski, P. Garrigues, H. Dizer, and P. D. Hansen. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments and mussels (*Mytilus edulis*) from the Western Baltic Sea: occurrence, bioavailability and seasonal variations. *Mar. Environ. Res.* 47: 17-47.
- Bosset, J. O., U. Bütikofer, O. Dafflon, H. Koch, L. Scheurer-Simonet, and R. Sieber. 1998. Teneur en hydrocarbures aromatiques polycycliques de fromages avec et sans flaveur de fumée. *Sci. Aliments* 18: 347-359.
- Commission Recommendation 2005/108/EC of 4 February 2005 on the further investigation into the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in certain foods. *Off. J. Eur. Union* L34, 8.02.2005: 43-45.
- Commission Regulation (EC) No 208/2005 of 4 February 2005 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards polycyclic aromatic hydrocarbons. *Off. J. Eur. Union* L 34, 8.02.2005: 3-5.
- Council Directive 88/388/EEC of 22 of June of 1988 on the approximation of the laws of the Member States relating to flavorings for use in foodstuffs and to source materials for their production. *Off. J. Eur. Union* L 184, 15.07.1988: 61-66.
- De Martin, S., P. Matcovich, D. Nanut, S. Zulian, and V. Siardi. 1998. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in smoked foods. *Boll. Chim. Igien., Parte Sci.* 49: 177-181.

- Fresno, M., S. Alvarez, N. Darmanin, P. Méndez, E. Fernández, and M. D. Guillén. 2004. La industria quesera en la isla de El Hierro: pasado, presente y futuro. *Alimentación, equipos y tecnología* 192, 69-73.
- García Falcón, M. S., S. González Amigo, M. A. Lage Yusty, and J. Simal Lozano, J. 1999. Determination of benzo[a]pyrene in some Spanish commercial smoked products by HPLC-FL. *Food Addit. Contam.* 16: 9-14.
- Greenberg, A., C. H. Hsu, N. Rothman, and P. T. Strickland. 1993. PAH profiles of charbroiled hamburgers: pyrene/b[a]p ratios and presence of reactive PAH. *Pol. Arom. Comp.* 3: 101-110.
- Grova, N., C. Laurent, C. Feidt, G. Rychen, F. Laurent, and E. Lichtfouse. 2000. Gas chromatography-mass spectrometry study of polycyclic aromatic hydrocarbons in grass and milk from urban and rural farms. *Eur. J. Mass Spectrom.* 6: 457-460.
- Grova, N., C. Feidt, C. Crepineau, C. Laurent, P. E. Lafargue, A. Hachimi, and G. Rychen. 2002. Detection of polycyclic aromatic hydrocarbon levels in milk collected near potential contamination sources. *J. Agric. Food Chem.* 50: 4640-4642.
- Guillén, M. D., P. Sopelana, and M. A. Partearroyo. 2000a. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in commercial liquid smoke flavorings of different composition by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 48: 126-131.
- Guillén, M. D., P. Sopelana, and M. A. Partearroyo. 2000b. Polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid smoke flavorings obtained from different types of wood. Effect of storage in polyethylene flasks on their concentrations. *J. Agric. Food Chem.* 48: 5083-5087.
- Guillén, M. D., and P. Sopelana. 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbons in diverse foods. Pages 175-198 in *Food Safety: contaminants and toxins*. J. P. F. D'Mello, ed. CABI Publishing, Oxon, United Kingdom.

- Guillén, M. D., and P. Sopelana. 2004a. Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked cheese. *J. Dairy Sci.* 87: 556-564.
- Guillén, M. D., and P. Sopelana. 2004b. Load of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Edible Vegetable Oils: Importance of Alkylated Derivatives. *J. Food Prot.* 67: 1904-1913.
- Guillén, M. D., P. Sopelana, and G. Palencia. 2004. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Olive Pomace Oil. *J. Agric. Food Chem.* 52: 2123-2132.
- Guillén, M. D., G. Palencia, P. Sopelana, and M. L. Ibargoitia. 2007. Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in artisanal Palmero cheese smoked with two types of vegetable matter. *J. Dairy Sci.* 90: 2717-2725.
- IARC. 2002. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. In *IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans*. Vol. 82. IARC, Lyon, France.
- IARC. 2010. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. In *IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans*. Vol. 92. IARC, Lyon, France.
- Joe, F. L., Jr., J. Salemme, and T. Fazio. 1984. Liquid chromatographic determination of trace residues of polynuclear aromatic hydrocarbons in smoked foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 67: 1076-1082.
- Ke, L., T. W. Y. Wong, Y. S. Wong, and N. F. Y. Tam. 2002. Fate of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contamination in a mangrove swamp in Hong Kong following an oil spill. *Mar. Poll. Bull.* 45, 339-347.
- Kishikawa, N., M. Wada, N. Kuroda, S. Akiyama, and K. Nakashima. 2003. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in milk samples by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chrom. B.* 789: 257-264.

- Lintas, C., M. C. De Matthaeis, and F. Merli. 1979. Determination of benzo[a]pyrene in smoked, cooked and toasted food products. *Food Cosmet. Toxicol.* 17: 325-328.
- Maga, J. A. 1988. *Smoke in Food Processing*; CRC Press: Boca Raton, Florida, USA.
- Michalski, R., and R. Germuska. 2003. The content of benzo(a)pyrene in Slovakian smoked cheese. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 12: 33-37.
- Naccari, C., M. Cristani, P. Licata, F. Giofre, and D. Trombetta. 2008. Levels of benzo[a]pyrene and benz[a]anthracene in smoked "Provola" cheese from Calabria (Italy). *Food Addit. Contam.: Part B* 1: 78-84.
- NTP. 2004. *Eleventh Report on Carcinogens*; U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
- Pagliuca G., T. Gazzotti, E. Zironi, G. P. Serrazanetti, D. Mollica, and R. Rosmini. 2003. Determination of high molecular mass polycyclic aromatic hydrocarbons in a typical Italian smoked cheese by HPLC-FL. *J. Agric. Food Chem.* 51: 5111-5115.
- Potthast, K. 1977. Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products. An application of a new method. *Acta Aliment. Pol.* 3: 195-201.
- Real Decreto 1113/2006, de 29 de septiembre, por el que se aprueban las normas de calidad para quesos y quesos fundidos. *B.O.E.* 239, 6.10.2006: 34717-34720.
- Riha, W. E., W. L. Wendorff, and S. Rank. 1992. Benzo(a)pyrene content of smoked and smoked-flavored cheese products sold in Wisconsin. *J. Food Prot.* 55: 636-638.
- Rodríguez-García, M. E., C. de Lira, E. Hernández-Becerra, M. A. Cornejo-Villegas, A. J. Palacios-Fonseca, I. Rojas-Molina, R. Reynoso, L. C. Quintero, A. Del-Real, T. A. Zepeda, and C. Muñoz-Torres. 2007. Physicochemical characterization of nopal pads (*Opuntia ficus indica*) and dry vacuum nopal powders as a function of the maturation. *Plant Foods Hum. Nutr.* 62:107-112.

SCF. 2002. European Commission. Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in food. Report SCF/CS/CNTM/PAH/29 Final (4 December 2002).

Suchanová, M., J. Hajslová, M. Tomaniová, V. Kocourek, and L. Babicka. 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked cheese. *J. Sci. Food Agric.* 88: 1307-1317.

DISCUSIÓN

Resumen de los principales resultados obtenidos y discusión en relación con cada uno de los objetivos planteados.

A continuación se presenta un resumen de los resultados obtenidos y una discusión en relación con cada uno de los objetivos planteados.

Objetivo 1: Estudio de los componentes volátiles de queso Palmero artesanal ahumado con dos tipos distintos de materia vegetal, *acículas de pino* y *penca de tunera seca* (Manuscritos 1 y 2).

En ambos tipos de queso se detectó un **gran número de componentes**, más de 320, entre los cuales hay ácidos, alcoholes, ésteres, hidrocarburos, aldehídos, cetonas, derivados de furano y pirano, terpenos y sesquiterpenos, derivados nitrogenados, fenol, guayacol, siringol y derivados, éteres y otros. En este punto hay que señalar que en el artículo referido a los quesos ahumados con *penca de tunera* seca no se incluyeron todos los componentes de este tipo de queso. Por tanto, y con el fin de evitar llegar a conclusiones erróneas al considerar únicamente los datos incluidos en el referido artículo, en este apartado se muestran una serie de tablas con la totalidad de componentes detectados en los quesos ahumados con *acículas de pino* y con *penca de tunera* seca (Tablas 1 a 11). Hay que señalar que las abundancias se expresaron de la siguiente manera: +++: para cuentas de área mayores de 45.000.000, ++: para cuentas de área comprendidas entre 15.000.000 y 45.000.000, +: para cuentas de área comprendidas entre 500.000 y 15.000.000, tr: para un número muy bajo de cuentas de área y -: para los compuestos no detectados.

Tanto en los quesos ahumados con *acículas de pino* como en los ahumados con *penca de tunera* seca los **ácidos** (Tabla 1) constituyen uno de los grupos más importantes en términos de abundancia de área, y están presentes tanto en la región exterior del queso como en la interior. La mayoría son **ácidos saturados lineales** con un número par o impar de átomos de carbono, si bien las abundancias de los primeros son considerablemente más altas que las de los segundos. Dentro de éstos, en ambos tipos de queso Palmero destacan por su abundancia los ácidos hexanoico, octanoico y decanoico.

A pesar de que el queso Palmero está elaborado con leche de cabra, y de que la presencia de ciertos ácidos ramificados como el 4-metil- y el 4-etil-octanoico ha sido considerada por algunos autores como una característica del queso elaborado con este tipo de leche (Salles y col., 2002), únicamente el primero fue detectado en algunas de las muestras de queso Palmero ahumado con *acículas de pino*, y en concentraciones a nivel de trazas. De hecho, los principales ácidos ramificados en este tipo de queso Palmero fueron el 4-metil- y el 2-etil-hexanoico, siendo este último el único presente en los quesos ahumados con *penca de tunera* seca.

Por último, cabe mencionar la presencia, en ambos tipos de queso Palmero, de ácido benzoico; la formación de éste ha sido relacionada bien con un posible crecimiento bacteriano, o bien con la autooxidación del benzaldehído (Sieber y col., 1995), este último también presente en el espacio de cabeza de estos quesos.

Tabla 1. Ácidos (24) detectados en las regiones exterior e interior del queso Palmero ahumado con *acículas de pino* (AP) y con *penca de tunera* seca (PT) junto con una indicación de su abundancia.

TR (min)	Compuesto (peso molecular)	Pb ^a	AP		PT	
			Ext (17) ^b	Int (18)	Ext (20)	Int(10)
4,61	ácido acético (60)* ^d	43	++ ^c	++	++	++
8,87	ácido butanoico (88)*	60	++	++	++	++
11,02	ácido metil-butanoico (102)	60	-	tr	-	-
12,99	ácido pentanoico (102)*	60	+	+	-	-
17,32	ácido hexanoico (116)*	60	+++	+++	++	++
20,46	ácido 4-metil-hexanoico (130)	60	tr	tr	-	-
20,70	ácido heptanoico (130)*	60	tr	tr	tr	tr
22,41	ácido 2-etil-hexanoico (144)*	88	+	tr	tr	-
24,44	ácido benzoico (122)*	105	tr	tr	tr	-
24,80	ácido octanoico (144)*	60	+++	+++	+++	+++
26,85	ácido dihidroxi benzoico (154) (o isómero)	154	-	-	tr	-
26,99	ácido 4-metil-octanoico (158)*	60	tr	tr	-	-
27,97	ácido nonanoico (158)*	60	+	+	+	tr
30,69	ácido 4-hidroxi-3-metoxi-benzoico (168) (ácido vanílico)*	168	-	-	tr	-
31,51	ácido decanoico (172)*	60	+++	+++	+++	+++
34,76	ácido undecanoico (186)	60	+	+	tr	tr

Tabla 1. Continuación

TR (min)	Compuesto (peso molecular)	Pb ^a	AP		PT	
			Ext (17) ^b	Int (18)	Ext (20)	Int(10)
37,47	ácido dodecanoico (200)*	73	+	+	++	tr
43,04	ácido tetradecanoico (228)*	73	tr	+	++	-
45,66	ácido pentadecanoico (242)	73	tr	tr	tr	tr
47,68	ácido 9-hexadecenoico (254)	73	-	-	tr	-
48,13	ácido hexadecanoico (256)*	73	+	+	+++	-
50,53	ácido heptadecanoico (270)	73	-	-	tr	-
52,33	ácido 9-octadecenoico (282)	73	-	-	++	-
52,82	ácido octadecanoico (284)*	73	-	-	+	-

^a Pb: pico base. ^b Los números entre paréntesis se refieren al número de compuestos de cada familia. ^c Abundancia expresada en cuentas de área: +++: > 45.000.000; ++: 45.000.000-15.000.000; +: 15.000.000-500.000; tr: número muy bajo de cuentas de área; -: no detectado. ^d Los compuestos con asterisco fueron identificados mediante patrones.

Los **alcoholes** (Tabla 2), que pueden ser considerados componentes comunes del espacio de cabeza de una gran variedad de quesos, tanto ahumados como sin ahumar, son **escasos en los dos tipos de queso estudiados**; entre éstos se incluyen *alcoholes alifáticos y aromáticos*. Dentro de los *alifáticos*, presentes en general tanto en el exterior como en el interior de los quesos, destacan por su alta abundancia etanol y 2,3-butanodiol. El origen de los alcoholes *aromáticos*, como bencenometanol, podría estar en el humo, ya que se encuentran fundamentalmente en el exterior de los quesos.

Tabla 2. Alcoholes (12) detectados en las regiones exterior e interior del queso Palmero ahumado con *acículas de pino* (AP) y con *penca de tunera* seca (PT) junto con una indicación de su abundancia.

TR (min)	Compuesto (peso molecular)	Pb ^a	AP		PT	
			Ext (10) ^b	Int (6)	Ext (8)	Int (7)
Alcoholes alifáticos (9)						
3,94	etanol (46)* ^d	45	+++ ^c	+++	++	++
7,38	3-metil-1-butanol (88) (o isómero)	55	++	+	-	+
9,11	1,3-butanodiol (90) (o isómero)	45	+	++	+	+
9,35	2,3-butanodiol (90)*	45	+++	+++	++	++
12,24	hexanol (102)*	56	tr	-	-	-
13,54	2-heptanol (116) (o isómero)	70	tr	-	tr	-

Tabla 2. Continuación.

TR (min)	Compuesto (peso molecular)	Pb ^a	AP		PT	
			Ext (10) ^b	Int (6)	Ext (8)	Int (7)
Alcoholes alifáticos (9)						
18,93	2-etil-1-hexanol (130)	57	tr	-	tr	tr
19,22	dimetil-4-heptanol (144) (o isómero)	69	-	+	-	+
26,25	4-(1,1-dimetiletil)-ciclohexanol (156)	57	-	-	tr	-
Alcoholes aromáticos (3)						
19,21	bencenometanol (108)*	79	+	-	tr	-
20,39	metil-bencenometanol (122)	107	tr	-	-	-
22,45	bencenoetanol (122)	91	tr	tr	tr	tr

^a Pb: pico base. ^b Los números entre paréntesis se refieren al número de compuestos de cada familia. ^c Abundancia expresada en cuentas de área: +++: > 45.000.000; ++: 45.000.000-15.000.000; +: 15.000.000-500.000; tr: número muy bajo de cuentas de área; -: no detectado. ^d Los compuestos con asterisco fueron identificados mediante patrones.

El grupo de los **ésteres** (Tabla 3), **muy numeroso en ambos tipos de queso Palmero**, está formado principalmente por metil- y etil-ésteres. Si se observa la distribución de estos componentes en las diferentes partes del queso, puede comprobarse que algunos de ellos están presentes tanto en el exterior como en el interior; tal es el caso del butanoato de etilo o del decanoato de etilo en los quesos ahumados con *acículas de pino*, y del 4-metil-2-hidroxipentanoato de metilo en los quesos ahumados con *penca de tunera seca*. En cambio otros, entre los que se encuentran algunos ésteres aromáticos como el vanillato de metilo, típico componente del humo (Guillén e Ibargoitia, 1998) y presente en ambos tipos de queso, se detectaron únicamente en la región exterior.

En general, la mayoría de los ésteres fueron detectados en concentraciones a nivel de trazas.

Tabla 3. Ésteres (31) detectados en las regiones exterior e interior del queso Palmero ahumado con *acículas de pino* (AP) y con *penca de tunera seca* (PT) junto con una indicación de su abundancia.

TR (min)	Compuesto (peso molecular)	Pb ^a	AP		PT	
			Ext (20) ^b	Int (14)	Ext (15)	Int (7)
10,13	butanoato de etilo (116)* ^d	71	tr ^c	tr	-	-
15,65	4-metil-2-hidroxipentanoato de metilo (146) (o isómero)	43	-	-	tr	tr
16,67	hexanoato de metilo (130)*	74	tr	-	-	-
17,73	hexanoato de etilo (144)*	88	tr	-	-	tr
21,74	benzoato de metilo (136)*	105	tr	-	tr	-
24,91	bencenoacetato de metilo (150)	91	tr	-	-	-
25,38	octanoato de etilo (172)*	88	-	-	-	tr
25,97	metilbenzoato de metilo (150) (o isómero)	119	tr	-	tr	-
26,18	hidroxibenzoato de metilo (152) (o isómero)	152	-	-	tr	-
27,44	hexanoato de metilbutilo (186) (o isómero)	87	-	tr	-	-
29,07	nonanoato de metilo (172)*	74	tr	tr	-	-
30,30	2,5-dihidroxibenzoato de metilo (168) (o isómero)	136	tr	-	-	-
32,40	decanoato de etilo (200)*	88	+	tr	-	tr
35,04	butanodioato de bis-metilpropilo (230) (o isómero)	101	tr	-	-	-
36,42	4-hidroxi-3-metoxibenzoato de metilo (182)* (vanillato de metilo)	151	tr	-	tr	-
36,87	2-butanodioato de dibutilo (228) (o isómero)	56	tr	tr	-	-
38,05	pentanodioato de dibutilo (244) (o isómero)	115	tr	-	tr	-
38,50	dodecanoato de etilo (228)*	88	tr	tr	-	tr
38,54	4-hidroxi-3-metoxibenzoato de etilo (196) (vanillato de etilo)	151	-	-	tr	-
42,13	tetradecanoato de metilo (242)*	74	-	tr	tr	-
43,99	tetradecanoato de etilo (256)*	88	tr	tr	-	tr
44,79	miristato de isopropilo (270)	43	tr	tr	+	tr
47,31	hexadecanoato de metilo (270)	74	-	tr	-	-
48,95	hexadecanoato de etilo (284)	88	-	tr	-	-
49,66	hexadecanoato de 1-metiletilo (298)	43	-	-	tr	-
52,04	octadecanoato de metilo (298)	74	tr	tr	-	-
57,83	hexanedioato de dioctilo (370) (o isómero)	129	tr	-	tr	-
58,42	9-octadecenoato de 3-hidroxipropilo (340) (o isómero)	55	-	-	tr	-
59,30	octanoato de hexadecilo (368) (o isómero)	145	tr	tr	tr	-

Tabla 3. Continuación.

TR (min)	Compuesto (peso molecular)	Pb ^a	AP		PT	
			Ext (20) ^b	Int (14)	Ext (15)	Int (7)
63,03	octanoato de octadecilo (396) (o isómero)	145	tr	-	tr	-
88,19	tridecanoato de triglicerilo (554) (o isómero)	155	-	tr	tr	-

^a Pb: pico base. ^b Los números entre paréntesis se refieren al número de compuestos de cada familia. ^c Abundancia expresada en cuentas de área: +++: > 45.000.000; ++: 45.000.000-15.000.000; +: 15.000.000-500.000; tr: número muy bajo de cuentas de área; -: no detectado. ^d Los compuestos con asterisco fueron identificados mediante patrones.

El grupo de los **aldehídos** (Tabla 4) está formado fundamentalmente por *aldehídos alifáticos saturados* y por *aldehídos aromáticos*. Entre los **alifáticos saturados**, el más abundante en los quesos ahumados con *acículas de pino* es nonanal, mientras que en los ahumados con *penca de tunera* seca no se observaron apenas diferencias entre las abundancias de los distintos aldehídos. Aun cuando los aldehídos saturados eran los más numerosos entre los alifáticos, también se detectaron dos aldehídos **insaturados**: 2-nonenal y 2-decenal, en los quesos ahumados con *acículas de pino* y con *penca de tunera* seca respectivamente. Estos aldehídos, no muy comunes en queso, podrían tener su origen en el humo, ya que únicamente se detectaron en la región exterior. Entre los aldehídos **aromáticos**, hay algunos como benzaldehído y bencenoacetaldehído, presentes tanto en la región exterior como en la interior en ambos tipos de queso Palmero, que pueden considerarse como componentes comunes del queso (Careri y col., 1994). Sin embargo, hay otros aldehídos aromáticos, como bencenopropenaldehído en los quesos ahumados con *acículas de pino*, que sólo se observan en la parte más externa, y de hecho, son componentes típicos del humo (Guillén e Ibargoitia, 1998).

Tabla 4. Aldehídos (22) detectados en las regiones exterior e interior del queso Palmero ahumado con *acículas de pino* (AP) y con *penca de tunera* seca (PT) junto con una indicación de su abundancia.

TR (min)	Compuesto (peso molecular)	Pb ^a	AP		PT	
			Ext (17) ^b	Int (11)	Ext (15)	Int (6)
Aldehídos alifáticos (13)						
8,71	2-metil-2-butenal (84) (o isómero)	84	- ^c	-	tr	-
9,53	hexanal (100)* ^d	56	tr	-	-	-
17,88	octanal (128)*	57	tr	tr	-	-
22,02	nonanal (142)*	57	++	+++	tr	tr
24,25	2-nonenal (140)	41	tr	-	-	-
25,87	decanal (156)	57	tr	+	tr	tr
27,90	2-decenal (154)	57	-	-	tr	-
29,50	undecanal (170)	57	tr	tr	tr	tr
32,87	dodecanal (184)	57	+	tr	tr	tr
36,05	tridecanal (198)	57	tr	tr	tr	-
39,07	tetradecanal (212)	57	tr	tr	tr	-
41,91	pentadecanal (226)	57	tr	-	-	-
47,19	heptadecanal (254)	57	-	tr	tr	-
Aldehídos aromáticos (9)						
16,16	benzaldehído (106)*	105	tr	tr	tr	tr
19,65	2-hidroxibenzaldehído (122)	122	tr	-	tr	-
19,67	bencenoacetaldehído (120)*	91	tr	tr	tr	tr
21,20	metilbenzaldehído (120)	119	tr	-	-	-
21,92	benceno-propenaldehído (132)	131	tr	-	-	-
22,10	benceno-propenaldehído (132) (o isómero)	131	tr	-	-	-
24,15	3-hidroxi-4-metilbenzaldehído (136)	136	tr	tr	tr	-
25,78	hidroxi-metilbenzaldehído (136) (o isómero)	136	-	-	tr	-
31,19	etilideno-bencenoacetaldehído (146)	146	-	-	tr	-

^a Pb: pico base. ^b Los números entre paréntesis se refieren al número de compuestos de cada familia. ^c Abundancia expresada en cuentas de área: +++: > 45.000.000; ++: 45.000.000-15.000.000; +: 15.000.000-500.000; tr: número muy bajo de cuentas de área; -: no detectado. ^d Los compuestos con asterisco fueron identificados mediante patrones.

El grupo de las **cetonas** (Tabla 5) es uno de los más numerosos en los dos tipos de queso Palmero estudiados, pero sobre todo en los ahumados con *penca de tunera* seca. Dentro de

este amplio grupo de componentes se distinguen *cetonas alifáticas lineales y cíclicas*, así como *cetonas aromáticas*.

Tabla 5. Cetonas (63) detectadas en las regiones exterior e interior del queso Palmero ahumado con *acículas de pino* (AP) y con *penca de tunera seca* (PT) junto con una indicación de su abundancia.

TR (min)	Compuesto (peso molecular)	Pb ^a	AP		PT	
			Ext (40) ^b	Int (14)	Ext (56)	Int (8)
Cetonas alifáticas lineales (10)						
6,72	1-hidroxi-2-propanona (74)	43	- ^c	-	-	tr
7,28	3-hidroxi-2-butanona (88)* ^d	45	-	-	-	tr
12,27	1-(acetiloxi)-2-propanona (116)*	43	-	-	tr	-
13,10	2-heptanona (114)*	43	-	-	tr	tr
16,29	1-(acetiloxi)-2-butanona (130)	57	-	-	tr	-
25,44	2-decanona (156)*	58	tr	-	-	-
29,01	2-undecanona (170)*	58	tr	-	tr	-
35,57	2-tridecanona (198)*	58	-	-	tr	tr
41,48	2-pentadecanona (226)	58	tr	+	tr	-
49,55	2-octadecanona (268)	58	-	tr	-	-
Cetonas alifáticas cíclicas (19)						
9,25	ciclopentanona (84)*	55	tr	-	tr	-
10,87	2-ciclopenten-1-ona (82)	82	tr	tr	tr	-
11,17	2-metil-ciclopentanona (98)	69	tr	-	tr	-
13,30	ciclohexanona (98)*	55	tr	-	tr	-
13,80	2-metil-2-ciclopenten-1-ona (96)*	96	+	-	tr	-
15,02	ciclohexen-1-ona (96)	68	tr	-	tr	-
15,24	2-etilciclopentenona (110) (o isómero)	67	tr	-	tr	-
15,53	2,5-dimetil-2-ciclopentenona (110) (o isómero)	67	tr	-	-	-
16,31	3-metil-2-ciclopenten-1-ona (96)*	96	+	tr	tr	-
17,51	dimetil-2-ciclopentenona (110) (o isómero)	67	tr	-	tr	-
17,79	dimetil-2-ciclopentenona (110) (o isómero)	67	tr	-	-	-
17,86	3-metilciclohexanona (112)*	69	tr	tr	tr	-
19,31	trimetil-2-ciclopenten-1-ona (124) (o isómero)	109	tr	-	tr	-
19,43	dimetil-2-ciclopenten-1-ona (110) (o isómero)	95	+	tr	tr	-
20,44	trimetil-2-ciclopenten-1-ona (124) (o isómero)	109	+	tr	tr	-
21,05	3-etilciclopent-2-en-1-ona (110) (o isómero)	81	tr	-	tr	-

Tabla 5. Continuación.

TR (min)	Compuesto (peso molecular)	Pb ^a	AP		PT	
			Ext (40) ^b	Int (14)	Ext (56)	Int (8)
21,98	dimetil-ciclohexen-1-ona (124) (o isómero)	82	- ^c	-	tr	-
22,50	dimetil-ciclohexen-1-ona (124) (o isómero)	82	-	-	tr	-
23,18	(ciclohexenil)-etanona (124) (o isómero)	124	-	-	tr	-
Dicetonas alifáticas cíclicas (8)						
14,83	1,3-ciclopentanodiona (98) (o isómero)	42	-	-	tr	-
15,00	2,5-hexanodiona (114)*	43	-	-	tr	-
17,37	3,5-heptanodiona (128) (o isómero)	128	-	-	tr	-
18,92	3-metil-1,2-ciclopentanodiona (112) (cicloteno)*	112	++	tr	+	tr
20,11	3,5-dimetil-1,2-ciclopentanodiona (126)	126	+	-	tr	-
22,01	dimetil-ciclopentanodiona (126) (o isómero)	126	-	-	tr	-
22,63	3-etil-1,2-ciclopentanodiona (126)* (3-etilciclopentenolona)	126	+	tr	tr	-
26,06	etil-metil-ciclopentanodiona (140) (o isómero)	69	-	-	tr	-
Cetonas aromáticas y otros (26)						
20,60	1-fenil-etanona (120) (acetofenona)*	105	+	tr	tr	-
23,07	1-fenil-2-propanona (134)	43	tr	-	tr	-
23,42	(metilfenil)-etanona (134) (o isómero)	119	tr	-	tr	-
24,80	(metilfenil)-etanona (134) (o isómero)	119	tr	-	tr	-
25,26	(metilfenil)-etanona (134) (o isómero)	119	tr	-	tr	-
28,03	1-(2,4-dihidroxifenil)-etanona (152) (o isómero)	137	tr	-	tr	-
28,78	2,3-dihidro-1H-inden-1-ona (132)	132	+	tr	tr	-
29,39	(dihidroxifenil)-etanona (152) (o isómero)	137	-	-	tr	-
29,68	3-metil-2,3-dihidro-1H-inden-1-ona (146)	131	tr	-	tr	-
30,10	(hidroxi-metoxifenil)-etanona (166) (o isómero)	151	-	-	tr	-
31,30	hidroxi-metoxifenil-etanona (166) (o isómero)	151	tr	-	tr	-
31,94	metilbenzalacetona (160) (o isómero)	145	-	-	tr	-
32,81	metoxi-metil-acetofenona (164) (o isómero)	164	-	-	tr	-
34,13	dimetil-2,3-dihidro-1H-inden-1-ona (160) (o isómero)	160	tr	-	-	-
34,95	2,5-di-tert-butil-1,4-benzoquinona (220)*	220	-	-	tr	-
35,10	dimetil-2,3-dihidro-1H-inden-1-ona (160) (o isómero)	160	tr	-	tr	-

Tabla 5. Continuación.

TR (min)	Compuesto (peso molecular)	Pb ^a	AP		PT	
			Ext (40) ^b	Int (14)	Ext (56)	Int (8)
35,18	hidroxi-dimetoxifenil-etanona (196) (o isómero)	181	tr	-	tr	-
35,42	dimetil-2,3-dihidro-1H-inden-1-ona (160) (o isómero)	160	-	-	tr	-
35,52	1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-etanona (166) (acetovanillona)*	151	tr	-	tr	tr
35,94	(dimetoxifenil)-etanona (180) (o isómero)	180	-	-	tr	-
36,60	2-metil-1,4-naftalenodiona (172)	172	tr	-	tr	-
36,85	1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-propanona (180) (propiovanillona)*	137	tr	-	tr	-
39,41	1-(1-naftalenil)-etanona (170) (o isómero)	170	-	-	tr	-
39,86	difenil metanona (182)	105	+	tr	tr	tr
42,64	1-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-etanona (196) (acetosiringona)*	181	-	-	tr	-
49,01	9,10-antracenediona (208)	207	tr	tr	tr	tr
50,75	1,4-dimetil-9,10-antracenediona (236)	236	tr	tr	-	-

^a Pb: pico base. ^b Los números entre paréntesis se refieren al número de compuestos de cada familia. ^c Abundancia expresada en cuentas de área: +++: > 45.000.000; ++: 45.000.000-15.000.000; +: 15.000.000-500.000; tr: número muy bajo de cuentas de área; -: no detectado. ^d Los compuestos con asterisco fueron identificados mediante patrones.

Dentro del subgrupo de cetonas **alifáticas lineales** destaca la presencia, en concentraciones a nivel de trazas, de varias *metilcetonas* de entre 7 y 18 átomos de carbono. Las metilcetonas son componentes del queso bien conocidos cuya formación se ha atribuido a la β -oxidación de ácidos grasos. Dentro de las cetonas alifáticas, también hay un subgrupo de cetonas **cíclicas**, **más numerosas que las lineales**, y presentes sobre todo en la región exterior de ambos tipos de queso, ya que son conocidos componentes del humo (Guillén e Ibargoitia, 1996). Entre ellas destacan por su abundancia de área en los quesos ahumados con *acículas de pino* algunas metil-, dimetil- y trimetil-ciclopentenonas. Dentro del grupo de cetonas alifáticas cabe mencionar la ausencia casi total de concentraciones detectables de acetoína (3-hidroxi-2-butanona) y diacetilo (2,3-butanodiona), componentes comunes en otros tipos de queso.

Las **dicetonas cíclicas**, aunque poco numerosas, presentan **abundancias más altas que la mayor parte de cetonas detectadas**, destacando entre ellas el cicloteno. A pesar de que las

cetonas cíclicas son componentes del humo bien conocidos (Maga, 1988), puede observarse la presencia de algunas de ellas en concentraciones a nivel de trazas en el interior de los quesos, probablemente como consecuencia de un proceso de difusión desde el exterior.

Por último, entre las cetonas se incluye un importante número de **cetonas aromáticas**, la mayor parte de ellas componentes del humo, por lo que se encontraron casi exclusivamente en la región exterior.

Los **hidrocarburos** (Tabla 6) constituyen **otro de los grupos** de componentes **más numerosos en ambos tipos de queso**, aunque la mayor parte de ellos están presentes en concentraciones muy pequeñas. Entre éstos se incluyen *hidrocarburos alifáticos saturados e insaturados*, así como *monoaromáticos y poliaromáticos*. Dentro de los hidrocarburos **alifáticos**, se observan hidrocarburos lineales de entre 9 y 18 átomos de carbono, si bien aquéllos con una cadena de entre 9 y 14 átomos de carbono sólo fueron detectados en los quesos ahumados con *acículas de pino*. Tanto los hidrocarburos lineales saturados como los insaturados han sido detectados en queso sin ahumar (Larrayoz y col., 2001), si bien algunos de ellos pueden ser también componentes del humo (Guillén e Ibargoitia, 1998). En el caso concreto de los quesos Palmeros estudiados, se observa que, en los ahumados con *acículas de pino*, la mayoría de los hidrocarburos alifáticos están presentes en las diferentes partes del queso, mientras que en los ahumados con *penca de tunera seca* aparecen únicamente en el exterior. Por tanto, el origen de este tipo de componentes podría ser diferente en ambos tipos de queso. Sin embargo, en el caso de los hidrocarburos **mono- y poli-aromáticos**, la mayor parte fueron detectados exclusivamente en la región exterior de ambos tipos de queso Palmero, lo que apunta claramente al humo como principal origen de este tipo de componentes. No obstante, en los quesos ahumados con *acículas de pino*, algunos de los hidrocarburos aromáticos fueron detectados tanto en el exterior como en el interior, en ambos casos en concentraciones a nivel de trazas; esto pone de manifiesto que este tipo de componentes también podrían estar presentes en la leche de partida para la elaboración del queso, posiblemente como consecuencia de la ingesta por parte de las cabras de forraje

contaminado o debido a otras causas. De hecho, otros autores también han informado de la presencia de algunos de estos hidrocarburos, como ciertos alquilbencenos, en queso sin ahumar (Martínez-Castro y col., 1991; Careri y col., 1994; Jaillais y col., 1999).

Tabla 6. Hidrocarburos (56) detectados en las regiones exterior e interior del queso Palmero ahumado con *acículas de pino* (AP) y con penca de tunera seca (PT) junto con una indicación de su abundancia.

TR (min)	Compuesto (peso molecular)	Pb ^a	AP		PT	
			Ext (42) ^b	Int (15)	Ext (39)	Int (3)
Hidrocarburos alifáticos (19)						
13,47	nonano (128)* ^d	43	tr ^c	tr	-	-
20,41	2,3-dimetil-3-isopropil-ciclopenteno (138) (o isómero)	95	-	-	tr	-
25,68	dodecano (170)*	57	-	tr	-	-
32,28	tetradeceno (196)	57	tr	-	-	-
32,53	tetradecano (198)*	57	tr	-	-	-
34,90	1-pentadeceno (210) (o isómero)	57	+	tr	tr	tr
38,60	hexadecano (226)*	57	-	-	tr	-
40,87	1-heptadeceno (238)	83	tr	tr	tr	tr
41,26	heptadecano (240)*	55	tr	+	+	-
43,84	1-octadeceno (252) (o isómero)	57	tr	tr	-	-
44,12	octadecano (254)*	57	tr	tr	tr	-
45,34	3,7,11,15-tetrametil-2-hexadeceno (280) (fiteno)	70	tr	tr	-	-
49,10	eicoseno (282)*	281	tr	tr	tr	-
51,04	hidrocarburo lineal	-	-	-	tr	-
52,29	hidrocarburo lineal	-	tr	-	-	-
54,22	hidrocarburo insaturado	-	tr	-	-	-
55,26	hidrocarburo lineal	-	+	tr	-	-
55,74	hidrocarburo lineal	-	tr	-	tr	-
65,87	escualeno (410)*	69	-	+	tr	-
Hidrocarburos monoaromáticos (14)						
12,30	dimetilbenceno (106) (isómero)	91	tr	-	tr	-
13,19	estireno (104)*	104	tr	-	-	-
13,31	dimetilbenceno (106) (isómero)	91	tr	-	-	-
18,90	metil-metiletil-benceno (134) (isómero)	119	-	tr	-	-
27,31	butil-benceno (134)	91	tr	-	tr	-
29,28	1,2,4,5-tetrametil-benceno (134) (o isómero)	119	tr	tr	tr	-

Tabla 6. Continuación.

TR (min)	Compuesto (peso molecular)	Pb ^a	AP		PT	
			Ext (42) ^b	Int (15)	Ext (39)	Int (3)
30,06	etilbutenil-benceno (146) (o isómero)	146	-	-	tr	-
32,20	etilbutil-benceno (162) (o isómero)	162	-	-	tr	-
32,48	butiletil-benceno (162) (o isómero)	162	-	-	tr	-
33,35	butenil-dimetil-benceno (160) (o isómero)	160	-	-	tr	-
33,78	trietil-benceno (162)	162	tr	-	tr	-
33,89	1-butenil-dimetil-benceno (160) (o isómero)	145	tr	-	tr	-
33,91	1,1'-metilenebis-benceno (168) (o isómero)	168	tr	tr	tr	tr
35,28	hexametil-benceno (162) (o isómero)	162	-	-	tr	-
Hidrocarburos poliaromáticos (23)						
19,77	1H-indeno (116)	116	+	-	tr	-
23,90	metil-1H-indeno (130) (isómero)	130	tr	-	-	-
24,15	metil-1H-indeno (130) (isómero)	130	tr	-	-	-
24,27	azuleno (128)	128	tr	-	-	-
25,31	naftaleno (128)*	128	+	-	tr	-
27,45	decahidro-naftaleno (138)	138	tr	-	tr	-
29,36	2-metilnaftaleno (142)*	142	tr	tr	tr	-
29,93	1-metilnaftaleno (142)*	142	tr	-	tr	-
30,46	2,3-dihidro-trimetil-1H-indeno (160) (o isómero)	160	tr	-	-	-
30,99	2,3-dihidro-trimetil-1H-indeno (160) (o isómero)	160	tr	-	-	-
32,16	1,1'-bifenilo (154)	154	tr	-	tr	-
32,69	etil-naftaleno (156)	156	tr	-	tr	-
33,38	2,3-dihidro-trimetil-1H-indeno (160) (o isómero)	160	tr	-	tr	-
33,51	dimetil-naftaleno (156)	156	tr	-	tr	-
33,56	2,2'-dimetil-1,1'-bifenilo (182) (o isómero)	182	tr	-	tr	-
33,65	2,3-dimetil-naftaleno (156) (o isómero)	156	tr	-	tr	-
33,73	tetrahidro-dimetil-naftaleno (160) (o isómero)	160	tr	-	tr	-
34,56	acenaftileno (152)*	152	+	-	tr	-
34,66	dimetilnaftaleno (156) (o isómero)	156	-	-	tr	-
35,89	etil-1,1'-bifenilo (182) (o isómero)	182	-	-	tr	-
37,93	trimetilnaftaleno (170) (isómero)	155	-	-	tr	-
38,63	9H-fluoreno (166)	166	tr	-	tr	-

Tabla 6. Continuación.

TR (min) Compuesto (peso molecular)	Pb ^a	AP		PT	
		Ext (42) ^b	Int (15)	Ext (39)	Int (3)
44,19 fenantreno (178)*	178	tr	-	tr	-

^a Pb: pico base. ^b Los números entre paréntesis se refieren al número de compuestos de cada familia. ^c Abundancia expresada en cuentas de área: +++: > 45.000.000; ++: 45.000.000-15.000.000; +: 15.000.000-500.000; tr: número muy bajo de cuentas de área; -: no detectado. ^d Los compuestos con asterisco fueron identificados mediante patrones.

Los **derivados de furano y de pirano** (Tabla 7) constituyen otro grupo bastante numeroso en los dos tipos de queso Palmero estudiados, siendo su **número más alto en los ahumados con penca de tunera seca**. Este tipo de componentes pueden dividirse en dos subgrupos diferentes: por un lado, los de peso molecular más bajo, procedentes fundamentalmente del humo, y por otro, el grupo de γ - y δ -lactonas, con pesos moleculares, en general, más elevados.

Dentro de los primeros, destacan por su abundancia de área el 2-furanmetanol y el ácido 2-furancarboxílico, seguidos por 2-furancarboxaldehído, 2-acetilfurano o la γ -crotonolactona en los quesos ahumados con *acículas de pino*, y el maltol en los ahumados con *penca de tunera seca*. Probablemente debido a su alta abundancia, en los quesos ahumados con *acículas de pino* se observa que algunos de estos componentes, considerados típicos del humo (Guillén e Ibargoitia, 1996), están presentes también en el interior de los quesos, aunque en concentraciones a nivel de trazas; al igual que en el caso de las cetonas cíclicas, esto podría ser resultado de un proceso de difusión desde la parte más externa. En relación con las γ - y δ -lactonas, de entre 7 y 18 átomos de carbono, cabe señalar que se detectó un alto número de ellas; éstas podrían ser consideradas como componentes comunes del queso, resultantes de la ciclación de hidroxiacidos, si bien en el queso Palmero este tipo de componentes parece más numeroso que en otros tipos de quesos (Urbach, 1990).

Tabla 7. Derivados de furano y pirano (34) detectados en las regiones exterior e interior del queso Palmero ahumado con *acículas de pino* (AP) y con *penca de tunera* seca (PT) junto con una indicación de su abundancia.

TR (min)	Compuesto (peso molecular)	Pb ^a	AP		PT	
			Ext (21) ^b	Int (17)	Ext (31)	Int (8)
11,05	2-furancarboxaldehído (96) ^{*d}	96	+ ^c	-	tr	-
11,63	2-furanmetanol (98)*	98	++	tr	tr	tr
14,02	1-(2-furanil)-etanona (110) (2-acetilfurano)*	95	+	tr	tr	tr
14,39	2(3H)-dihidrofuranona (86)	42	+	tr	tr	tr
14,15	2(5H)-furanona (84) (γ -crotonolactona)*	55	+	tr	tr	tr
15,23	5-metil-2(5H)-furanona (98)*	55	tr	-	tr	-
15,80	ácido 2-furancarboxílico (112)	95	++	tr	tr	-
16,14	3-metil-5-metiliden-2(5H)-furanona (110) (o isómero)	110	tr	-	tr	-
16,27	5-metil-2-furancarboxaldehído (110)*	110	-	-	tr	-
16,82	2-furancarboxilato de metilo (126)	95	tr	-	tr	-
18,16	1-(2-furanil)-1-propanona (124) (o isómero)	95	-	-	tr	-
19,20	2-metil-3-furancarboxilato de metilo (140) (o isómero)	140	-	-	tr	-
19,75	3-metil-2(5H)-furanona (98)*	55	-	-	tr	-
20,28	5-metil-2(3H)-dihidrofuranona (100)	42	-	tr	-	-
22,42	3-hidroxi-2-metil-4H-piran-4-ona (126) (maltol)*	126	tr	-	+	tr
22,98	propil-2(3H)-dihidrofuranona (128) (o isómero)	42	-	-	tr	-
23,06	1-(5-metil-2-furanil)-1-propanona (138) (o isómero)	95	-	-	tr	-
25,06	hidroxi-(hidroximetil)-4H-piranona (142) (o isómero)	142	-	-	tr	-
25,71	etil-hidroxi-4H-piranona (140) (o isómero)	140	-	-	tr	-
27,87	γ -octalactona (142)	85	-	-	tr	-
28,91	δ -octalactona (142)	99	tr	+	tr	tr
35,80	δ -decalactona (170)*	99	tr	tr	tr	tr
36,19	2-metil-8H-ciclohepta(b)furan-8-ona (160) (o isómero)	160	tr	-	tr	-
36,66	metil-ciclohepta(b)furanona (160) (o isómero)	160	tr	-	-	-
38,92	δ -undecalactona (186)	99	-	tr	-	-
40,49	γ -dodecalactona (196)	85	tr	tr	tr	-
41,12	γ -dodecalactona (198)*	85	tr	+	tr	tr
41,94	δ -dodecalactona (198)*	99	tr	tr	tr	-
46,66	γ -tetradecalactona (226)	85	-	tr	tr	-

Tabla 7. Continuación.

TR (min)	Compuesto (peso molecular)	Pb ^a	AP		PT	
			Ext (21) ^b	Int (17)	Ext (31)	Int (8)
47,45	δ-tetradecalactona (226)	99	tr	tr	tr	-
51,68	γ-hexadecalactona (254)	85	tr	tr	tr	-
52,45	δ-hexadecalactona (254)	99	tr	tr	tr	-
56,23	γ-octadecalactona (282)	85	-	-	tr	-
56,97	δ-octadecalactona (282)	99	tr	tr	tr	-

^a Pb: pico base. ^b Los números entre paréntesis se refieren al número de compuestos de cada familia. ^c Abundancia expresada en cuentas de área: +++: > 45.000.000; ++: 45.000.000-15.000.000; +: 15.000.000-500.000; tr: número muy bajo de cuentas de área; -: no detectado. ^d Los compuestos con asterisco fueron identificados mediante patrones.

Otro grupo tan numeroso como el de derivados de furano y pirano es el de los éteres (Tabla 8), el cual se divide a su vez en tres subgrupos: *alquil-alquil éteres*, *éteres cíclicos o derivados de benzofurano* y *alquil-aril éteres (éteres alifático-aromáticos)*. Aunque los alquil-alquil éteres son los menos numerosos en ambos tipos de queso, entre ellos se incluyen algunos de los componentes con abundancias más altas dentro del grupo de los éteres como, por ejemplo, el 2-(2-etoxietoxi)-etanol. Cabe mencionar que los alquil-alquil-éteres están presentes tanto en la región exterior del queso como en la interior y, de hecho, algunos autores ya han descrito su presencia en queso sin ahumar (Moio y col., 1993; Careri y col., 1994; Lecanu y col., 2002). En relación con el resto de éteres detectados, podría decirse que en su mayoría proceden del humo, tal como puede deducirse de su presencia básicamente en la región exterior de los quesos. Dentro de éstos, los más abundantes en los quesos ahumados con *acículas de pino* son algunos alquil-aril éteres como dimetoxi- y trimetoxi-bencenos; en el caso de los ahumados con *penca de tunera* seca, todos los éteres procedentes del humo se encuentran en concentraciones a nivel de trazas.

Tanto los derivados de furano y pirano como los éteres que proceden fundamentalmente del humo son algo más numerosos en los quesos ahumados con *penca de tunera* seca, si bien las abundancias de algunos de ellos son más altas en los ahumados con *acículas de pino*.

Tabla 8. Éteres (35) detectados en las regiones exterior e interior del queso Palmero ahumado con *acículas de pino* (AP) y con *penca de tunera seca* (PT) junto con una indicación de su abundancia.

TR (min)	Compuesto (peso molecular)	Pb ^a	AP		PT	
			Ext (25) ^b	Int (6)	Ext (33)	Int (3)
Alquil alquil éteres (3)						
17,96	2-(2-etoxietoxi)-etanol (134)	45	++ ^c	++	++	++
23,34	4-butoxi-1-butanol (146)	57	tr	tr	tr	tr
31,01	1,4-dibutoxi-butano (202)	71	tr	++	tr	+
Éteres cíclicos o derivados de benzofurano (10)						
17,77	benzofurano (118)	118	tr	-	tr	-
22,31	2-metil-benzofurano (132) (o isómero)	131	tr	-	tr	-
23,89	dihidrobzofurano (120) (o isómero)	120	tr	-	tr	-
26,13	dimetilbenzofurano (146) (o isómero)	146	tr	-	tr	-
26,24	dihidrobzofurano (120) (o isómero)	120	+	tr	tr	-
26,45	dimetilbenzofurano (146) (o isómero)	146	tr	-	-	-
28,05	7-metoxi-benzofurano (148)	148	-	-	tr	-
31,12	1(3H)-isobenzofuranona (134)	105	-	-	tr	-
36,60	dibenzofurano (168)	168	tr	-	tr	-
40,65	metildibenzofurano (182) (o isómero)	182	-	-	tr	-
Éteres alifático-aromáticos (22)						
18,65	4-metil-1-metoxibenceno (122)	122	tr	-	tr	-
21,97	metil-1-metoxibenceno (122) (o isómero)	122	-	-	tr	-
23,67	1,2-dimetoxibenceno (138)* ^d (veratrol)	138	tr	-	tr	-
24,98	1,4-dimetoxibenceno (138)*	123	+	-	tr	-
25,25	1,3-dimetoxibenceno (138)*	123	+	-	tr	-
26,01	(eteniloxi)-benceno (120) (o isómero)	120	-	-	tr	-
26,54	2-fenoxi-etanol (138)	137	tr	tr	tr	-
26,57	dimetoxitolueno (152) (o isómero)	152	tr	-	tr	-
27,11	dimetoxitolueno (152) (o isómero)	152	tr	tr	tr	-
27,57	dimetoxitolueno (152) (o isómero)	152	tr	-	tr	-
28,08	dimetoxitolueno (152) (o isómero)	152	-	-	tr	-
29,71	trimetoxibenceno (168) (o isómero)	168	+	-	tr	-
29,81	dimetoxitolueno (152) (o isómero)	152	tr	-	tr	-
31,90	metil-propenil-metoxibenceno (162) (o isómero)	162	tr	-	tr	-
32,76	5-metil-1,2,3-trimetoxibenceno (182)	182	tr	-	tr	-

Tabla 8. Continuación.

TR (min)	Compuesto (peso molecular)	Pb ^a	AP		PT	
			Ext (25) ^b	Int (6)	Ext (33)	Int (3)
34,25	metil-propenil-metoxibenceno (162) (o isómero)	162	tr	-	-	-
35,20	propenil-dimetoxibenceno (178) (o isómero)	178	-	-	tr	-
35,73	propenil-dimetoxibenceno (178) (o isómero)	178	tr	-	tr	-
37,03	propenil-dimetoxibenceno (178) (o isómero)	178	-	-	tr	-
37,33	propenil-dimetoxibenceno (178) (o isómero)	178	tr ^c	-	tr	-
37,42	propenil-trimetoxibenceno (208) (o isómero)	208	-	-	tr	-
40,22	propenil-trimetoxibenceno (208) (o isómero)	208	-	-	tr	-

^a Pb: pico base. ^b Los números entre paréntesis se refieren al número de compuestos de cada familia. ^c Abundancia expresada en cuentas de área: +++: > 45.000.000; ++: 45.000.000-15.000.000; +: 15.000.000-500.000; tr: número muy bajo de cuentas de área; -: no detectado. ^d Los compuestos con asterisco fueron identificados mediante patrones.

Una de las principales diferencias entre el perfil volátil de los quesos ahumados con *acículas de pino* y con *penca de tunera* seca se encuentra en el grupo de los **terpenos y sesquiterpenos** (Tabla 9). Así, mientras que este tipo de componentes son **especialmente numerosos en los quesos ahumados con *acículas de pino***, en los ahumados con *penca de tunera* seca únicamente se ha detectado un terpeno. La presencia de terpenos y sesquiterpenos así como de algunos de sus derivados oxigenados en *acículas de pino* está bien documentada (Lapp y Von, 1982; Papadopoulou y Koukos, 1996; Marculescu y Gleizes, 2002), por lo que su presencia en este tipo de queso podría ser atribuida fundamentalmente al humo utilizado en su ahumado, y de hecho, estos componentes se encuentran sobre todo en el exterior.

Tabla 9. Terpenos, sesquiterpenos, derivados oxigenados y esteroides (14) detectados en las regiones exterior e interior del queso Palmero ahumado con *acículas de pino* (AP) y con *penca de tunera* seca (PT) junto con una indicación de su abundancia.

TR (min)	Compuesto (peso molecular)	Pb ^a	AP		PT	
			Ext (11) ^b	Int (6)	Ext (3)	Int (0)
15,06	α -pineno (136)* ^d	93	tr ^c	tr	-	-
17,84	carvomenteno (138) (o isómero)	95	-	tr	-	-
19,07	limoneno (136)*	68	tr	tr	-	-
24,35	terpeno (136)	107	tr	-	-	-
25,73	mirtenol (152) (o isómero)	79	tr	-	-	-
26,51	carveol (152) (o isómero)	81	tr	-	-	-
32,12	sesquiterpeno (204)	105	tr	-	-	-
32,71	sesquiterpeno (204)	105	tr	-	-	-
33,28	cipereno (204) (o isómero)	204	tr	tr	-	-
33,64	trans-cariofileno (204)	204	tr	tr	-	-
36,75	sesquiterpeno (204)	105	tr	-	-	-
45,30	sesquiterpeno oxigenado	-	tr	-	tr	-
67,70	colesta-3,5-dieno (368)	368	-	-	tr	-
73,07	colest-5-en-3-ol (386)	386	-	++	+	-

^a Pb: pico base. ^b Los números entre paréntesis se refieren al número de compuestos de cada familia. ^c Abundancia expresada en cuentas de área: +++: > 45.000.000; ++: 45.000.000-15.000.000; +: 15.000.000-500.000; tr: número muy bajo de cuentas de área; -: no detectado. ^d Los compuestos con asterisco fueron identificados mediante patrones.

Otro de los factores que podría contribuir a diferenciar los quesos Palmeros ahumados con *acículas de pino* y con *penca de tunera* es la presencia de **derivados nitrogenados** (Tabla 10), **más numerosos en los ahumados con *penca de tunera* seca**. Entre éstos se encuentran ***derivados de nitrilo y de indol***, presentes en ambos tipos de queso, si bien en los ahumados con *penca de tunera* seca se observaron también ***derivados de quinolina***, apenas presentes en los ahumados con *acículas de pino*. Tanto benzonitrilo como los derivados de indol han sido detectados antes en queso sin ahumar (Barbieri y col., 1994; Careri y col., 1994; Sunesen y col., 2001), habiéndose atribuido su presencia a la actividad de las bacterias del ácido láctico sobre los aminoácidos (Gao y col., 1997; Kemmer y col., 1997; Rychlik y Bosset, 2001; Valero y col., 2001; Tavaría y col., 2002); sin embargo, en el caso de los quesos Palmeros, la mayor parte de los derivados nitrogenados parecen proceder del ahumado.

Del mismo modo que se ha comentado para otros componentes del humo, en los quesos ahumados con *acículas de pino*, aquellos derivados nitrogenados con mayor abundancia de área, tales como benzonitrilo, 1H-indol o metil-1H-indol, fueron detectados también en el interior, aunque en concentraciones más bajas que en el exterior.

Tabla 10. Derivados nitrogenados (19) detectados en las regiones exterior e interior del queso Palmero ahumado con *acículas de pino* (AP) y con *penca de tunera* seca (PT) junto con una indicación de su abundancia.

TR (min)	Compuesto (peso molecular)	Pb ^a	AP		PT	
			Ext (12) ^b	Int (4)	Ext (16)	Int (2)
15,17	dimetilpiridina (107) (o isómero)	107	- ^c	-	tr	-
17,28	benzonitrilo (103)	103	+	tr	+	tr
20,32	1-(1H-pirrol-2-il)-etanona (109)	94	tr	-	tr	-
23,45	bencenoacetoneitrilo (117)	117	+	-	tr	-
27,26	bencenopropanonitrilo (131)	91	tr	-	tr	-
27,32	quinolina (129)	129	-	-	tr	-
27,35	fenil-propenonitrilo (129)	129	-	-	tr	-
28,42	metil quinolina (143) (o isómero)	143	-	-	tr	-
28,44	metil-1H-indol (131)	131	tr	-	tr	-
28,70	metil quinolina (143) (o isómero)	143	-	-	tr	-
29,16	isoquinolina (129)	129	tr	-	tr	-
29,22	1H-indol (117)	117	+	tr	tr	tr
30,14	isoquinolinol (145) (o isómero)	145	-	-	tr	-
31,18	3-(1-metil-2-pirrolidinil)-piridina (162) (nicotina)	162	tr	tr	-	-
31,76	dimetil-1H-indol (145) (o isómero)	144	tr	-	-	-
32,36	metil-1H-indol (131) (o isómero)	130	+	tr	tr	-
33,59	2-metil-1H-isoindol-1,3(2H)-diona (161) (o isómero)	161	tr	-	tr	-
34,71	1H-isoindol-1,3(2H)-diona (147) (o isómero)	147	tr	-	-	-
35,94	naftalenocarbonitrilo (153) (o isómero)	153	-	-	tr	-

^a Pb: pico base. ^b Los números entre paréntesis se refieren al número de compuestos de cada familia. ^c Abundancia expresada en cuentas de área: +++: > 45.000.000; ++: 45.000.000-15.000.000; +: 15.000.000-500.000; tr: número muy bajo de cuentas de área; -: no detectado. ^d Los compuestos con asterisco fueron identificados mediante patrones.

Por último, el **grupo más numeroso de componentes en ambos tipos de queso Palmero** es el de los **derivados fenólicos** (Tabla 11), constituido por *derivados de fenol*, de 2-

metoxifenol y de *2,6-dimetoxifenol*, siendo los primeros los más abundantes. Todos ellos son componentes del humo bien conocidos (Maga, 1988), y de hecho la mayor parte fueron detectados exclusivamente en la región exterior de los quesos. Además de por su alto número, los derivados fenólicos destacan también por su abundancia, siendo fenol, guayacol (2-metoxifenol), algunos de los derivados alquilados de ambos y siringol (2,6-dimetoxifenol), aquéllos con los valores de área más altos entre todos los presentes en el espacio de cabeza de estos quesos. Precisamente la presencia de altas abundancias de algunos de estos componentes en el exterior de los quesos puede explicar que se detecten también en la parte interior, como resultado de un proceso de difusión.

En la Tabla 11 puede comprobarse que las abundancias de los derivados de fenol son más altas en los quesos ahumados con *acículas de pino* que con *penca de tunera* seca, si bien en estos últimos se observa que el grupo de siringol y derivados no sólo es un poco más numeroso, sino que además las abundancias de algunos de ellos son más altas que en los ahumados con *acículas de pino*.

En los quesos ahumados con *penca de tunera* seca, además, se detectaron también en concentraciones a nivel de trazas, **difenol derivados**, como pirocatecol y algunos de sus derivados, prácticamente ausentes en los ahumados con *acículas de pino*. Por tanto, este tipo de componentes, conocidos por sus propiedades antioxidantes, podrían considerarse como un elemento distintivo de los quesos ahumados con *penca de tunera* seca. Y lo mismo podría decirse de los **derivados de naftalenol**, presentes únicamente en estos últimos.

En general, las abundancias de los componentes del humo respecto al total de componentes presentes en el espacio de cabeza de los quesos ahumados con *acículas de pino* fueron más altas que en el de los ahumados con *penca de tunera* seca; esto parece indicar que el grado de ahumado alcanzado era más bajo en estos últimos.

Tabla 11. Derivados fenólicos (78) detectados en las regiones exterior e interior del queso Palmero ahumado con *acículas de pino* (AP) y con *penca de tunera seca* (PT) junto con una indicación de su abundancia.

TR (min)	Compuesto (peso molecular)	Pb ^a	AP		PT	
			Ext (63) ^b	Int (18)	Ext (71)	Int (3)
Derivados de fenol (46)						
16,89	fenol (94)* ^d	94	+++ ^c	tr	++	tr
19,97	2-metilfenol (108)*	108	+++	tr	++	-
20,79	4-metilfenol (108)* y 3-metilfenol (108)*	107	+++	tr	++	-
22,15	2,6-dimetilfenol (122)*	122	++	tr	+	-
23,28	2-etilfenol (122)*	107	++	tr	+	-
23,69	2,4-dimetilfenol (122)* y 2,5-dimetilfenol (122)*	122	+++	tr	+	-
24,35	propilfenol (136) (o isómero)	107	tr	-	-	-
24,36	4-etilfenol (122)*	107	+	tr	+	-
24,44	3-etilfenol (122)*	107	+	-	+	-
24,85	2,3-dimetilfenol (122)*	122	+	-	tr	-
25,15	etil-metilfenol (136) (o isómero)	121	+	-	tr	-
25,38	dimetilfenol (122) (o isómero)	122	+	-	tr	-
25,69	trimetilfenol (136) (o isómero)	121	tr	-	tr	-
25,87	trimetilfenol (136) (o isómero)	121	+	-	tr	-
26,41	propilfenol (136) (o isómero)	107	tr	-	tr	-
26,67	etil-metilfenol (136) (o isómero)	121	+	tr	tr	-
26,77	etil-metilfenol (136) (o isómero)	121	+	-	tr	-
26,93	trimetilfenol (136) (o isómero)	121	+	-	tr	-
27,09	etil-metilfenol (136) (o isómero)	121	+	-	tr	-
27,21	etil-metilfenol (136) (o isómero)	121	+	-	tr	-
27,57	propenil-fenol (134) (o isómero)	134	tr	-	tr	-
27,69	metil-metiletil-fenol (150) (o isómero)	135	tr	-	tr	-
27,72	propilfenol (136) (o isómero)	107	tr	-	tr	-
27,78	metiletil-fenol (136) (o isómero)	121	+	tr	tr	-
27,91	etil-metilfenol (136) (o isómero)	121	tr	-	-	-
28,12	trimetilfenol (136) (o isómero)	121	tr	-	tr	-
28,28	trimetilfenol (136) (o isómero)	121	+	-	tr	-
28,45	trimetilfenol (136) (o isómero)	121	tr	-	tr	-
28,49	metil-metiletil-fenol (150) (o isómero)	135	tr	-	-	-
28,90	metil-metiletil-fenol (150) (o isómero)	135	tr	-	tr	-
28,91	propenil-fenol (134) (o isómero)	134	tr	-	tr	-
29,10	metil-metiletil-fenol (150) (o isómero)	135	+	-	tr	-
29,35	etilmetil fenol (136) (o isómero)	121	tr	-	tr	-

Tabla 11. Continuación.

TR (min)	Compuesto (peso molecular)	Pb ^a	AP		PT	
			Ext (63) ^b	Int (18)	Ext (71)	Int (3)
29,54	metilpropil-fenol (150) (o isómero)	121	tr	-	tr	-
29,64	dietilfenol (150) (o isómero)	135	tr	-	tr	-
30,21	metilpropil-fenol (150) (o isómero)	121	tr ^c	-	tr	-
30,65	2-(1,1-dimetiletil)-4-metil-fenol (164)*	164	-	-	tr	-
30,69	propenil-fenol (134) (o isómero)	134	tr	-	-	-
30,75	metil-propil-fenol (150) (o isómero)	121	tr ^c	-	-	-
33,42	dimetil-propenil-fenol (162) (o isómero)	162	-	-	tr	-
36,10	2,4-bis(1,1-dimetiletil)-fenol (206)* d	191	tr	tr	tr	-
36,31	2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metil-fenol (220) (BHT)*	205	tr	tr	tr	-
36,48	(1,1'-bifenil)-3-ol (170)	170	tr	tr	tr	-
37,87	2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-etil-fenol (234) ó 2,4-di-tert-butil-metilanisol (234) (ionol)	234	-	-	tr	-
39,93	tri-butilfenol (262) (o isómero)	233	tr	+	tr	-
53,44	4,4'-(1-metiletilidene)bis-fenol (228) (o isómero)	213	tr	tr	tr	-
Derivados de naftalenol (3)						
30,57	1-naftalenol (144)	144	-	-	tr	-
33,59	metil-1-naftalenol (158) (o isómero)	158	-	-	tr	-
40,84	metoxi-naftalenol (174) (o isómero)	174	-	-	tr	-
Difenol derivados (5)						
23,57	3-metoxi-1,2-bencenodiol (140) (3-metoxipirocatecol)*	140	+	-	tr	-
25,68	1,2-bencenodiol (110) (pirocatecol)*	110	-	-	tr	-
27,90	3-metil-1,2-bencenodiol (124) (3-metilpirocatecol)*	124	-	-	tr	-
28,01	2-metoxi-1,4-bencenodiol (140) (o isómero)	140	-	-	tr	-
28,99	4,5-dimetil-1,3-bencenodiol (138) (o isómero)	138	-	-	tr	-
Metoxifenol derivados (14)						
21,52	2-metoxifenol (124) (guayacol)*	109	+++	+	+++	tr
23,38	2-metil-3-metoxifenol (138) (o isómero)	123	tr	-	-	-
25,50	4-metil-2-metoxifenol (138) (4-metilguayacol)*	123	+++	tr	++	tr
26,99	2,3-dimetil-5-metoxifenol (152)	152	-	-	tr	-

Tabla 11. Continuación.

TR (min)	Compuesto (peso molecular)	Pb ^a	AP		PT	
			Ext (63) ^b	Int (18)	Ext (71)	Int (3)
28,64	4-etil-2-metoxifenol (152) (4-etilguayacol)*	137	++	tr	++	-
29,86	4-vinil-2-metoxifenol (150) (4-vinilguayacol)*	135	++	tr	++	-
31,31	4-(2-propenil)-2-metoxifenol (164) (eugenol)*	164	+	-	+	-
31,68	4-propil-2-metoxifenol (166) (4-propilguayacol)*	137	+	-	+	-
32,58	alil-metoxifenol (164) (o isómero)	164	tr	-	tr	-
32,74	4-hidroxil-3-metoxi-benzaldehído (152) (vanillina)*	151	tr	-	tr	-
33,02	4-(1-propenil)-2-metoxifenol (164) ^d (isoeugenol)*	164	+ ^c	-	+	-
33,57	5-(1-propenil)-metoxifenol (164) (o isómero)	164	tr	-	-	-
34,33	4-(1-propenil)-2-metoxifenol (164) (isoeugenol isómero)*	164	+	-	+	-
35,04	alil-metoxifenol (164) (o isómero)	164	-	-	tr	-
Dimetoxifenol derivados (10)						
27,44	dimetoxifenol (154) (o isómero)	154	tr	-	tr	-
31,08	2,6-dimetoxifenol (154) (siringol)*	154	+	-	++	-
34,16	4-metil-2,6-dimetoxifenol (168) (4-metilsiringol)*	168	+	-	+	-
36,29	propenil-dimetoxifenol (194) (o isómero)	194	tr	-	tr	-
36,65	4-etil-2,6-dimetoxifenol (182) (4-etilsiringol)	182	tr	-	+	-
38,41	4-vinil-2,6-dimetoxifenol (180) (4-vinilsiringol)	180	-	-	tr	-
38,94	4-(2-propenil)-2,6-dimetoxifenol (194)*	194	tr	-	tr	-
39,12	4-propil-2,6-dimetoxifenol (196) (4-propilsiringol)	196	-	-	tr	-
40,33	4-(1-propenil)-2,6-dimetoxifenol (194) (isómero)	194	-	-	tr	-
41,72	4-(1-propenil)-2,6-dimetoxifenol (194) (isómero)	194	tr	-	tr	-

^a Pb: pico base. ^b Los números entre paréntesis se refieren al número de compuestos de cada familia. ^c Abundancia expresada en cuentas de área: +++: > 45.000.000; ++: 45.000.000-15.000.000; +: 15.000.000-500.000; tr: número muy bajo de cuentas de área; -: no detectado. ^d Los compuestos con asterisco fueron identificados mediante patrones.

Como resumen de todo lo expuesto hasta ahora, puede decirse que, tal como cabría esperar, la región exterior de los quesos fue la más rica en componentes volátiles, debido a la

presencia no sólo de compuestos característicos del queso sino también de los procedentes del ahumado. La región interior, en cambio, resultó ser la región más pobre en componentes volátiles ya que, entre los compuestos procedentes del humo, sólo difunden hacia el interior aquéllos que se encuentran en abundancias de área altas en la región exterior; entre ellos cabe mencionar las cetonas cíclicas y dicetonas, algunos derivados de furano y pirano de bajo peso molecular, algunos alquil-aril éteres y algunos derivados de fenol y guayacol, aunque en concentraciones a nivel de trazas. El hecho de que la difusión de los componentes del humo hacia el interior del queso se produzca de forma muy limitada podría deberse al corto espacio de tiempo transcurrido entre el proceso de ahumado y el consumo de este queso. Como era de esperar, el espacio de cabeza de la sección laminar del queso contiene más componentes que la región interior pero menos que la región exterior.

Como característico de estos quesos Palmeros podría señalarse la riqueza en componentes de su espacio de cabeza, debida en gran parte al proceso de ahumado. Así pues, los grupos de componentes más numerosos, tanto en los quesos ahumados con *acículas de pino* como con *penca de tunera* seca, fueron precisamente algunos de los procedentes del humo, tales como derivados fenólicos, cetonas cíclicas y aromáticas, éteres y derivados de furano y pirano. Por otra parte, las abundancias de área más altas se observaron para algunos derivados fenólicos y ácidos. A pesar de que una gran parte de componentes volátiles fueron detectados en los dos tipos de queso, sus proporciones difieren de uno a otro. Además, también se encontraron algunos grupos de componentes que podrían considerarse característicos de cada una de las dos variedades de queso Palmero estudiadas. Tal es el caso de los terpenos y sesquiterpenos en los quesos ahumados con *acículas de pino*, y de los derivados difenólicos y de naftalenol en los ahumados con *penca de tunera* seca. Estos últimos, además, se caracterizan por un número más elevado de compuestos nitrogenados, especialmente de los derivados de quinolina, y de derivados de siringol que en los quesos ahumados con *acículas de pino*.

Objetivo 2: Estudio de los componentes volátiles de queso Herreño sin ahumar y queso Herreño ahumado en distintas posiciones dentro del ahumadero (Manuscrito 3).

Se identificaron un total de 228 componentes, entre los cuales había ácidos, alcoholes, ésteres, hidrocarburos, aldehídos, cetonas, derivados de furano, lactonas, éteres, terpenos y sesquiterpenos, derivados nitrogenados y fenol, guayacol, siringol y derivados. Aunque el número de componentes detectados en el queso sin ahumar (120) fue mucho menor que en los ahumados (221), en ambas variedades de queso Herreño el grupo más numeroso fue el de hidrocarburos, incluyendo terpenos y sesquiterpenos.

2.1. Comparación de la fracción volátil del queso Herreño sin ahumar y del queso Herreño ahumado

Aun cuando los **ácidos** son componentes comunes del queso, puede decirse que el **queso Herreño** es **particularmente rico en este tipo de componentes**, siendo su abundancia, en general, más alta en el queso sin ahumar que en los ahumados.

Por otra parte, también se observa que el queso Herreño, tanto ahumado como sin ahumar, es pobre en **alcoholes**.

En relación con los **ésteres**, hay que destacar que éstos son **muy escasos** en el espacio de cabeza del **queso sin ahumar**, habiéndose identificado únicamente tres **lactonas**, que son ésteres cíclicos; esto difiere de lo observado en los quesos ahumados, donde los ésteres son bastante numerosos. La presencia de estos componentes casi exclusivamente en el queso ahumado indica que, o bien proceden del humo, o bien son el resultado de reacciones que pueden tener lugar durante el proceso de ahumado, entre alcoholes y ácidos presentes en el queso. Esta última hipótesis está basada en el hecho de que los espacios de cabeza de los quesos ahumados presentan un escaso número de alcoholes y unas abundancias bajas de casi todos los ácidos en comparación con el queso sin ahumar.

Los ésteres detectados en el queso Herreño ahumado son principalmente ésteres metílicos, siendo el acetato y el benzoato de metilo los más abundantes. Con respecto a las lactonas,

dentro de éstas se distinguen dos tipos: furanonas (γ -lactonas) y piranonas (δ -lactonas). Las primeras sólo están presentes en los quesos ahumados. Sin embargo, dentro de las piranonas hay algunas que, como el maltol, son componentes del humo, mientras que otras aparecen tanto en los quesos ahumados como en el sin ahumar en abundancias similares; tal es el caso de la δ -octalactona, δ -decalactona y δ -dodecalactona.

Los **aldehídos** constituyen un **grupo de componentes muy importante** en el queso Herreño. Hay que destacar, que, excepto aquellos aldehídos que son componentes del humo bien conocidos, y que por tanto sólo están presentes en el queso ahumado, o sus concentraciones son más altas en éste que en el sin ahumar, los demás aldehídos, en general, se encuentran en similares concentraciones en ambas variedades de queso.

El grupo de las **cetonas** es **uno de los mayoritarios, tanto en número como en abundancia, en ambos tipos de queso**, siendo la acetoina la más abundante en el queso sin ahumar. Dentro de este grupo, la mayoría de *cetonas alifáticas* y *cíclicas* están presentes tanto en el queso sin ahumar como en los ahumados; entre las primeras, hay varias metilcetonas tales como 2-pentanona, 2-heptanona, 2-nonanona y 2-undecanona, que son componentes comunes del queso. El ahumado enriquece el espacio de cabeza del queso Herreño en este tipo de compuestos, ya que aumenta la concentración de *cetonas alifáticas* y de *cetonas cíclicas* en relación con el queso sin ahumar, como ejemplo se pueden citar la 3-metil-2-ciclopenten-1-ona y varias dimetil- y trimetil-ciclopentenonas.

En cuanto a las **dicetonas**, sólo el diacetilo (2,3-butanodiona), componente común del queso, ha sido encontrado en similar concentración tanto en el queso sin ahumar como en los ahumados; el resto sólo están presentes en los quesos ahumados, siendo las dicetonas *cíclicas* más abundantes que las *lineales*.

El espacio de cabeza del queso Herreño contiene un **alto número de hidrocarburos**, tanto *alifáticos* como *aromáticos*, estando la mayoría de los *alifáticos* en abundancias similares en ambos tipos de queso. Los *hidrocarburos aromáticos*, en cambio, son más numerosos y abundantes en los quesos ahumados, lo que indica que la mayoría de ellos tienen su origen en el proceso de ahumado. Entre los hidrocarburos aromáticos detectados en el queso sin

ahumar, cabe destacar por su elevada abundancia el tolueno, cuya presencia podría estar relacionada con la contaminación medioambiental o con el metabolismo del β -caroteno en la leche. Asimismo, los hidrocarburos poliaromáticos detectados en la variedad sin ahumar podrían ser resultado de la ingestión de alimentos contaminados por los animales productores de la leche.

Tanto en el queso ahumado como en el sin ahumar se ha identificado un **elevado número de terpenos y sesquiterpenos**, siendo α -pineno y canfano los más abundantes en ambos casos. Este tipo de componentes pueden proceder del humo, como en el caso del queso Palmero ahumado con *acículas de pino*, pero también de la leche empleada en la elaboración del queso, ya que estos compuestos se generan en el metabolismo secundario de plantas, y por tanto pueden llegar a la leche a través de su ingestión por los animales productores de ésta. Teniendo en cuenta que algunos terpenos y sesquiterpenos se encuentran en concentración similar en el queso Herreño sin ahumar y en los ahumados, su presencia podría atribuirse a la alimentación del ganado. No obstante, hay que señalar que el proceso de ahumado enriquece el perfil volátil del queso Herreño en terpenos, no sólo dando lugar a concentraciones más altas de algunos de los presentes en el queso sin ahumar, sino también aportando otros terpenos nuevos como aloocimeno, α -terpinoleno, α -terpineno y β -canfor. Por tanto, la presencia de terpenos y especialmente sesquiterpenos podría considerarse como una característica distintiva de este tipo de queso.

Otra **característica importante** de la **composición volátil** del **queso Herreño** la constituyen los **derivados nitrogenados**, dentro de los que se incluyen *derivados de nitrilo* y *derivados de piridina y pirazina*. Aunque algunos de estos componentes están presentes en el queso sin ahumar, tanto su número como su abundancia aumenta considerablemente con el proceso de ahumado, especialmente de los derivados de piridina. De hecho, entre todos los derivados nitrogenados detectados, sólo uno de ellos, el alcaloide **β -nicotirina**, se encuentra en abundancia similar en ambos tipos de queso, por lo que su origen parece ser la leche empleada para la elaboración del queso y no el proceso de ahumado. Este compuesto, cuya presencia en queso sólo ha sido recogida en Idiazabal (Guillén y Abascal, 2012), ha sido

descrito como uno de los alcaloides presentes en *Nicotiana paniculata* (Gonzalez y Rodriguez, 1962), una de las especies potencialmente invasoras que crece en las Islas Canarias.

Los **derivados fenólicos**, componentes típicos del humo y detectados únicamente en el queso Herreño ahumado, contribuyen en alta proporción al total de componentes volátiles de esta variedad, tanto en número como en abundancia. Están constituidos por *fenol* y *sus derivados*, que son los más numerosos, así como por *derivados de 2-metoxifenol* y *2,6-dimetoxifenol*, siendo los más abundantes guayacol (2-metoxifenol), fenol y metil- derivados de ambos.

Los **éteres** también son componentes del humo bien conocidos (Guillén e Ibargoitia, 1998), si bien algunos de ellos están presentes en el queso sin ahumar, aunque en concentraciones más bajas que en los ahumados. En este grupo se incluyen *alquil-aril éteres* y *derivados del furano*, siendo estos últimos los más abundantes en el queso ahumado. Precisamente uno de estos derivados del furano, el 2-furancarboxaldehído, es el compuesto más abundante no sólo entre los derivados de furano sino también entre todos los grupos de volátiles detectados en el queso Herreño ahumado.

2.2. Comparación de los componentes detectados en el queso Herreño ahumado con los del queso Palmero.

Aunque la fibra utilizada para el estudio del queso Palmero no fue la misma que la utilizada en el caso del queso Herreño, se pueden encontrar algunas similitudes entre los perfiles volátiles de ambos. Así, hay que destacar que los componentes típicos del humo tales como derivados fenólicos, cetonas cíclicas y aromáticas, dicetonas, alquil-aril éteres y derivados de furano son, en general, los más numerosos y algunos de los más abundantes en ambos tipos de queso. Es más, como en los quesos Palmeros, en el queso Herreño los derivados fenólicos más abundantes fueron guayacol, fenol y derivados de ambos, como era de esperar, al ser componentes mayoritarios del humo. Sin embargo, entre las cetonas

aromáticas y dicetonas del queso Herreño ahumado, ni las metil-indanonas ni la 2-ciclopenten-1,4-diona han sido detectadas en queso Palmero.

Aunque en menor proporción que los grupos de componentes anteriormente citados, el proceso de ahumado también enriquece el perfil volátil del queso Herreño en ésteres, aldehídos, hidrocarburos aromáticos y derivados nitrogenados.

En relación con los ésteres, se observa que, tanto en el queso Herreño ahumado como en los Palmeros, la mayoría o gran parte de los procedentes del ahumado son ésteres metílicos; esto difiere de lo observado, en general, en quesos sin ahumar, donde normalmente predominan los ésteres etílicos (Delgado y col., 2010, 2011; Hayaloglu y col., 2013).

Respecto a los derivados nitrogenados, debe señalarse que, aunque este tipo de componentes se detectaron tanto en el queso Herreño ahumado como en los quesos Palmeros, se observan algunas diferencias entre ambos tipos de queso. Así, mientras que los derivados de nitrilo se encontraron tanto en el queso Herreño como en el Palmero, **ninguno de los derivados de piridina y pirazina presentes en el queso Herreño ahumado fue detectado en los quesos Palmeros estudiados.**

Por último, cabe destacar que, aun cuando el grupo de terpenos y sesquiterpenos fue bastante numeroso en el queso Palmero ahumado con *acículas de pino*, algunos de los terpenos característicos del queso Herreño ahumado, tales como aloocimeno, α -terpinoleno, α -terpineno y β -canfor, no fueron detectados en el queso Palmero.

En resumen, puede decirse que, aunque se han encontrado algunas similitudes entre el perfil volátil del queso Herreño ahumado y el del queso Palmero, hay algunos componentes o grupos de componentes que podrían considerarse específicos del queso Herreño y que podrían contribuir a distinguirlo del Palmero, así como de otros tipos de queso ahumado; entre otros, pueden citarse las metil-indanonas, los derivados de piridina y pirazina, y algunos terpenos como aloocimeno, α -terpinoleno, α -terpineno y β -canfor. Por otra parte, teniendo en cuenta que ninguno de estos componentes se encontraron en los quesos Palmeros ahumados con *penca de tunera* seca, y que este último es uno de los materiales vegetales con los que se

ahumó el queso Herreño, podría pensarse que su presencia en este queso tal vez sea debida a la madera de tronco de higuera utilizada para producir el humo.

2.3. Influencia de la posición en el ahumadero sobre el perfil volátil del queso Herreño ahumado

El análisis estadístico de los resultados no puso de manifiesto diferencias significativas entre las abundancias de la mayoría de componentes volátiles de los quesos ahumados en posición A y en posición B. No obstante, los resultados obtenidos sugieren un grado ligeramente más alto de ahumado de los quesos ahumados en la posición A, ya que en éstos se observaron abundancias más altas de derivados fenólicos.

2.4. Comparación del queso Herreño sin ahumar con algunos quesos de cabra.

En líneas generales, puede decirse que aunque el queso Herreño está hecho con mezcla de leche de cabra, oveja y vaca, algunos quesos de cabra como el español Ibores (Delgado y col., 2011), el turco Gokceada (Hayaloglu y col., 2013) o el queso Teleme (Massouras y col., 2006), los **ácidos** y las **cetonas** se encuentran **entre los principales grupos de componentes** del espacio de cabeza del **queso Herreño**. Sin embargo, se han encontrado algunas diferencias importantes entre el perfil volátil del queso Herreño y los de otros quesos de cabra. Así, mientras que el queso Herreño podría considerarse que es más rico en cetonas, aldehídos e hidrocarburos que otros quesos de cabra, su proporción de alcoholes y de ésteres es muy baja. Por otra parte, en el queso Herreño se han detectado algunos grupos de componentes que no se encuentran habitualmente en otros tipos de queso de cabra, o al menos no en número tan alto, como, por ejemplo, terpenos y sesquiterpenos y derivados nitrogenados.

Objetivo 3: Determinación de la contaminación por HAPs de queso Palmero artesanal ahumado con dos tipos de materia vegetal: cáscara de almendra y penca de tunera seca (Manuscrito 4).

Se estudió la presencia de HAPs en queso Palmero elaborado por diferentes artesanos y ahumado con dos tipos de materia vegetal, *cáscara de almendra* y *penca de tunera* seca, con el fin de conocer el grado de contaminación de este tipo de queso y estudiar la posible influencia del material de ahumado en el perfil de HAPs y en sus concentraciones.

Cabe señalar que este estudio no se centró en un grupo de HAPs concreto y limitado, sino que incluía todos los HAPs que pueden estar presentes en alimentos ahumados.

Los resultados obtenidos revelaron que todos los quesos contenían HAPs, si bien sus **concentraciones totales** eran **mucho más bajas en los quesos ahumados con *penca de tunera* seca** (de 29,21 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 193,11 $\mu\text{g}/\text{kg}$) **que en los ahumados con *cáscara de almendra*** (de 42,46 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 739,55 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Entre los HAPs detectados se observó la presencia de compuestos de bajo peso molecular, como naftaleno o acenaftileno, pero también de HAPs de alto peso molecular, como benzo(a)antraceno, criseno e incluso benzopirenos o benzo(ghi)perileno en dos de los estudiados (uno de ellos ahumado con *cáscara de almendra* y el otro con *penca de tunera* seca).

Tal como cabría esperar teniendo en cuenta que la principal fuente de HAPs en los quesos estudiados es el proceso de ahumado, el perfil de HAPs de estos quesos Palmeros es muy similar al observado anteriormente en aromas de humo (Guillén y col., 2000b, c; Conde y col., 2005), así como en otros quesos ahumados comerciales españoles (Guillén y Sopolana, 2004), de tal modo que:

- Tanto el número como la concentración de HAPs ligeros fueron mayores que los de HAPs pesados;
- Naftaleno y sus alquilderivados fueron los HAPs más abundantes en todas las muestras;
- Los derivados alquilados fueron muy numerosos, suponiendo su concentración entre un 52,5 % y un 67,0% del total, aun cuando este grupo de HAPs es raramente considerado en los

estudios sobre queso ahumado o alimentos en general. Se trata principalmente de derivados de naftaleno, pero también de fenantreno, fluoranteno y pireno.

Cabe destacar que, a pesar de que cada queso fue elaborado por un artesano diferente, y de que cada uno presentaba un grado diferente de contaminación, el análisis detallado del perfil de HAPs permite observar algunas *similitudes en el perfil de HAPs de todos los quesos estudiados*. Así pues, se ha encontrado una **relación muy estrecha entre las concentraciones de algunos pares de isómeros**. Tal es el caso de **fenantreno y antraceno**, ya que el primero está siempre presente en concentración más alta que el segundo; no obstante, la relación entre estos dos HAPs parece variar dependiendo de su nivel de concentración, siendo las muestras más contaminadas las que presentan la proporción más baja de fenantreno en relación con antraceno. Otros isómeros como **fluoranteno y pireno** presentan una relación más constante entre sus concentraciones, la cual varía entre 1,2 y 1,5 en todos los quesos, independientemente de su grado de contaminación por HAPs. Valores similares fueron observados en estudios previos sobre la presencia de HAPs en aromas de humo (Guillén y col., 2000a,b), en humo (Conde y col., 2005) y en quesos ahumados comerciales (Guillén y Sopelana, 2004).

También se han encontrado **similitudes** en el perfil de HAPs de las diferentes muestras **en relación con los HAPs alquilados**, como por ejemplo entre **2- y 1-metilnaftaleno**, cuyas concentraciones guardan una relación que varía entre 1,2 y 1,6.

Con el fin de estudiar en detalle si había alguna *relación entre el tipo de materia vegetal utilizada en el proceso de ahumado y el perfil de HAPs de los quesos*, se determinaron ciertas relaciones entre las concentraciones de algunos HAPs. Las relaciones estudiadas fueron entre las concentraciones de naftaleno y fenantreno con el total de sus respectivos derivados mono- y di-metilados (**cocientes de alquilación**). Los valores de estos cocientes eran algo más bajos en los quesos ahumados con *cáscara de almendra* que en los ahumados con *penca de tunera seca*, sobre todo los del cociente entre la concentración de fenantreno y la de dimetilfenantrenos. Esto sugiere que la **formación de HAPs alquilados** durante el proceso

de generación del humo, particularmente de dimetilfenantrenos, está **más favorecida** en el ahumado con *cáscara de almendra*.

Por otra parte, teniendo en cuenta que, según uno de los mecanismos propuestos para la formación de HAPs durante la pirólisis de la madera, los HAPs más pesados pueden formarse a partir de otros de peso molecular más bajo por adición de unidades más pequeñas a radicales arilo (Frenklach y Warnatz, 1987), se calcularon también los cocientes entre las concentraciones de parejas de HAPs que difieren en un anillo aromático (**cocientes de aromaticidad**), tales como naftaleno/acenaftileno, naftaleno/fenantreno, fenantreno/pireno y pireno/benzo(a)pireno. De hecho, la formación de fenantreno a partir de naftaleno y de benzo(a)pireno a partir de pireno han sido observadas previamente (Möhler, 1980).

Entre las **diferencias atribuibles al material de ahumado utilizado**, se puede señalar que los valores del cociente naftaleno/acenaftileno en los quesos ahumados con *cáscara de almendra* son más bajos que en los quesos ahumados con *penca de tunera* seca, lo que parece indicar una **mayor tendencia a formarse acenaftileno a partir de naftaleno** en la **pirólisis** de las *cáscara de almendra*. Además, si se comparan las dos únicas muestras con niveles detectables de benzo(a)pireno, una de ellas ahumada con cáscara de almendra y la otra con *penca de tunera* seca, se observa que el cociente pireno/benzo(a)pireno es mucho más bajo en la primera; esto refleja una proporción más alta de benzo(a)pireno en el queso ahumado con *cáscara de almendra*.

Aun cuando estos cocientes de aromaticidad permiten apreciar algunas diferencias entre los quesos ahumados con ambas materias vegetales, también se observan algunos aspectos comunes a todos ellos. Así, considerando las muestras ahumadas con una misma materia vegetal, puede comprobarse que en aquéllas con un grado más alto de contaminación por HAPs, los valores de los cocientes naftaleno/acenaftileno y naftaleno/fenantreno son más bajos que en el resto de las muestras. De esto podría inferirse que las **condiciones de ahumado que conducen a una mayor generación de HAPs**, dan lugar también a **proporciones más altas de acenaftileno y fenantreno en relación con naftaleno**; esto

podría estar relacionado con una formación más intensa de HAPs de peso molecular más alto a partir de naftaleno en tales condiciones.

Por último, cabe señalar que el **cociente entre las concentraciones de fenantreno y pireno**, el cual podría expresar la formación de pireno a partir de fenantreno, es **el que menos varía**, siendo sus valores del mismo orden en los quesos ahumados con *penca de tunera* seca (4,4-10,0) y con *cáscara de almendra* (6,3-8,2).

Con el objetivo de analizar si existía alguna *relación entre la intensidad de ahumado de los distintos quesos y su grado de contaminación por HAPs*, se comparó este último parámetro con la abundancia total de algunos componentes típicos del humo en el espacio de cabeza de cada queso, asumiendo que una concentración más alta de este tipo de componentes es debida a un ahumado más intenso. Asimismo, con la idea de comprobar si el grado de ahumado podía influir de diferente forma en la concentración en el queso de ciertos HAPs, se calcularon las concentraciones totales de HAPs ligeros y pesados.

Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que, entre los quesos ahumados con el mismo tipo de materia vegetal, el grado de ahumado parecía tener influencia principalmente en la concentración de los HAPs pesados. Así, valores crecientes en concentraciones totales de componentes del humo coincidían con valores crecientes en las concentraciones de HAPs pesados.

En relación con la presencia de *HAPs carcinogénicos*, se detectaron compuestos con diferentes grados de carcinogenicidad en todas las muestras estudiadas. Entre ellos, naftaleno y benzo(a)antraceno, considerados por la IARC como “posiblemente carcinogénicos en humanos” (grupo 2B; IARC, 2002, 2010), estaban presentes en todos los quesos estudiados. Sin embargo, hay que señalar que, mientras que el nivel de benzo(a)antraceno era muy bajo en todos los casos (entre 0,03 y 1,01 µg/kg), naftaleno era el HAP más abundante en la mayoría de los quesos.

Además, en dos de las muestras estudiadas se detectaron otros HAPs de alto peso molecular, considerados también como “posiblemente carcinogénicos en humanos” por la

IARC, como benzofluorantenos e indeno(1,2,3-cd)pireno, aunque en concentraciones muy bajas.

Benzo(a)pireno, único HAP clasificado por la IARC como “carcinogénico en humanos” (grupo 1), sólo fue detectado en dos de las muestras estudiadas, y en concentraciones mucho más bajas que el máximo de 10 µg/kg establecido en España para la corteza de queso ahumado madurado (Real Decreto 1113/2006), que es el único límite legal aplicable al queso ahumado en nuestro país.

Considerando los resultados de otros estudios realizados previamente en nuestro laboratorio (Guillén y Sopelana, 2004), en los que se observó que benzo(a)pireno estaba concentrado casi exclusivamente en la parte exterior del queso, se calcularon las concentraciones de benzo(a)pireno que corresponderían a los quesos enteros. Los valores obtenidos (0,16 y 0,03 µg/kg) resultaron ser muchos más bajos que el máximo de 5 µg/kg establecido por la Unión Europea en 2005 para algunos alimentos ahumados (Reglamento de la Comisión N° 835/2011; Comisión Europea, 2005b), si bien esta regulación no hace referencia al queso. No obstante, cabe mencionar que la concentración de benzo(a)pireno en el queso ahumado con *penca de tunera* seca coincide con el límite máximo de 0,03 µg/kg permitido en los alimentos ahumados con aromas de humo (Unión Europea, 1988), que es mucho más restrictivo que el aplicable a los alimentos tratados con humo.

Por último, si se comparan los niveles de HAPs de estos quesos Palmeros con los de otros quesos comerciales españoles ahumados estudiados anteriormente en nuestro laboratorio (Guillén y Sopelana, 2004), puede decirse que el grado de contaminación de los primeros es mucho menor.

Objetivo 4: Determinación de la contaminación por HAPs de queso Herreño sin ahumar y de queso Herreño ahumado en diferentes posiciones dentro del ahumadero (Manuscrito 5).

Se estudió el grado de contaminación por HAPs de queso Herreño sin ahumar y de queso Herreño ahumado en distintas posiciones dentro del ahumadero, siguiendo la misma metodología que en el caso del queso Palmero.

Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que todos los quesos Herreños estudiados, tanto los ahumados como el sin ahumar, contenían HAPs en su parte más externa. En todos los casos, los más abundantes fueron los ligeros (2 ó 3 anillos aromáticos), sobre todo naftaleno y sus derivados alquilados.

4.1. Grado de contaminación de los quesos ahumados: influencia de la posición de los quesos en el ahumadero

Aunque todos los quesos Herreños ahumados estudiados fueron fabricados al mismo tiempo y ahumados simultáneamente en el mismo ahumadero, sus concentraciones totales de HAPs fueron diferentes. Los valores extremos se encontraron en los quesos situados en la posición más baja (B), correspondiendo la concentración más alta al situado más cerca de la entrada del humo (1B: 1.915,16 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y la más baja al más alejado (4B: 423,39 $\mu\text{g}/\text{kg}$). En ambos casos, el tiempo de ahumado fue doble que en los quesos situados más arriba (posición A).

Dejando aparte los quesos situados más cerca de la entrada del humo (1A y 1B), en el resto de quesos estudiados se observó que, a pesar de su mayor tiempo de ahumado, los colocados en la parte más baja (3B y 4B) mostraban concentraciones totales de HAPs inferiores a las de los quesos situados más arriba (2A y 4A). También pudo comprobarse que, exceptuando la muestra 1A, los quesos más cercanos a la entrada del humo eran los más contaminados. Estas diferencias entre los quesos de los grupos A y B no parecen estar asociadas claramente ni a la altura de los quesos ni al tiempo de ahumado; sin embargo, podrían relacionarse con la trayectoria que describe el humo en el ahumadero, determinada básicamente por el flujo

natural de humo establecido entre la entrada y la salida del mismo. Debe tenerse en cuenta que el humo tiende a ascender, y al enfriarse, es posible que los HAPs que contiene se condensen, principalmente sobre la superficie de los quesos que más próximos se encuentran a su trayectoria. De hecho, los quesos con mayor grado de contaminación (1B, 2A y 4A) parecen ser aquéllos que podrían considerarse situados más cerca de esa trayectoria, mientras que los colocados más lejos de la misma (1A, 3B y 4B) muestran un grado de contaminación menor.

Si se comparan las concentraciones totales de HAPs de estos quesos Herreños (423,39-1.915,16 µg/kg) con las del queso Palmero (29,21-739,55 µg/kg) y con las de otros quesos comerciales ahumados españoles estudiados anteriormente (36,31-1.037,23 µg/kg; Guillén y Sopolana, 2004), puede comprobarse que los valores más altos corresponden al queso Herreño. Sin embargo, debe señalarse que, en este último, la principal contribución al contenido total de HAPs corresponde a los de peso molecular más bajo, particularmente naftaleno y sus alquilderivados. En contraste, los HAPs más pesados, entre los que se encuentra la mayoría de carcinogénicos, son muy escasos.

La baja proporción de HAPs pesados del queso Herreño en comparación con el Palmero puede estar relacionada con el procedimiento de ahumado utilizado en cada caso; mientras que el queso Palmero se ahúma sobre una rejilla colocada directamente sobre un barril en el que se produce el humo, el ahumado del queso Herreño se realiza en un ahumadero separado del lugar donde es producido el humo, lo que hace que la distancia entre la fuente del humo y los quesos sea mayor en este último caso. Esto podría afectar al nivel de HAPs depositados en la superficie del queso, especialmente de los más pesados.

4.2. Grado de contaminación del queso sin ahumar

Como cabría esperar, el contenido total de HAPs del queso Herreño sin ahumar (33,65 µg/kg) fue mucho más bajo que el de los ahumados. Es probable que, en este caso, estos contaminantes tengan su origen en la leche utilizada para producir el queso, concentrándose en la fracción grasa del mismo durante su elaboración. De hecho, la presencia de HAPs en

leche, así como en otros quesos sin ahumar, ha sido puesta de manifiesto en varios estudios (Bosset y col., 1998; Grova y col., 2000, 2002; Kishikawa y col., 2003; Pagliuca y col., 2003; Cirillo y col., 2004).

4.3. Análisis del perfil de HAPs de los quesos estudiados

Tal como se ha comentado anteriormente, tanto en los quesos ahumados como en el sin ahumar, los HAPs más abundantes fueron los de bajo peso molecular, sobre todo naftaleno y sus derivados alquilados. Además, exceptuando uno de los quesos, no se detectaron HAPs con más de 4 anillos aromáticos. Asimismo, las concentraciones de HAPs ligeros fueron mucho más altas que las de pesados, observándose una tendencia a la disminución en las concentraciones de HAPs al aumentar su peso molecular. Todo esto coincide con lo observado en el queso Palmero y en estudios previos sobre la presencia de HAPs en otros tipos de quesos comerciales ahumados españoles (Guillén y Sopelana, 2004).

Cabe destacar la **alta proporción de HAPs alquilados en todos los quesos estudiados**, pero sobre todo en los ahumados, donde la proporción de estos componentes representa, en la mayoría de los casos, más del 60% de la concentración total de HAPs; en cambio, en el queso sin ahumar el porcentaje de este tipo de compuestos es menor (aproximadamente 44% del total). Dentro de éstos, los derivados alquilados más abundantes fueron metil- y dimetil-naftalenos, los cuales representaban casi el 100% de los mismos.

Al igual que en los quesos Palmeros, se calcularon una serie de cocientes entre las concentraciones de ciertos pares de HAPs, algunos de ellos isómeros y otros que diferían, o bien en la presencia de grupos alquilo (cocientes de alquilación), o bien en un anillo aromático (cocientes de aromaticidad). Con ello se pretendía, por un lado, comparar los quesos Herreños con los Palmeros, y por otro, estudiar si había diferencias entre el perfil de HAPs de los quesos ahumados y el sin ahumar.

El análisis de estos cocientes puso de manifiesto que, al igual que se observó en los quesos Palmeros, hay algunas **relaciones entre isómeros** que se mantienen relativamente constantes en los quesos Herreños ahumados; tal es el caso de las existentes entre las concentraciones de

fenantreno y antraceno y, sobre todo, entre fluoranteno y pireno, siendo esta última (1,1-1,3) del mismo orden que en el queso sin ahumar (1,2) y también que en el queso Palmero (1,2-1,5). Sin embargo, la relación entre fenantreno y antraceno en el queso Herreño sin ahumar (34,3) es bastante más alta que en los ahumados (2,8-4,4), lo cual podría estar relacionado con un origen diferente de la contaminación por HAPs en ambos casos.

Los **cocientes de alquilación** ponen de manifiesto que las concentraciones totales de mono- y di-metilnaftalenos en los quesos Herreños ahumados son, en general, algo más altas o del mismo orden que las de naftaleno; esto mismo se observó en los quesos Palmeros y también en otros quesos españoles ahumados estudiados con anterioridad (Guillén y Sopelana, 2004). Sin embargo, en el caso de fenantreno/antraceno, tanto el total de mono- como de di-metilderivados es más bajo que la concentración de sus respectivos HAPs cabezas de serie.

Estos cocientes también revelan algunas diferencias entre el queso Herreño ahumado y sin ahumar. Así, en este último, la proporción de naftaleno respecto a sus derivados alquilados es más alta que en los quesos ahumados; y lo contrario ocurre en el caso de fenantreno, siendo la proporción de sus derivados alquilados mayor en el queso sin ahumar.

En relación con los **cocientes de aromaticidad**, se observa que, como cabría esperar teniendo en cuenta que los quesos Herreños ahumados estudiados fueron sometidos a condiciones de ahumado muy similares, los valores de estos cocientes presentan, en general, pocas variaciones. Aun cuando la relación que se mantuvo más constante fue la existente entre las concentraciones de naftaleno y acenaftileno, es de destacar que los valores del cociente entre fenantreno y pireno (7,4-12,7) fueron de un orden similar a los de los quesos Palmeros (4,4-10), y a los encontrados por Suchanová y colaboradores (2008) en muestras de queso ahumadas empleando diferentes tecnologías (4-14).

Sin embargo, si se comparan los quesos Herreños ahumados con el sin ahumar, se observa que, en este último, la relación naftaleno/acenaftileno (63,9) es mucho más alta que en los ahumados (6,5-8,3), mientras que el valor de la relación fenantreno/pireno es más bajo (4,1 frente a un intervalo entre 7,4 y 12,7 en los ahumados); esto pone de manifiesto proporciones

más bajas de acenaftileno y más altas de pireno respectivamente en el queso sin ahumar. Estas diferencias podrían deberse, como se ha comentado anteriormente, a un origen diferente de la contaminación en el queso sin ahumar.

4.4. HAPs carcinogénicos

En relación con la presencia de HAPs carcinogénicos, naftaleno, benzo(a)antraceno y criseno, considerados como posiblemente carcinogénicos en humanos por la IARC (grupo 2B; IARC, 2002, 2010), están presentes en todos los quesos ahumados estudiados, y naftaleno y criseno también en el queso sin ahumar. Otros HAPs incluidos en el grupo 2B, tales como benzo(b)fluoranteno, benzo(j)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno o indeno(1,2,3-cd)pireno estaban presentes sólo en uno de los quesos ahumados. Cabe mencionar que, mientras que el porcentaje total de HAPs carcinogénicos está dentro del rango de los encontrados en el queso Palmero, los porcentajes de carcinogénicos pesados (sin contar naftaleno) son considerablemente más bajos en los quesos Herreños.

En este punto es necesario incidir en algo que ya se resaltó en los quesos Palmeros, y es que, mientras que la proporción de HAPs carcinogénicos pesados en estos quesos es muy baja (<0,4% en todos los casos), naftaleno es el HAP mayoritario o uno de los mayoritarios junto con 2-metilnaftaleno en todos ellos. Esto es algo que no puede ignorarse, ya que este HAP ha sido equiparado en cuanto a su carcinogenicidad con otros carcinogénicos pesados que sí son objeto de control, aunque limitado.

Por último, cabe destacar que benzo(a)pireno sólo fue detectado en uno de los quesos ahumados, en una concentración (0,21 µg/kg) considerablemente más baja que el límite de 10 µg/kg establecido en España para la corteza de queso ahumado madurado (Real Decreto 1113/2006). También la concentración que correspondería al queso completo, 0,10 µg/kg, es más baja que el máximo de 5 µg/kg establecido para otro tipo de alimentos ahumados (Reglamento de la Comisión N° 208/2005; Comisión Europea, 2005b), aunque más alto que el permitido en los alimentos ahumados con aromas de humo (Directiva del Consejo

88/388/CEE; CEE, 1988). Sin embargo, tal como se ha comentado en el apartado de los quesos Palmeros, en España ninguno de los límites mencionados afecta al queso ahumado.

CONCLUSIONES

A continuación se presentan las principales conclusiones extraídas a partir de los resultados obtenidos.

1. En relación con el estudio del espacio de cabeza.

1.1. En relación con el queso Palmero:

1.1.1. El **espacio de cabeza** del **queso Palmero** es extraordinariamente **rico** en componentes volátiles.

1.1.2. De entre todos los componentes volátiles de este queso, los compuestos que predominan son los **componentes del humo** y los **ácidos**. Mientras que los primeros están presentes fundamentalmente en la **parte exterior** del queso, los segundos aparecen en concentraciones importantes **tanto en el interior como en el exterior**. Entre estos últimos, destacan por su abundancia **los ácidos hexanoico, octanoico y decanoico**.

1.1.3. La **materia vegetal** empleada para ahumar el queso Palmero influye en la composición de su espacio de cabeza. La **ausencia de terpenos y sesquiterpenos** y la **presencia de algunos derivados nitrogenados** permite diferenciar a los quesos ahumados con *penca de tunera* seca de los ahumados con *acículas de pino*.

1.1.4. Dentro de los **quesos ahumados con una misma materia vegetal**, existe una gran **variabilidad** en el perfil aromático de los quesos elaborados por **distintos artesanos**, especialmente en la **concentración de ácidos**.

1.2. En el queso Herreño:

1.2.1. El **queso Herreño sin ahumar** tiene un perfil de componentes volátiles muy complejo siendo los componentes más abundantes **las cetonas y los ácidos**, mientras que los grupos de **hidrocarburos, terpenos y sesquiterpenos** son los más numerosos.

1.2.2. El **ahumado** enriquece el perfil aromático de éste queso en multitud de compuestos, especialmente en **derivados fenólicos** así como en **éteres y derivados de piridina**.

Es de destacar la presencia de distintas **metil indanonas** y de **ciertos terpenos** que pueden considerarse característicos de este queso ahumado, cuyo origen podría estar asociado a la **materia vegetal** empleada para ahumar.

1.2.3. La presencia tanto en el queso **Herreño sin ahumar** como en **el ahumado**, de un importante número de **terpenos y sesquiterpenos distintos de los arriba citados**, que aportan a estos quesos un **perfil aromático singular**, sugiere que estos compuestos deben proceder de la **leche** empleada en su elaboración; ésta a su vez puede estar influida por la **dieta** de los animales productores de la misma, que depende en gran parte de la **vegetación autóctona** de la isla del Hierro.

1.2.4. En relación al queso **Herreño ahumado**, **la posición del queso** en el ahumadero **influye ligeramente** en su grado de ahumado. Los quesos situados en la **parte alta** del ahumadero presentan un **grado de ahumado algo superior a los situados en la parte baja** del mismo. Este hecho ha de tenerse en cuenta si se pretende obtener una **producción totalmente homogénea** en cuanto a su perfil aromático.

2. En relación con el grado de contaminación por HAPs:

2.1. El **ahumado de quesos** siempre conlleva una cierta **contaminación por HAPs** y, de hecho, **tanto en el queso Palmero como en el Herreño se ha detectado** este tipo de compuestos.

2.2. Todos los quesos estudiados contienen **concentraciones más bajas de HAPs** que las encontradas **en otros quesos comerciales españoles ahumados de forma tradicional**, estudiados anteriormente en nuestro laboratorio. **Ninguno** de los quesos Palmeros y Herreños estudiados **superó los 10 µg de benzo(a)pireno/kg de corteza**, que es la concentración máxima permitida para quesos ahumados en España.

2.3. Aunque el ahumado del queso Palmero se realizó mediante un **proceso artesanal**, sin ajustarse a normas reguladas, y el del queso Herreño se llevó a cabo en **una**

- industria**, en condiciones que podrían considerarse, *a priori*, más controladas, **el nivel de contaminación del primero resultó ser más bajo que el del segundo**, especialmente en relación a la concentración de los HAPs de menor tamaño.
- 2.4. La **madera** empleada para generar el humo influye en el **grado de contaminación** que alcanza el queso. El ahumado de queso Palmero con *cáscara de almendra* provoca **mayor contaminación por HAPs** que el ahumado con *penca de tunera*. En ambos tipos de quesos ahumados la **concentración de los HAPs alquilados** supone **más de la mitad** de la concentración total de los HAPs presentes en los mismos.
- 2.5. En los quesos **ahumados Herreños** la **posición** en el ahumadero afecta a su grado de contaminación por HAPs. **La contaminación fue mayor** en los **quesos colocados en la trayectoria directa** del humo desde el orificio de entrada al ahumadero al de la salida del mismo, que en los quesos colocados fuera de esa trayectoria. Esto sugiere que un **diseño apropiado** del ahumadero podría tal vez contribuir a reducir los niveles de HAPs en el queso Herreño ahumado.
- 2.6. Estos resultados confirman que, **si se controla el proceso de ahumado**, es posible reducir los niveles de HAPs del queso ahumado y obtener un producto **seguro desde el punto de vista legal, sin renunciar al carácter artesanal** del queso.
- 2.7. No obstante, **se considera necesario implementar medidas** para reducir las altas concentraciones de **naftaleno en queso ahumado** y establecer límites para este HAP, ya que es el mayoritario prácticamente en todos los quesos estudiados y en muchos alimentos y **su grado de carcinogenicidad** se ha equiparado al de otros HAPs carcinogénicos pesados, los cuales se encuentran en concentraciones mucho más bajas. Además, sería conveniente el desarrollo de estudios encaminados a clarificar y concretar **el efecto de este HAP en la salud humana** así como profundizar en el posible **efecto biológico de los HAPs alquilados**, ya que éstos representan una alta proporción de la concentración total de HAPs en todos los quesos estudiados.

BIBLIOGRAFÍA

- Abilleira, E.**, Hedwig Schlichtherle-Cerny, Virto, M., de Renobales, M. y Barrón, L. J. R. (2010) Volatile composition and aroma-active compounds of farmhouse Idiazabal cheese made in winter and spring. *International Dairy Journal*, 20, 537-544.
- Adamopoulos, K. G.**, Goula, A. M. y Petropakis, H. J. (2001) Quality control during processing of Feta cheese-NIR application. *Journal of Food Compounds Analysis*, 14, 431-440.
- Aguinaga, N.**, Campillo, N., Viñas, P. y Hernández-Córdoba, M. (2008) Evaluation of solid-phase microextraction conditions for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic species using gas chromatography. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 391, 1419-1424.
- Alonso, L.**, Fontecha, J., Lozada, L., Fraga, M. J. y Juárez, M. (1999) Fatty acid composition of caprine milk: Major, branched-chain and trans fatty acids. *Journal of Dairy Science*, 82, 878-884.
- Álvarez, S.**, Fresno M., Méndez, P., Castro, N., Fernández, J. R., y Sanz Sampelayo, M. R., (2007a) Alternatives for Improving Physical, Chemical, and Sensory Characteristics of Goat Cheeses: The Use of Arid-Land Forages in the Diet. *Journal of Dairy Science*, 90, 2181-2188.
- Álvarez, S.**, Fresno, M., Rodríguez, V., Darmanin, N. y Ruiz, M. E. (2007b) Perfil olfativo-gustativo de quesos canarios ahumados con diferentes materiales. *Archivos de Zootecnia*, 56, 673-680.
- Álvarez, S.**, Mastin, T., Darmanin, N., Rodríguez, C., y Fresno, M. (2006) Modernización de los ahumadores tradicionales para quesos artesanos canarios. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 214, 75-77.
- Anastasio, A.**, Mercogliano, R., Vollano, L., Pepe, T. y Cortesi, M. L. (2004) Levels of benzo[a]pyrene (BaP) in "Mozzarella di Bufala Campana" cheese smoked according to different procedures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4452-4455.

- Arora, G., Cormier, F. y Lee, B.** (1995) Analysis of odor-active volatiles in Cheddar cheese headspace by multidimensional GC/MS/sniffing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 748-752.
- Arques, J. L., Garde, S., Fernandez-Garcia, E., Gaya, P. y Nunez, M.** (2007) Volatile compounds, odor and aroma of La Serena cheese high-pressure treated at two different stages of ripening. *Journal of Dairy Science*, 90, 3627-3639.
- Arthur, C. L. y Pawliszyn, J.** (1990) Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, 62, 2145-2148.
- Attaie, R. y Richter, R. L.** (1996) Formation of volatiles free fatty acids during ripening of Cheddar-like hard goat cheese. *Journal of Dairy Science*, 79, 717-724.
- Attaie, R.** (2009) Quantification of volatile compounds in goat milk Jack cheese using static headspace gas chromatography. *Journal of Dairy Science*, 92, 2435-2443.
- Avsar, Y. K., Karagul-Yuceer, Y., Drake, M. A., Singh, T. K., Yoon, Y. y Cadwallader, K. R.** (2004) Characterization of nutty flavor in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 87, 1999-2010.
- Aydinol, P. y Ozcan, T.** (2013) The effect of natural and liquid smokes on the benzoapyrene content and quality parameters of Circassian cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 66, 498-504.
- Badger, G. M.** (1948) The carcinogenic hydrocarbons: chemical constitution and carcinogenic activity. *British Journal of Cancer*, 2, 309-350.
- Badger, G. M., Kimber, R. W. L. y Spotswood, T. M.** (1960) Mode of formation of 3,4-benzopyrene in human environment. *Nature*, 187, 663-665.
- Banks, J. M., Brechany, E. Y., Christie, W. W., Hunter, E. A. y Muir, D. D.** (1992) Volatile components in steam distillates of Cheddar cheese as indicator indexes of cheese maturity, flavor and odor. *Food Research International*, 25, 365-373.
- Barbieri, G., Luciana, B., Careri, M., Mangia, A., Parolari, G., Spagnoli, S. y Virgili, R.** (1994) Study of the volatile fraction of Parmesan Cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1170-1176.

- Barrón, L. J. R., Redondo, Y., Aramburu, M., Gil, P., Pérez-Elortondo, F. J., y Albisu, M.** (2007) Volatile composition and sensory properties of industrially produced Idiazabal cheese. *International Dairy Journal*, 17, 1401-1414.
- Barrón, L. J. R., Redondo, Y., Aramburu, M., Pérez-Elortondo, F. J., Albisu, M., Nájera, A. I., y colaboradores** (2005a) Variation in volatile compounds and flavour in Idiazabal cheese manufactured from ewe's milk in farmhouse and factory. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 1660-1671.
- Barrón, L. J. R., Redondo, Y., Flanagan, C. E., Pérez-Elortondo, F. J., Albisu, M., Nájera, A. I., de Renobales, M. y Fernández-García, E.** (2005b) Comparison of the volatile composition and sensory characteristics of Spanish PDO cheeses manufactured from ewes' raw milk and animal rennet. *International Dairy Journal*, 15(4), 371-382.
- Baumard, P. y Budzinski, H.** (1997) Internal standard quantification method and gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS): a reliable tool for polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) quantification in natural matrices. *Analisis*, 25, 246-252.
- Baumard, P., Budzinski, H. y Garrigues, P.** (1997) Analytical procedure for the analysis of PAHs in biological tissues by gas chromatography coupled to mass spectrometry: application to mussels. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 359, 502-509.
- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Dizer, H. y Hansen, P. D.** (1999) Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments and mussels (*Mytilus edulis*) from the Western Baltic Sea: occurrence, bioavailability and seasonal variations. *Marine Environmental Research*, 47, 17-47.
- Bellesia, F., Pinetti, A., Pagnoni, U.M., Rinaldi, R., Zucchi, C., Caglioti, L. y Palyi, G.** (2003) Volatile components of Grana Parmigiano-Reggiano type hard cheese. *Food Chemistry*, 83, 55-61.
- Blanch, G. P., Herraiz, M., Reglero, G. y Tabera, J.** (1993) Preconcentration of samples by steam distillation-solvent extraction at low temperature. *Journal of Chromatography*, 655, 141-149.

- Bontinis**, Th.G., Mallatou, H., Pappa, E.C., Massouras, Th. y Alichanidis, E. (2012) Study of proteolysis, lipolysis and volatile profile of a traditional Greek goat cheese (Xinotyri) during ripening. *Small Ruminant Research*, 105, 193-201.
- Bosset**, J. O. y **Gauch**, R. (1993) Comparison of the volatile flavour compounds of six European AOC cheeses by using a new dynamic headspace GC-MS method. *International Dairy Journal*, 3, 359-377.
- Bosset**, J. O., Bütikofer, U., Berger, T. y Gauch, R. (1997) Study of the volatile compounds of the Vacherin Fribourgeois and (Swiss) Vacherin Mont d'Or cheese varieties. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 88, 233-258.
- Bosset**, J. O., Bütikofer, U., Dafflon, O., Koch, H., Scheurer-Simonet, L. y Sieber, R. (1998) Teneur en hydrocarbures aromatiques polycycliques de fromages avec et sans flaveur de fumée. *Science des Aliments*, 18, 347-359.
- Bosset**, J. O., Bütikofer, U., Gauch, R. y Sieber, R. (1994) Occurrence of terpenes and aliphatic hydrocarbons in Swiss Gruyere and Etivaz alpine cheese using dynamic headspace GC-MS analysis of their volatile flavour compounds. *Schweizerische-Milchwirtschaftliche-Forschung*, 23, 37-42.
- Bosset**, J.O., Gubler, M., Bütikofer, U. y Gauch, R. (2000) Mono-, di and trimethyl benzene in frozen cheese samples: Natural metabolites or environmental pollutants. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*. 91, 287–299.
- Bottazzi**, V. y **Battistotti**, B. (1974) "Headspace" chromatograms of carbonyl compounds in the volatile components of Parmesan cheese. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 25, 11-19.
- Braga**, R. S., Barone, P. M. V. B. y Galvao, D. S. (1999) Identifying carcinogenic activity of methylated polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Journal of Molecular Structure (Theochem)*, 464, 257-266.
- Brandsaeter**, E. y **Abate**, V. (1959) Flavor compounds in goat milk and goat-whey cheese, *Meldinger Norg. Landbruks*. 38, 11.

- Burbank, H. M. y Qian, M. C.** (2005). Volatile sulphur compounds in Cheddar cheese determined by headspace solid-phase microextraction and gas chromatograph-pulsed flame photometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1066, 149-157.
- Calvo, M. V. y Fontecha, J.** (2004). Purification and characterization of a pregastric esterase from a hygienized kid rennet paste. *Journal of Dairy Science*, 87, 1132-1142.
- Calvo, M. V., Castillo, I., Díaz-Barcos, V., Requena, T., y Fontecha, J.** (2007) Effect of hygienized rennet paste and a defined strain starter on proteolysis, texture and sensory properties of semi-hard goat cheese. *Food Chemistry*, 102, 917-924.
- Carbonell, M., Nuñez, M. y Fernández-García, E.** (2002) Evolution of the volatile components of ewe raw milk La Serena cheese during ripening. Correlation with flavour characteristics. *Lait*, 82, 683-698.
- Cardoso, F., Iñiguez, C., Suárez-Solís, V. y De Hombre, R.** (1995) Estudio de las características fisicoquímicas, sensoriales y reológicas durante la maduración del queso ahumado «Habana». *Alimentaria*, 83-85.
- Careri, M., Manini, P, Spagnoli, S., Barbieri, G. y Bolzoni, L.** (1994) Simultaneous distillation-extraction and dynamic headspace methods in the gas chromatographic analysis of Parmesan cheese volatiles. *Chromatographia*, 38, 386-394.
- Carpino, S., Mallia, S., La Terra, S., Melilli, C., Licitra, G., Acree, T. E., Barbano, D. M. y Van Soest, P. J.** (2004) Composition and Aroma Compounds of Ragusano Cheese: Native Pasture and Total Mixed Rations. *Journal of Dairy Science*, 87, 816-830.
- Carunchia-Whetstine, M.E., Karagul-Yuceer, Y., Avsar, Y. K. y Drake, M.A.** (2003) Identification and quantification of character aroma components in fresh Chevre-style goat cheese. *Journal of Food Science*, 68, 2441–2447.
- Castillo, I., Calvo, M.V., Alonso, L., Juárez, M. y Fontecha, J.** (2007) Changes in lipolysis and volatile fraction of a goat cheese manufactured employing a hygienized rennet paste and a defined strain starter. *Food Chemistry*, 100, 590-598.
- Cavaliere, E. L., Rogan, E.G., Roth, R.W., Saugier, R.K. y Hakam, A.** (1983) The relationship between ionization potential and horseradish peroxidase/hydrogen peroxide-

- catalyzed bindings of aromatic hydrocarbons to DNA. *Chemico-Biological Interactions*, 47, 87-109.
- Cavaliere**, E. y **Rogan**, E. (1985) Role of radical cations in aromatic hydrocarbon carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*, 64, 69-84.
- Centeno**, J. A., Tomillo, F. J., Fernandez-Garcia, E., Gaya, P. y Nuñez., M. (2002) Effect of wild strains of *Lactococcus lactis* on the v volatile profile and the sensory characteristics of ewes' raw milk cheese. *Journal of Dairy Science*, 85, 3164-3172.
- Chen**, B. H. (1997) Analysis, formation and inhibition of polycyclic aromatic hydrocarbons in foods: an overview. *Journal of Food and Drug Analysis*, 5, 25-40.
- Chen**, B. H., Wang, C. Y. y Chiu, C. P. (1996) Evaluation of analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in meat products by liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 2244-2251.
- Chen**, B. H. y **Chen**, Y. C. (2001) Formation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the smoke from heated model lipids and food lipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5238-5243.
- Chin**, H. W., Bernhard, R.A. y Rosenberg, M. (1996) Solid Phase Microextraction for Cheese Volatile Compound Analysis. *Journal of Food Science*, 61, 1118-1123.
- Chiofalo**, B., Zumbo, A., Costa, R., Liotta, L., Mondello, L., Dugo, P. y Chiofalo, V. (2004) Characterization of Maltese goat milk cheese flavour using SPME-GC/MS. *S. African Journal of Animal Sciences*, 34, 176-180.
- Cirillo**, T., Milano, N. y Amodio Cocchieri, R. (2004) Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in traditional smoked dairy products from Campania (Italy). *Italian Journal of Public Health*, 1, 51-53.
- Coda**, R., Brechany, E., De Angelis, M., De Candia, S., Di Cagno, R. y Gobbetti, M. (2006) Comparison of the compositional, microbiological, biochemical and volatile profile characteristics of nine Italian ewe's milk cheeses. *Journal of Dairy Science*, 89, 4126-4143.

- Collins, J. F., Brown, J. P., Dawson, S. V. y Marty, M. A.** (1991) Risk assessment for benzo(a)pyrene. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 13, 170-184.
- Conde, F. J., Ayala, J. H., Alfonso, A. M. y Venerando González, V.** (2005) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Smoke Used to Smoke Cheese Produced by the Combustion of Rock Rose (*Cistus monspeliensis*) and Tree Heather (*Erica arborea*) Wood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 176-182.
- Condurso, C., Verzera, A., Romeo, V., Ziino, M. y Conte, F.** (2008) Solid-phase microextraction and gas-chromatography/mass spectrometry analysis of dairy product volátiles for the determination of shelf-life. *International Dairy Journal*, 18, 819-825.
- Contarini, G. y Leardi, R.** (1994) Use of experimental design to optimize the analysis of volatile compounds by dynamic headspace extraction followed by cold-trapping and capillary GC. *Journal of High Resolution Chromatography*, 17, 91-94.
- Cook, J. W., Hewett, C. L. Y Hieger, I.** (1933) Isolation of a cancer-producing hydrocarbon from coal tar. II. Isolation of 1,2- and 4,5-benzopyrenes, perylene and 1,2-benzanthracene. *Journal of the Chemical Society, Abstracts*, 396-398.
- Cornu, A., Rabiau, N., Kondjoyan, N., Verdier-Metz, I., Pradel, P., Tournayre, P., Berdagué, J. L. y Martin, B.** (2009) Odour-active compound profiles in Cantal-type cheese: Effect of cow diet, milk pasteurization and cheese ripening. *International Dairy Journal*, 19, 588-594.
- Crittenden, B. D. y Long, R.** (1976) The mechanism of formation of polynuclear aromatic compounds in combustion systems. *Carcinogenesis-A Comprehensive Survey* (R. Freudenthal, I. y Jones, P. W. ed. Raven Press, New York, NY), 1, 209-223.
- Crosby, N. T., Hunt, D. C., Philp, L. A. y Patel, I.** (1981) Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in food, water and smoke using high-performance liquid chromatography. *The Analyst*, 106, 135-145.
- Curioni, P. M. G. y Bosset, J. O.** (2002) Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *International Dairy Journal*, 12, 959-984.

- Dafflon, O., Gobet, H., Koch, H. y Bosset, J. O.** (1995) Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish, meat products, and cheese using high performance liquid chromatography. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 86, 534-555.
- Darías J., Díaz, C., Peláez, P. y Fresno, M.** (2003a) Características de las explotaciones que producen quesos artesanales en Tenerife (Islas Canarias). *Actualidad Ganadera*, 297, 71-75.
- Darías, J. y Peláez, C.** (2003b) Estudio de la tecnología quesera en la isla de Tenerife. *Alimentación-equipos y tecnología-Tecnologías alimentarias*, 183, 78-81.
- Day, E. A. y Libbey, L. M.** (1964) Cheddar cheese flavor: Gas chromatographic and mass spectral analyses of the neutral components of the aroma fraction. *Journal of Food Science*, 29, 583-589.
- De Frutos, M., Sanz, J. y Martínez-Castro I.** (1991) Characterization of artisanal cheeses by GC and GC/MS analysis of their medium volatility (SDE) fraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 524-530.
- De Martín, S., Matcovich, P., Nanut, D., Zulian, S. y Siardi, V.** (1998) Determinazione di idrocarburi policiclici aromatici (IPA) in alimenti affumicati. *Bollettino dei Chimici Igienisti, Parte Scientifica*, 49, 177-181.
- Delgado, F. J., González-Crespo, J. Cava, R., García-Parra, J. y Ramírez, R.** (2010) Characterisation by SPME-GC-MS of the volatile profile of a Spanish soft cheese P.D.O. Torta del Casar during ripening. *Food Chemistry*, 118, 182-189.
- Delgado, F. J., González-Crespo, J. Cava, R. y Ramírez, R.** (2011) Formation of the aroma of a raw goat milk cheese during maturation analysed by SPME-GC-MS. *Food Chemistry*, 129, 1156-1163.
- Di Cagno, R., De Pasquale, I., De Angelis, M., Buchin, S., Calasso, M., Fox, P. F. y Gobbetti, M.** (2011) Manufacture of Italian Caciotta-type cheeses with adjuncts and attenuated adjuncts of selected non-starter lactobacilli. *International Dairy Journal*, 21, 254-260.

- Dikun, P. P.** (1966) Detection of the strong carcinogens 1,2:4,5- and 3,4:9,10-dibenzopyrene in the atmosphere. *Voprosy Onkologii*, 12(1), 90-91.
- Dimos, A., Urbach, G. E. y Miller, A. J.** (1996) Changes in flavour and volatiles of full-fat and low-fat cheeses during maturation. *International Dairy Journal*, 6, 981-995.
- Directiva 88/388/CEE del Consejo** de 22 de junio de 1988 relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados Miembros en el ámbito de los aromas que se utilizan en los productos alimenticios y de los materiales de base para su producción. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 184 de 15.07.1988: 61-66.
- Dirinck, P. y De Winne, A.** (1999) Flavor characterisation and classification of cheeses by gas chromatographic-mass spectrometric profiling. *Journal of Chromatography A*, 847(1/2), 203-208.
- Dufosse, L., Latrasse, A. y Spinnler, H. E.** (1994) Importance of lactones in food flavours: structure, distribution, sensory properties and biosynthesis. *Sciences des Aliments*, 14, 17-50.
- Dufour, J. P., Delbecq, P. y Pérez, L.** (2001) Solid-Phase Microextraction combined with Gas Chromatography-Olfactometry for analysis of cheese aroma. *ACS Symposium Series*, 782 (*Gas Chromatography-Olfactometry*), 123-137.
- Dumont, J. P., Adda, J. y Rousseaux, P.** (1981) Example of flavor variation within the same type of cheese: Gruyere de Comte. *Lebensmittel Wissenschaft Technologieund* 14, 198–202.
- Engel, E., Nicklaus S., Garem, A., Septier C., Salles C. y Le Quéré J. L.** (2000) Taste active compounds in a goat cheese water-soluble extract. 1. Development and sensory validation of a model water-soluble extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4252–4259.
- Engel, E., Nicklaus, S., Septier, C., Salles, C. y Le Quéré, J. L.** (1999) Determination of the taste active compounds of a goat cheese water-soluble extract, in: 9th proceedings of the Weurman flavour research symposium, June 22–25, Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Garching, Germany, p. 84–88.

- Engels, W. J. M., Dekker, R., De Jong, C., Neeter R. y Visser, S.,** (1997) A comparative study of volatile compounds in the water-soluble fraction of various types of ripened cheese. *International Dairy Journal*, 2, 255-263.
- Escriche, I., Serra, J. A., Guardiola, V. y Mulet, A.** (1999) Composition of medium volatility (simultaneous distillation extraction-SDE) aromatic fraction of pressed, uncooked paste cheese (Mahon cheese). *Journal of Food Composition and Analysis*, 12, 63-69.
- Fazio, T. y Howard, J. W.** (1983) Polycyclic aromatic hydrocarbons in foods. *Handbook of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, editado por A. Bjorseth. Marcel Dekker, Inc., New York, 461-505.
- Fazio, T., White, R. H. y Howard, J. W.** (1973) Collaborative study of the multicomponent method for polycyclic aromatic hydrocarbons in foods. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 56, 68-70.
- Fernández, M. J., García, C., García-Villanova, R. J. y Gómez, J. A.** (1996) Evaluation of liquid-liquid extraction and liquid-solid extraction with a new sorbent for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in raw and finished drinking waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1785-1789.
- Fernández-García, E** (1996) Use of headspace sampling in the quantitative analysis of artisanal Spanish cheese aroma. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44, 1833-1839.
- Fernández-García, E., Carbonell, M., Gaya, P. y Nuñez, M.** (2004) Evolution of the volatile components of ewes raw milk Zamorano cheese. Seasonal variation. *International Dairy Journal*, 14, 701-711.
- Fernández-García, E., Imhof, M., Schlichtherle-Cerny, H., Bosset, J.O. y Nuñez, M.** (2008) Terpenoids and benzenoids in La Serena cheese made at different seasons of the year with a *Cynara cardunculus* extract as coagulant. *International Dairy Journal*, 18, 147-157.
- Fernández-Salguero, J., Sanjuán, E., Gómez, R. y Alcalá, M.** (1990) Aportación al estudio del queso Herreño. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 9(6), 103-107.

- Fernández-Salguero, J., Sanjuán, E. y Montero, E. (1991)** A preliminary study of the chemical composition of Guía cheese. *Journal of Food Composition and Analysis*, 4, 262–269.
- Ferreira, I. M. P. L. V. O., Pinho, O. y Sampaio, P. (2009)** Volatile fraction of DOP “Castelo Branco” cheese: Influence of breed. *Food Chemistry*, 112, 1053-1059.
- Fontecha, J., Peláez, C., Juárez, M., Requena, T., Gómez, C. y Ramos, M. (1990)** Biochemical and microbiological characteristics of artisanal hard goat’s cheese. *Journal of Dairy Science*, 73, 1150-1157.
- Frank, D. C., Owen, C. M. y Patterson, J. (2004)** Solid phase microextraction (SPME) combined with gas-chromatography and olfactometry-mass spectrometry for characterization of cheese aroma compounds. *Lebensmittel Wissenschaft Und Technologie*, 37, 139-154.
- Freitas, C. y Malcata, F. X. (2000)** Microbiology and biochemistry of cheeses with Appellation d’Origine Protegée and manufactured in the Iberian Peninsula from ovine and caprine milks. *Journal of Dairy Science*, 83, 584-602.
- Frenklach, M. y Warnatz, J. (1987)** Detailed modelling of PAH profiles in a sooting low-pressure acetylene flame. *Combustion Science and Technology*, 51, 265-283.
- Fresno, M. y Álvarez, S. (2004)** Efecto de la alimentación de las cabras majoreras en la tecnología quesera utilizando dos tipos de coagulantes diferentes. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 188, 44-50.
- Fresno, M. y Álvarez, S. (2012)** Chemical, textural and sensorial changes during the ripening of Majorero goat cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 65(3), 393-400.
- Fresno, M., Alvarez, S., Darmanin, N., Batista, P. y Pino, V. (2002)** Caracterización del proceso de ahumado del queso Palmero. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 173, 87-92.
- Fresno, M., Alvarez, S., Darmanin, N., Méndez, P., Fernández, E. y Guillén, M. D. (2004b)** La industria quesera en la isla de El Hierro: pasado, presente y futuro. *Alimentación, equipos y tecnología*, 192, 69-73.

- Fresno, M., Álvarez, S., Rodríguez, E. y Díaz, C. y Darías, J. (2011)** Influence of diet and rennet on the composition of goats milk and cheese. *Journal of Dairy Research*, 78, 250-256.
- Fresno, M., Álvarez, S., Rodríguez, V. y Ruiz, M. E. (2007c)** Evaluación sensorial de la textura de quesos canarios ahumados con diferentes materiales. *Archivos de Zootecnia*, 56, 705-711.
- Fresno, M., Darmanin, N., Briggs, H. R. y Álvarez, S. (2008)** Physicochemical and sensorial properties of hand made cheeses from La Gomera (Canary Islands, Spain). *Special Issue of the International Dairy Federation*, 0801/Part 4: *The Challenge to sheep and goats milk sectors*, 309-310.
- Fresno, M., Rodríguez, A., Álvarez, S., Batista, P., Pino, V., Fernández, M., y Guillén, M. D. (2004a)** Preferencia de los consumidores en relación al color de los quesos Palmeros debido al efecto del ahumado. *I+D Tecnología de los alimentos*, Junio 2004.
- Fresno, M., Rodríguez, V., Ruiz, M. E. y Álvarez, S. (2007a)** Comparación de pruebas instrumentales y visuales en la percepción del color de quesos ahumados. *Archivos de Zootecnia*, 56, 699-704.
- Fresno, M., Rodríguez, V., Ruiz, M. E., Darmanin, N. y Álvarez, S. (2007b)** Preferencia y diferenciación de quesos de cabra ahumados con diferentes productos. *Archivos de Zootecnia*, 56, 713-717.
- Fritz, W. y Soós, K. (1977)** Studies on the content of cancerogenic hydrocarbons in smoked foods in the GDR and the Hungarian People's Republic. *Nahrung*, 21, 951-959.
- Gaborit, P., Menard, A. y Morgan, F. (2001)** Impact of ripening strains on the typical flavour of goat cheeses. *International Dairy Journal*, 11, 315-325.
- Gao, S., Oh, D. H., Broadbent, J. R., Johnson, M. E., Weimer, B. C., y Steele, J. L. (1997)** Aromatic aminoacid catabolism by lactococci. *Lait*, 77, 371-381.
- Garabal, J. I., Rodríguez-Alonso, P., Franco, D. y Centeno, J. A. (2010)** Chemical and biochemical study of industrially produced San Simón da Costa smoked semi-hard cow's

- milk cheeses: effects of storage under vacuum and different modified atmospheres. *Journal of Dairy Science*, 93, 1868-1881.
- García Falcón**, M. S., González Amigo, S., Lage Yuste, M. A. y Simal Lozano, J. (1999) Determination of benzo[a]pyrene in some Spanish comercial smoked products by HPLC-FL. *Food Additives and Contaminants*, 16, 9-14.
- Gmüer**, W., Bosset, J. O. y Plattner, E. (1987a) Direct coupling of supercritical fluid extraction to capillary supercritical fluid chromatography. III. Experimental optimization of the pressure and temperature programming rates in supercritical fluid chromatography applied to the analysis of dairy products. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 78, 21-35.
- Gmüer**, W., Bosset, J. O. y Plattner, E. (1987b) Contribution to direct coupling of supercritical fluid extraction to capillary supercritical fluid chromatography. I. Theoretical optimization of some important instrumental parameters. *Journal of Chromatography*, 388, 143-150.
- Gmüer**, W., Bosset, J. O. y Plattner, E. (1987c) Direct coupling of supercritical fluid extraction to capillary supercritical fluid chromatography. II. Construction of a prototype and application examples. *Journal of Chromatography*, 388, 335-349.
- Godefroot**, M., Sandra, P. y Verzele, M. (1981) New method for quantitative essential oil analysis. *Journal of Chromatography*, 203, 325-335.
- Gómez**, R., Peláez, C. y De la Torre, E. (1989) Microbiological study of semi-hard goat's milk cheese (Majorero). *International Journal of Food Science & Technology*, 24, 147-151.
- Gómez**, R., Peláez, C. y Martín-Hernández, C. (1988) Enzyme activity in Spanish goat's cheeses. *Food Chemistry*, 28, 159-164.
- González González**, A. y Díaz Rodríguez, F. (1962) Alkaloids in plants of the Canary Island. VII. *Nicotiana glauca* and *Nicotiana paniculata*. *Anales de la Real Sociedad Española de Física y Química (Madrid)*, 58, 431-436.

- González, L. y Zárata, V.** (2012) Influence of an autochthonous starter culture and a commercial starter on the characteristics of Tenerife pasteurised goats' milk cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 65, 542-547.
- Greenberg, A., Hsu, C. H., Rothman, N. y Strickland, P. T.** (1993) PAH profiles of charbroiled hamburgers: pyrene/b[a]p ratios and presence of reactive PAH. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 3, 101-110.
- Grimmer, B. y Böhnke, H.** (1975) Polycyclic aromatic hydrocarbon profile analysis of high-protein foods, oils, and fats by gas chromatography. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 58, 725-733.
- Grova, N., Feidt, C., Crepineau, C., Laurent, C., Lafargue, P. E., Hachimi, A. y Rychen, G.** (2002) Detection of polycyclic aromatic hydrocarbon levels in milk collected near potential contamination sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4640-4642.
- Grova, N., Laurent, C., Feidt, C., Rychen, G., Laurent, F. y Lichtfouse, E.** (2000) Gas chromatography-mass spectrometry study of polycyclic aromatic hydrocarbons in grass and milk from urban and rural farms. *European Journal of Mass Spectrometry*, 6, 457-460.
- Guichard, E., Berdagué, J. L. y Grappin, R.** (1987) Ripening and quality of Gruyere of Comte cheese. Change in the amounts of volatile compounds in relation to season of manufacture and ripening conditions. *Lait*, 67, 319-337.
- Guichard, H.** (1995) Contribution au développement de méthodes instrumentales pour l'étude des fractions volatile et azotée soluble dans l'eau de fromages à pate pressée cuite. Relation avec l'analyse sensorielle. Thèse de doctorat, Univ. Bourgogne, France.
- Guillén, M. D. y Abascal, B.** (2002) Study of the volatile fraction of cheese smoked by means of smoke flavourings, using solid phase microextraction followed by GC/MS. Page 78 in *10^{as} Jornadas de Análisis Instrumental*, Barcelona, Spain.
- Guillén, M. D. y Abascal, B.** (2005) Variation in the headspace composition from the rind to the interior of artisanal unsmoked and smoked Idiazabal cheese. Influence of the smoking

- process on the headspace of this cheese. *Innovations in Traditional Foods. Proceedings, I*, 109-112. Valencia, Spain.
- Guillén, M. D. y Abascal, B.** (2009) Study of the evolution of artisan Idiazabal cheese aromatic profile during ripening. Page 71 in *IX Reunión Científica de la Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines*. San Sebastian, Spain.
- Guillén, M. D. y Abascal, B.** (2012) Nature and distribution of the volatile components in the different regions of an artisanal ripened sheep cheese. *Journal of Dairy Research*, 79, 102-109.
- Guillén, M. D., Abascal, B., Sopelana, P. y Palencia, G.** (2005) Eficacia de distintas fibras en el estudio, mediante SPME-CG/MS, del espacio de cabeza de queso ahumado. Page 29 in *III Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*. Burgos, Spain.
- Guillén, M. D. y Errecalde, M. C.** (2002) Volatile components of raw and smoked black bream (*Brama raii*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) studied by means of solid phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Science and Food Agricultural*, 82, 945–952.
- Guillén, M. D. e Ibargoitia, M. L.** (1996) Aqueous liquid smoke flavoring preparations from vine shoots and beech wood. *Journal of Dairy Science*, 72, 104-110.
- Guillén, M. D. e Ibargoitia, M. L.** (1998) New components with potential antioxidant and organoleptic properties, detected for the first time in liquid smoke flavoring preparations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1276-1285.
- Guillén, M. D., Ibargoitia, M. L., Sopelana, P., Palencia, P. y Fresno, M.** (2004a) Components detected by means of solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry in the headspace of artisan fresh goat cheese smoked by traditional methods. *Journal of Dairy Science*, 87, 284-299.
- Guillén, M. D., Ibargoitia, M. L., Sopelana, P., Palencia, G.** (2004b) Components detected by headspace-solid-phase microextraction in the artisanal fresh goat's cheese smoked using dry prickly pear (*Opuntia ficus indica*). *Lait*, 84, 385-397.

- Guillén, M. D. y Manzanos, M. J.** (1999) Extractable components of the aerial parts of *Salvia lavandulifolia* and the composition of the liquid smoke flavoring obtained from them. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3016-3027.
- Guillén, M. D. y Manzanos, M. J.** (2002) Study of the volatile composition of an aqueous oak smoke preparation. *Food Chemistry*, 79, 283-292.
- Guillén, M. D., Manzanos, M. J., e Ibargoitia, M. L.** (2001) Carbohydrate and nitrogenated compounds in liquid smoke flavorings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 463-468.
- Guillén, M. D., Manzanos, M. J. y Zabala, L.** (1995) Study of a commercial liquid smoke flavouring by means of GC/MS and FTIR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 463-468.
- Guillén, M. D., Lastra, J. y Cabo, N.** (2000a) Espacio de cabeza estático de quesos ahumados con aromas de humo: Variación de la composición desde el interior al exterior. *Simposio de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, Vitoria.
- Guillén, M. D., Palencia, G., Ibargoitia, M. L., Fresno, M. y Sopelana, P.** (2011) Contamination of cheese by PAHs in traditional smoking. Influence of the position in the smokehouse on the contamination level of smoked cheese. *Journal of Dairy Science*, 94, 1679-1690.
- Guillén, M. D. y Sopelana, P.** (2003) Polycyclic aromatic hydrocarbons in diverse foods. *Food Safety: contaminants and toxins*. J. P. F. D'Mello, ed. CABI Publishing, Oxon, United Kingdom, 175-198.
- Guillén, M. D. y Sopelana, P.** (2004a) Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked cheese. *Journal of Dairy Science*, 87, 556-567.
- Guillén, M. D. y Sopelana, P.** (2004b) Load of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Edible Vegetable Oils: Importance of Alkylated Derivatives. *Journal of Food Protection*, 67, 1904-1913.
- Guillén, M. D., Sopelana, P. y Palencia, G.** (2004) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Olive Pomace Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 2123-2132.

- Guillén, M. D., Sopelana, P. y Partearroyo, M. A. (2000c)** Polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid smoke flavorings obtained from different types of wood. Effect of storage in polyethylene flasks on their concentrations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5083-5087.
- Guillén, M. D., Sopelana, P., y Partearroyo, M. A. (2000b)** Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in commercial liquid smoke flavorings of different composition by gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 126-131.
- Gummalla, S. y Broadbent, J. R. (2001)** Tyrosine and phenylalanine catabolism by *Lactobacillus* cheese flavor adjuncts. *Journal of Dairy Science*, 84, 1011-1019.
- Ha, J. K. y Lindsay, R. C. (1991)** Volatile branched-chain fatty acids and phenolic compounds in aged Italian cheese flavours. *Journal of Food Science*, 56, 1241-1247, 1250.
- Hayaloglu, A. A., Brechany, E. Y., Deegan, K. C. y McSweeney, P. L. H. (2008)** Characterization of the chemistry, biochemistry and volatile profile of Kuflu cheese, a mould-ripened variety. *Food Science and Technology*, 41, 1323-1334.
- Hayaloglu, A.A., Tolu, C., Yasar, K. y Sahingil, D. (2013)** Volatiles and sensory evaluation of goat milk cheese Gokceada as affected by goat breeds (Gokceada and Turkish Saanen) and starter culture systems during ripening. *Journal of Dairy Science*, 96, 2765-2780.
- Herrera, M. I., Puerto, P. P., Baquero, M. F., Rodríguez, E. R., Martín, J. D. y Romero, C. D. (2006)** Mineral and trace element concentrations of dairy products from goats' milk produced in Tenerife (Canary Islands). *International Dairy Journal*, 16, 182-185.
- Howard, J. W. y Fazio, T. (1969)** A review of polycyclic aromatic hydrocarbons in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 17, 527-531.
- Howard, J. W. y Fazio, T. (1980)** Review of polycyclic aromatic hydrocarbons in foods. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 63, 1077-1104.

- Howard**, J. W., Fazio, T. y White, R. H. (1968) Collaborative study of a method for benzo(a)pyrene in smoked foods. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 51, 544-548.
- Howard**, J. W., Teague, R. T. Jr. y White, R. H. (1966a) Extraction and estimation of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked foods. I. General method. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 49, 595-611.
- Howard**, J. W., White, R. H., Fry, B. E., Jr., y Turicchi, E. W. (1966b) Extraction and estimation of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked foods. II. Benzo(a)pyrene. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 49, 611-617.
- Husain**, A., Naeemi, E., Dashti, B., Al-Omirah, H. y Al-Zenki, S. (1997) Polycyclic aromatic hydrocarbons in food products originating from locally reared animals in Kuwait. *Food Additives and Contaminants*, 14, 295-299.
- Imhof**, R. y **Bosset**, J. O. (1989) A simple quantitative photometric method for the determination of total carbonyl components in biological media. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 80, 409-419.
- Innocente**, N., Moret, S., Corradini, C. y Conte, L. S. (2000) A rapid method for the quantitative determination of short-chain free volatile fatty acids from cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3321-3323.
- Innocente**, N., Munari, M. y Biasutti, M. (2013) Characterization by solid-phase microextraction-gas chromatography of the volatile profile of protected designation of origin Montasio cheese during ripening. *Journal of Dairy Science*, 96, 26-32.
- IARC** (1973) Certain polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic compounds. *En IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans*, vol. 3. International Agency for research on Cancer, Lyon, France.
- IARC** (1983) Polynuclear aromatic compounds, part 1: chemical, environmental and experimental data. *En IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans*, vol. 32. International Agency for research on Cancer, Lyon, France.

- IARC** (2002) Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. *En IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans*, vol. 82. International Agency for research on Cancer, Lyon, France.
- IARC** (2005) Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. *In IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk to Humans*; vol 92. International Agency for research on Cancer, Lyon, France.
- IARC** (2010) Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. *In IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans*; Vol. 92. International Agency for research on Cancer, Lyon, France.
- International Standardization (ISO): ISO 15302: 2007**. Determination of benzo[a]pyrene - Reverse-phase high performance liquid chromatography method.
- Irwin, R. J., VanMouwerik, M., Stevens, L., Seese, M. D. y Basham, W.** (1998) Environmental Contaminants Encyclopedia. National Park Service, Water Resources Division, Fort Collins, Colorado. www.nature.nps.gov/hazardssafety/toxic/
- Izco, J. M. y Torre, P.** (2000) Characterisation of volatile flavour compounds in Roncal cheese extracted by the “purge and trap” method and analyzed by GC-MS. *Food Chemistry*, 70, 409-417.
- Jaillais, B., Bertrand, V. y Auger, J.** (1999) Cryo-trapping/ SPME/ GC analysis of cheese aroma. *Talanta*, 48, 747-753.
- Joe, F. L., Jr., Salemne, J. y Fazio, T.** (1982) High performance liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet detection of polynuclear aromatic hydrocarbons in barley malt. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 65, 1395-1402.
- Joe, F. L., Jr., Salemne, J. y Fazio, T.** (1984) Liquid chromatographic determination of trace residues of polynuclear aromatic hydrocarbons in smoked foods. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 67, 1076-1082.
- Johnson, Y. S.** (2012) Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by QhEChERS-based extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Food Science*, 77, T131-T137.

- Johnson**, A. E., Nursten, H. E. y Self, R. (1996) Aromatic hydrocarbons in foodstuffs and related materials. *Chemical Industry*, 1, 10–12.
- Kakareka**, S. V., Kukharchyk, T. I. y Khomich, V. S. (2005) Study of PAH emission from the solid fuels combustion in residential furnaces. *Environmental Pollution*, 133, 383-387.
- Kaminarides**, S., Stamou, P., Massouras, T. (2007) Changes of organic acids, volatile aroma compounds and sensory characteristics of Halloumi cheese kept in brine. *Food Chemistry*, 100, 229-225.
- Ke**, L., Wong, T. W. Y, Wong, Y. S. y Tam, N. F. Y. (2002) Fate of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contamination in a mangrove swamp in Hong Kong following an oil spill. *Marine Pollution Bulletin*, 45, 339-347.
- Kemmer**, H., Dehnhard, M. and Claus, R. (1997) Screening of indoles in cheese. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A*, 205, 433-436.
- Kersken**, H. (1974) Modern smoking. *Fleischwirtschaft*, 54, 1721-2, 1724, 1726.
- Kim**, K., Kurata, T. y Fujimaki, M. (1974) Smoke flavor. II. Identification of flavor constituents in carbonyl, noncarbonyl neutral and basic fractions of aqueous smoke condensates. *Agricultural and Biological Chemistry*, 38, 53-63.
- Kishikawa**, N., Wada, M., Kuroda, N., Akiyama, S. y Nakashima, K. (2003) Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in milk samples by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 789, 257-264.
- Klein**, D. J. (1990) Semiempirical valence bond views for benzenoid hydrocarbons. *Topics in current chemistry*, 153, 57-83.
- Krewski**, D., Thorslund, T. y Withey, J. (1989) Carcinogenic risk assessment of complex mixtures. *Toxicology and Industrial Health*, 5, 851-867.
- Kubícková**, J. y **Grosch**, W. (1997) Evaluation of potent odorants of Camembert cheese by dilution and concentration techniques. *International Dairy Journal*, 7, 65-70.

- Langford**, V. S., Reed, C. J., Milligan, D. B., McEwan, M. J., Barringer, S. A. y Harper, W. J. (2012) Headspace analysis of Italian and New Zealand Parmesan cheeses. *Journal of Food Science*, 77, 719-726.
- Lapp**, M. S. y **Von**, R. E. (1982) Chemosystematic studies in the genus *Pinus*. IV. Leaf oil composition and geographic variation in jack pine of eastern North America. *Canadian Journal of Botany*, 60, 2762–2769.
- Larráyo**, P., Addis, M., Gauch, R. y Bosset, J. O. (2001a) Comparison of dynamic headspace and simultaneous distillation extraction techniques used for the analysis of the volatile components in three European PDO ewes' milk cheeses. *International Dairy Journal*, 11, 911-926.
- Larráyo**, P., Ibáñez, F. C., Ordoñez, A. I., Torre P. y Barcina Y. (2001b) Evaluation of supercritical fluid extraction as sample preparation method for the study of Roncal cheese aroma. *International Dairy Journal*, 10, 755-759.
- Larsen**, T. O. (1999) Volatile flavor production by *Penicillium caseifulvum*. *International Dairy Journal*, 8, 883-887.
- Law**, B. A. y **Sharpe**, M. E. (1973) Lactic acid bacteria and flavour in cheese. Proceedings of a Symposium: Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food, Long Ashton Research Station. University of Bristol, 233-243.
- Lawrence**, J. F. y **Weber**, D. F. (1984) Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in some Canadian commercial fish, shellfish, and meat product by liquid chromatography with confirmation by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32, 789-794.
- Lecanu**, L., Ducruet, V., Jouquand, C., Gratadoux, J. J. y Feigenbaum, A. (2002) Optimization of headspace solid-phase microextraction (SPME) for the odor analysis of surface-ripened cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3810-3817.
- Ledesma**, L., Fresno, M., Álvarez, S., Darías, J., Rodríguez, E. y Díaz, C. (2007) Cambios de la composición mineral de quesos de cabra en función de la dieta y el cuajo usado. *Archivos de Zootecnia*, 56, 719-723.

- Lee, J. H.,** Diono, R., Kim, G. Y. y Min, D. B. (2003) Optimization of solid phase microextraction analysis for the headspace volatile compounds of Parmesan cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1136-1140.
- Liardon, R.,** Bosset, J. O. y Blanc, B. (1982) The aroma composition of Swiss Gruyère cheese. I. The alkaline volatile components. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 15, 143-147.
- Liebich, H. M.,** Douglas, D. R., Bayer, E. y Zlatkis, A. (1970a) The volatile flavor components of Cheddar cheese. *Journal of Chromatographic-Science*, 8, 355-359.
- Liebich, H. M.,** Douglas, D. R., Bayer, E. y Zlatkis, A. (1970b) Volatile flavour components of Cheddar cheese. *Proceeding of Sixth International Symposium of Advances in Chromatography*, University of Houston, Houston, TX, 219-225.
- Lintas, C.,** De Matthaeis, M. C. y Merli, F. (1979) Determination of benzo[a]pyrene in smoked, cooked and toasted food products. *Food Cosmetic Toxicology*, 17, 325-328.
- Lodovici, M.,** Dolara, P., Casalini, C., Ciappellano, S. y Testolin. G. (1995) Polycyclic aromatic hydrocarbon contamination in the Italian diet. *Food Additives and Contaminants*. 12, 703-713.
- Loew, G. H.,** Poulsen, M., Ferrell, J. y Chaet, D. (1980) Quantum chemical studies of methylbenz(a)anthracenes: Metabolism and correlations with carcinogenicity. *Chemico-Biological Interactions*, 31, 319-340.
- Loew, G.H.,** Poulsen, M., Kirkjian E., Ferrell, J., Sudhindra, B.S., Rebagliati, M. (1985) Computer-assisted mechanistic structure-activity studies: applications to diverse classes of chemical carcinogens. *Environmental Health Perspectives*, 61, 69-96.
- Lucisano, A.,** De Battistis, P. y Marzadori, F. (1973) Determination of 3,4-benzopyrene in smoked foods. *Veterinaria Italiana*, 24, 232-240.
- Madureira, T.V.,** Velhote, S., Santos, C., Cruzeiro, C., Rocha, E. y Rocha, M.J. (2014) A step forward using QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) based extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry-levels of priority

- polycyclic aromatic hydrocarbons in wild and commercial mussels. *Environmental Science and Pollution Research*, 21, 6089-6098.
- Maga**, J.A. (1988) Smoke in Food Processing, CRC Press, Boca Ratón. Florida. USA.
- Maignial**, L., Pibarot, P., Bonetti, G., Chaintreau, A. y Marion, J. P. (1992) Simultaneous distillation-extraction under static vacuum: isolation of volatile compounds at room temperature. *Journal of Chromatography*, 606, 87-94.
- Majcher**, M. A., Goderska, K., Pikul, J. Y Jelen, H. H. (2011) Changes in volatile, sensory and microbial profiles during preparation of smoked ewe cheese. *Journal of Science and Food Agriculture*, 91, 1416-1423.
- Majcher**, M. A. y **Jelen**, H. H. (2011) Key odorants of Oscypek, a traditional Polish ewe's milk cheese. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 59, 4932-4937.
- Mallia**, S., Fernández-García, E. y Bosset, J. O. (2005) Comparison of purge and trap and solid phase microextraction techniques for studying the volatile aroma compounds of three European PDO hard cheeses. *International Dairy Journal*, 15, 741-758.
- Marculescu**, A. y **Gleizes**, M. (2002) Composition of volatile substances in conifer species from the montane zone. 3. Pine (*Pinus silvestris* L.) leaves. *Revista de Chimie*, 53, 185-189.
- Mariaca**, R. G., Berger, T. F. H., Gauch, R., Imhof, M. I., Jeangros, B. y Bosset, J.O. (1997) Occurrence of volatile mono- and sesquiterpenoids in highland and lowland plant species as possible precursors for flavor compounds in milk and dairy products, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 4423-4434.
- Marilley**, L. Y y **Casey**, M. G. (2004) Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International Journal of Food Microbiology*, 90, 139-159.
- Martelli**, A. (1989) Volatile components of Gorgonzola cheese flavour. *La Rivista della Societa Italiana di Scienza dell'Alimentazione*, 18, 251-262.
- Martinez-Castro**, I., Sanz, J., Amigo, L., Ramos, M. y Martin-Alvarez, P. (1991) Volatile components of Manchego cheese. *Journal of Dairy Research*, 58, 239-246.

- Martín-Hernández**, M. C. (1987) Estudio de las características físico-químicas de quesos de cabra fresco y semicurado. Influencia de la congelación. Tesis Doctoral. Ed. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Martín-Hernández**, M. C. y **Juárez**, M. (1989) Retention of main and trace elements in four types of goat cheese. *Journal of Dairy Science*, 72, 1092-1097.
- Martín-Hernández**, M. C., **Juarez**, M y **Ramos**, M. (1992) Biochemical Characteristics of Three Types of Goat Cheese. *Journal of Dairy Science*, 75(7), 1747-1752.
- Massouras**, T., **Pappa**, E. C. y **Mallatou**, H. (2006) Headspace analysis of volatile flavour compounds of Teleme cheese made from sheep and goat milk. *International Journal of Dairy Technology*, 59, 250-256.
- McGill**, A. S., **Mackie**, P. R., **Parsons**, E., **Bruce**, C. y **Hardy**, R. (1982) The polynuclear aromatic hydrocarbon content of smoked foods in the United Kingdom. *Polynuclear Aromatic Hydrocarbons: Physical and Biological Chemistry. Sixth International Symposium*, 491-499.
- McIlveen**, H. y **Vallely**, C. (1996) The development and acceptability of a smoked processed cheese. *British Food Journal*, 98, 17-23.
- McSweeny**, P. L. H. y **Sousa**, M. J. (2000) Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Le Lait*, 80, 293-324.
- Mehaia**, M. A. (2002) Manufacture of fresh soft white cheese (Domiaty-type) from ultrafiltered goats' milk, *Food Chemistry*, 79, 445-452.
- Michalski**, R. y **Germuska**, R. (2003) The content of benzo(a)pyrene in Slovakian smoked cheese. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 12, 33-37.
- Milo**, C. y **Reineccius**, G. A. (1997) Identification and quantification of potent odorants in regular-fat and low-fat mild Cheddar cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3590-3594.
- Möhler**, K. (1980) El ahumado. Acribia, Zaragoza, Spain.

- Mohyuddin, G.** (1993) *Tesis doctoral: "The supercritical fluid extraction and chromatographic analysis of fatty acids in blue cheese"*. Departamento de Ciencias de los Alimentos y Nutrición Humana. Universidad de Illinois en Urbana-Champaign.
- Moinas, M., Groux, M. J. A. y Hormann, I.** (1974) Aroma compositions for imparting a camembert or blue cheese flavor to foods. *Patentschrift* (Switz.), CH552949.
- Moio, L. y Addeo, F.** (1998) Grana Padano cheese aroma. *Journal of Dairy Research*, 65, 317-333.
- Moio, L., Dekimpe, J., Etievant, P. y Addeo, F.** (1993) Volatile flavour compounds of water buffalo Mozzarella cheese. *Italian Journal of Food Science*, 5, 57-68.
- Moio, L., Piombino P. y Addeo F.** (2000) Odour-impact compounds of Gorgonzola cheese. *Journal of Dairy Research*, 67, 273-285.
- Molimard, P. y Spinnler, H. E.** (1996) Review: Compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheeses: origins and properties. *Journal of Dairy Science*, 79, 169-184.
- Molina, E., Ramos M., Alonso, L. y Lopez-Fandino, R.** (1999) Contribution of low molecular weight water soluble compounds to the taste of cheeses made of cows', ewes' and goats'milk. *International Dairy Journal*, 9, 613-621.
- Mondello, L., Costa, R., Tranchida, P. Q., Chiofalo, B., Zumbo, A., Dugo, P. y Dugo, G.** (2005) Determination of flavor components in Sicilian goat cheese by automated HS-SPME-GC. *Flavour and Fragrance Journal*, 20, 659-665.
- Montoya, D., Boylston, T. D. y Mendonca, A.** (2009) Preliminary screening of *Bifidobacteria* spp. and *Pediococcus acidilactici* in a swiss cheese curd slurry model system: Impact on microbial viability and flavour characteristics. *International Dairy Journal*, 19, 605-611.
- Morales, P., Fernández-García, P., Gaya, P. y Núñez, M.** (2003) Formation of volatile compounds by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from raw ewes'milk cheese. *International Dairy Journal*, 13, 201-209.

- Moreno-Indias**, I., Castro, N., Morales-de la Nuez, A., Sánchez-Macías, D., Assunção, P., Capote, J., y Argüello, A. (2009) Farm and factory production of goat cheese whey results in distinct chemical composition. *Journal of Dairy Science*, 92, 4792-4796.
- Moreno-Rojas**, R., Sánchez-Segarra, P. J., Cámara-Martos, F. y Amaro-López, M. A. (2010) Multivariate analysis techniques as tools for categorization of Southern Spanish cheeses: nutritional composition and mineral content. *European Food and Research Technology*, 231, 841-851.
- Mottier**, P., Parisòd, V. y Turesky, R. J. (2000) Quantitative determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in barbecued meat sausages by gas chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1160-1166.
- Muir**, D. D., Hunter, E. A. y Banks, J. M. (1997) Aroma of cheese. Part 2. Contribution of aroma to the flavour of Cheddar cheese. *Milchwissenschaft*, 52, 85-88.
- Mulet**, A., Escriche, I., Rossello, C. y Tarrazó, J. (1999) Changes in the volatile fraction during ripening of Mahón cheese. *Food Chemistry*, 65, 219-225.
- Naccari**, C., Cristani, M., Licata, P., Giofrè, F. y Trombetta, D. (2008) Levels of benzo[a]pyrene and benzo[a]anthracene in smoked "Provola" cheese from Calabria (Italy). *Food Additives and Contaminants: Part B*, 1, 78-84.
- National Toxicology Programme (NTP)** (2004) Eleventh Report on Carcinogens; U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
- National Toxicology Programme (NTP)** (2000) Toxicology and carcinogenesis studies of naphthalene (CAS N°91-20-3) in F344/N rats (inhalation studies). NTP Technical Report Series N° 500. *NIH publication* N° 01-4434. US Department of Health and Human Services, NTP, Research Triangle park, NC.
- Ney**, K. H. y **Wirotona**, I.P. G. (1978) Study of the aroma constituents of Fontina, an Italian cheese. *Fette, Steifen, Anstrichmittel*, 80, 249-251.
- Nickerson**, G. B. y **Likens**, S. T. (1966) Gas chromatographic evidence for the occurrence of hop oil components in beer. *Journal of Chromatography*, 21, 1-3.

- Nyman, P. J., Perfetti, G. A. Joe, F. L., Jr., Diachenko, G. W. (1993)** Comparison of two clean-up methodologies for the gas chromatographic/mass spectrometric determination of low nanogram/gram levels of polynuclear aromatic hydrocarbons on seafood. *Food Additives and Contaminants*, 10, 489-501.
- O’Riordan, P. J. y Delahunty, C. M. (2001)** Comparison of volatile compounds released during the consumption of Cheddar cheese with compounds extracted by vacuum distillation using gas chromatography-olfactometry. *Journal of Flavour Fragrance*, 16, 425-434.
- Orden de 16 de febrero de 1996**, por la que se reconoce la Denominación de Origen “**Queso Majorero**” y se aprueba su Reglamento y el de su Consejo Regulador (B.O.E. nº 24, de 23.02.96).
- Orden de 31 de agosto de 2001**, por la que se ratifica el Reglamento de la Denominación de Origen “**Queso Palmero**” y de su Consejo Regulador. (B.O.E. nº 218, de 11.9.01).
- Overstrom, H., J. Reigo, y S. Borgstrom. (1972)** Preliminary study concerning formation of benzoic acid in cheese. *Milchwissenschaft*, 27, 705-708.
- Pagliuca, G., Gazzotti, T., Zironi, E., Serrazanetti, G. P., Mollica, D., Rosmini, R. (2003)** Determination of high molecular mass polycyclic aromatic hydrocarbons in a typical Italian smoked cheese by HPLC-FL. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5111-5115.
- Panalaks, T. (1976)** Determination and identification of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked and charcoal-broiled food products by high pressure liquid chromatography and gas chromatography. *Journal of Environmental Science Health*, B11, 299-315.
- Panseri, S., Giani, I., Mentasti, T., Bellagamba, F., Caprino, F. y Moretti, V. M., (2008)** Determination of flavour compounds in a mountain cheese by headspace sorptive extraction-thermal desorption-capillary gas chromatography–mass spectrometry. *Food Science and Technology*, 41, 185-192.

- Papadopoulou, K. y Koukos, P.** (1996) Variation of the essential oils of the leaves, twigs and cones of Balkan pine (*Pinus peuce* Grisebach) grown in Greece. *Journal of Essential Oil Research*, 8, 499–502.
- Parliment, T. H., Kolor, M. G., Rizzo, D. J.** (1982) Volatile components of Limburger cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30, 1006-1008.
- Pearl, I. A. y McCoy, J. F.** (1945) Vanillic acid esters as food preservatives. *Food Industry*, 17, 1458–1461, 1600, 1602, 1604.
- Peláez, C. y Gómez, R.** (1987) Proteolytic activity of streptococci and lactobacilli isolated from Spanish goat's cheese. Second symposium on lactic acid bacteria-genetics, metabolism and applications. Wageningen (The Netherlands). Federation of European Microbiological Societies, 46, p 31.
- Peláez, C., Fresno, M., Díaz, C. y Darías, J.** (2003) Physicochemical characterization of fresh cheeses made with goat milk in the Tenerife Island. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 4, 103-108.
- Peláez, C., Fresno, M., Rodríguez, E. M., Darías, J. y Díaz, C.** (2004) Chemometric studies of fresh and semi-hard goats' cheeses produced in Tenerife (Canary Islands). *Food Chemistry*, 88, 361-366.
- Péres, C., Denoyer, C., Tournayre, P. y Berdagué, J. L.** (2002) Fast characterization of cheeses by Dynamic Headspace-Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 74, 1386-1392.
- Péres, C., Viallon, C. y Berdagué, J. L.** (2001) Solid-phase microextraction-mass spectrometry: A new approach to the rapid characterization of cheeses. *Analytical Chemistry*, 73, 1030-1036.
- Pinho, O., Ferreira, I. M. P. L. V. O. y Ferreira, M. A.** (2002) Solid-phase microextraction in combination with GC/MS for quantification of the major volatile free fatty acids in ewe cheese. *Analytical Chemistry*, 74, 5199-5204.

- Pinho, O.,** Ferreira, I.M.P.L.V.O., Casal, S., Fernandes, J.O., Oliveira, M.B.P.P. y Ferreira, M.A. (2001) Method optimization for analysis of the volatile fraction of ewe cheese by solid-phase microextraction. *Chromatographia*, 53, S390–S393.
- Pinho, O.,** Peres, C. y Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2003) Solid-phase microextraction of volatile compounds in “Terrincho” ewe cheese. Comparison of different fibers. *Journal of Chromatography A*, 1011, 1-9.
- Potthast, K.** (1977) Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products. An application of a new method. *Acta Alimentaria Polonica*, 3, 195-201.
- Poveda, J. M.,** Sánchez-Palomo, E., Pérez-Coello, M. S. y Cabezas, L. (2008) Volatile composition, olfactometry profile and sensory evaluation of semi-hard Spanish goat cheeses. *Dairy Science and Technology*, 88, 355-367.
- Preininger, M.,** Rychlik, M. y Grosch, W. (1994) Potent odorants of the neutral volatile fraction of Swiss cheese (Emmentaler). In: *Trends in flavour Research*. (Maarse H, van der Heij DG, eds) Elsevier, Amsterdam, 267-270.
- Preuss, R.,** Angerer, J. y Drexler, H. (2003) Naphthalene-an environmental and occupation toxicant. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 76, 556-576.
- Purcaro, G.,** Morrison, P., Moret, S., Conte, L. S. y Marriot, P. J. (2007a) Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oils using solid-phase microextraction-comprehensive two dimensional gas chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1161, 284-291.
- Purcaro, G.,** Moret, S. y Conte, L. S. (2007b) Rapid validated method for the analysis of benzo(a)pyrene in vegetable oils by using solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1176, 231-235.
- Qian, M. y Reineccius, G.** (2003) Potent aroma compounds in Parmigiano Reggiano cheese studied using a dynamic headspace (purge-trap) method. *Flavour and Fragrance Journal*, 18, 252-259.

- Randazzo, C. L., Pitino, I., De Luca, S., Scifó, G. O. y Caggia, C. (2008)** Effect of wild Straits used as starter cultures and adjunct cultures on the volatile compounds of the Pecorino Siciliano cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 122, 269-278.
- Randazzo, C. L., Pitino, I., Ribbera, A. y Caggia, C. (2010)** Pecorino Crotonese cheese: Study of bacterial population and flavour compounds. *Food Microbiology*, 27, 363-374.
- Real Decreto 1113/2006**, de 29 de septiembre, por el que se aprueban las normas de calidad para quesos y quesos fundidos (2006) Ministerio de Sanidad y Consumo. BOE nº 239, 34719-34720.
- Real Decreto 90/2001** de 2 de febrero, por el que se establecen los métodos de toma de muestras y de análisis para el control oficial del contenido máximo de aflatoxinas en cacahuetes, frutos de cáscara, frutos desecados, cereales, leche y los productos derivados de su transformación (2001) Ministerio de Sanidad y Consumo. BOE nº 47, 6996-7000.
- Reglamento (CE) Nº 208/2005** de la Comisión del 4 de Febrero de 2005 en relación a la investigación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en determinados alimentos. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 34, 8.02.2005: 43-45.
- Reglamento (CE) Nº 1881/2006** de la Comisión del 19 de diciembre de 2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 364, 20.12.2006:5.
- Reglamento (CE) Nº 2065/2003** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 10 de noviembre de 2003, sobre los aromas de humo utilizados o destinados a ser utilizados en los productos alimenticios o en su superficie. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 309, 26.11.2003.
- Reglamento (CE) Nº 835/2011** de la Comisión, de 19 de agosto de 2011, que modifica el Reglamento (CE) 1881/2006 por lo que respecta al contenido máximo de hidrocarburos aromáticos policíclicos en los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 215, 20.08.2011.
- Reglamento (CE) Nº 1327/2014** de la Comisión, de 12 de diciembre de 2014 por el que se modifica el Reglamento (CE) no 1881/2006 en lo que respecta al contenido máximo de

hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en la carne y los productos cárnicos ahumados del modo tradicional y en el pescado y los productos de la pesca ahumados del modo tradicional. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 358/13, 13.12.2014.

Resolución de 15 de Abril de 2008, de la Dirección General de Industria Agroalimentaria y Alimentación, por la que se concede la protección nacional transitoria a la denominación de origen protegida “**Queso de Flor de Guía y Queso de Guía**”. (B.O.E. N° 137 de 06.06.2008).

Reineccius, G. (2005) Changes in Food Flavor Due to Processing. Flavor Chemistry and Technology, Second Edition. Publisher: Taylor & Francis Ltd, CRC Press *University of Minnesota, St. Paul, USA*.

Requena, T., de la Fuente, M. A., Fernández de Palencia, P., Juárez, M. y Peláez, C. (1992) Evaluation of a specific starter for the production of semi-hard goat's milk cheese. *Lait*, 72, 437-448.

Revello Chion, A., Tabacco, E., Giaccone, D., Peiretti, P. G., Battelli, G., y Borreani, G. (2010) Variation of fatty acid and terpene profiles in mountain milk and “Toma piemontese” cheese as affected by diet composition in different seasons. *Food Chemistry*, 121(2), 393-399.

Riha, W.E. y Wendorff, W. L. (1993) Influence of processing conditions on surface color of liquid smoke-treated cheeses. *Journal of Dairy Science*, 76, 1491-1496.

Riha, W.E., Wendorff, W.L. y Rank, S. (1992) Benzo(a)pyrene content of smoked and smoked-flavored cheese products sold in Wisconsin. *Journal of Food Protection*, 55, 636-638.

Rodríguez-Alonso, P., Centeno, J. A. y Garabal, J. I. (2009) Comparison of the volatile profiles of Arzúa-Ulloa and Tetilla cheeses manufactured from raw and pasteurized milk *LWT - Food Science and Technology*, 42, 1722–1728.

Rodríguez-García, M. E., de Lira, C., Hernández-Becerra, E., Cornejo-Villegas, M. A., Palacios-Fonseca, A. J., Rojas-Molina, I., Reynoso, R., Quintero, L. C., Del-Real, A.,

- Zepeda, T. A. y Muñoz-Torres, C. (2007) Physicochemical characterization of nopal pads (*Opuntia ficus indica*) and dry vacuum nopal powders as a function of the maturation. *Plant Foods Human Nutrition*, 62, 107-112.
- Rychlik, M. y Bosset, J. O.** (2001) Flavour and off-flavour compounds of Swiss Gruyère cheese. Evaluation of potent odorants. *International Dairy Journal*, 11, 895-901.
- Sabio, E. y Vidal-Aragón, M. C.** (1996) Analysis of the volatile fraction of Ibores cheese. *Alimentaria*, 278, 101-103.
- Sablé, S., Letellier, F. y Cotteceau, G.** (1997) An analysis of the volatile flavour compounds in a soft raw goat milk cheese. *Biotechnology Letters*, 19, 143-145.
- Salles, C., Herve, C., Septier, C., Demaizieres, D., Lesschaeve, I., Issanchou, S. y Le Quéré, J.L.** (2000) Evaluation of taste compounds in water soluble extract of goat cheese, *Food Chemistry*, 68, 429-435.
- Salles, C., Sommerer, N., Septier, C., Issanchou, S., Chabanet, C., Garem, A. y Le Quéré, J. L.** (2002) Goat cheese flavor: Sensory evaluation of branched-chain fatty acids and small peptides. *Journal of Food Science*, 67, 835-841.
- Sánchez-Macías, D., Fresno, M., Moreno-Indias, I., Castro, N., Morales-de la Nuez, A., Álvarez, S. y Argüello, A.** (2010) Physicochemical analysis of full-fat, reduced-fat and low-fat artisan-style goat cheese. *Journal of Dairy Science*, 93, 3950-3956.
- SCF** (2002) Comisión Europea. Opinión del Comité Científico de Alimentación sobre el riesgo para la salud humana de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en alimentos. Informe SCF/CS/CNTM/PAH/29 Final (4 de Diciembre de 2002).
- Schaller, E., Zenhäusern, S., Zesiger, T., Bosset, J. O. y Escher, F.** (2000) Use of preconcentration techniques applied to a MS-based "Electronic nose". *Analisis*, 28, 743-749.
- Serhan, M., Linder, M., Hosri, C. y Fanni, J.** (2010) Changes in proteolysis and volatile fraction during ripening of Darifayeh, a Lebanese artisanal raw goat's milk cheese. *Small Ruminant Research*, 90, 75-82.

- Serra-Majem, L.,** Armas Navarro, A. y Ribas Barba, L. (1999) Hábitos alimentarios y consumo de alimentos. Santa Cruz de Tenerife: Servicio Canario de Salud. Encuesta Nutricional de Canarias. ENCA (1997-98), (1).
- Sheehan, J. J.,** Patel, A. D., Drake, M. A. y McSweeney, P. L. H. (2009) Effect of partial or total substitution of bovine for caprine milk on the compositional, volatile, non-volatile and sensory characteristics of semi-hard cheeses. *International Dairy Journal*, 19, 498-509.
- Sieber, R.,** Buetikofer, U. y Bosset, J. O. (1995) Benzoic acid as a natural compound in cultured dairy products and cheese. *Journal of Reproductive Medicine*. 40, 227–246.
- Simko, P.,** Gergely, S., Karovicova, J., Drdak, M. y Knezo, J. (1993) Influence of cooking on benzo(a)pyrene content in smoked sausages. *Meat Science*, 34, 301-309.
- Simon, R.,** Gómez Ruíz, J. A., Von Holst, C., Wenzl, T. y Anklam, E. (2008) Results of a European inter-laboratory comparison study on the determination of EU priority polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in edible vegetable oils. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 391, 1397-1408.
- Simon, R.,** Gómez Ruíz, J. A. y Wenzl, T. (2010) Results of a European inter-laboratory comparison study on the determination of 15 + 1 EU priority polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in liquid smoke condensates. *Food Chemistry*, 123, 819-826.
- Simon, R.,** Palme, S. y Anklam, E. (2006) Single-laboratory validation of a gas-chromatography-mass spectrometry method for quantitation of 15 European priority polycyclic aromatic hydrocarbons in smoke flavourings. *Journal of Chromatography A*, 1103, 307-313.
- Simon, R.,** Palme, S. y Anklam, E. (2007) Validation (in-house and collaborative) of a method based on liquid chromatography for the quantitation of 15 European-priority polycyclic aromatic hydrocarbons in smoke flavourings: HPLC-method validation for 15 EU priority PAH in smoke condensates. *Food Chemistry*, 104, 876-887.
- Slout, D. y Harkes, P. D.** (1975a). Volatile trace components in Gouda cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23, 356-357.

- Sloot, D. y Harkes, P. D.** (1975b) Alkylpyrazines in Emmental cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23, 358.
- Soós, K.** (1980) The occurrence of carcinogenic polycyclic hydrocarbons in foods in Hungary. *Archives of Toxicology*, 4, 446-448.
- Sopelana, P., Ibargoitia, M. L., y Guillén, M. D.** (2013). 22. Smoked cheese. *Handbook of cheese in health: Production, nutrition and medical sciences*, 6, 313-325.
- Sorensen, J. y Benfeldt, C.** (2001) Comparison of ripening characteristics of Danbo cheeses from two dairies. *International Dairy Journal*, 11, 355–362.
- Straif, K., Baan, R., Grosse, B., Secretan, F., Ghissassi, El y Cogliano, V.** (2005) Carcinogenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Lancet*, 6, 931-931.
- Suchanová, M., J. Hajslová, M. Tomaniová, V. Kocourek, y Babicka, L.** (2008) Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked cheese. *Journal of Science Food Agricultural*, 88, 1307-131.
- Sunesen, L. O., Lund, P., Sorensen, J. y Holmer, G.** (2002) Development of volatile compounds in processed cheese during storage. *Lebensmittel Wissenschaft und-Technologie*, 35, 128-134.
- Taborda, G., Gómez-Ruíz, J. A., Martínez-Castro, I., Amigo, L., Ramos, M., y Molina, E.** (2008) Taste and flavor artisan and industrial Manchego cheese as influenced by the water-soluble extract compounds. *European Food Research and Technology*, 227, 323-330.
- Takatsuki, K., Suzuki, S., Sato, N. y Ushizawa, I.** (1985) Liquid chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish and shellfish. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 68, 945-949.
- Tavaria, F. K., Dahl, S., Carballo, F. J. y Malcata, F. X.** (2002) Aminoacid catabolism and generation of volátiles by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 85, 2462-2470.
- Thierry, A., Maillard, M. B. y Le Quéré, J. L.** (1999) Dynamic headspace analysis of Emmental aqueous phase as a method to quantify changes in volatile flavour compounds during ripening. *International Dairy Journal*, 9, 453-463.

- Tilgner, D. J. y Miler, K.** (1963) The possibilities of eliminating carcinogens from curing smoke. *Przemysl Spozywczy*, 17, 85-90.
- Tóth, L. y Blaas, W.** (1972a) Effect of smoking technology on the content of carcinogenic hydrocarbons in smoked meat products. *Fleischwirtschaft*, 52, 1121-1124.
- Tóth, L. y Blaas, W.** (1972b) The effect of smoking technology on the content of carcinogenic hydrocarbons in smoked meat products. II. Effect of smoldering temperature of wood and of cooling, washing and filtering of smoke. *Fleischwirtschaft*, 52, 1419-1422.
- Tóth, L. y Blaas, W.** (1972c) 3,4-Benzopyrene content of various smoke preparations. *Fleischwirtschaft*, 52, 1171.
- Tuomala, T. y Kallio, H.** (1996) Identification of free fatty acids and some other volatile flavour compounds from Swiss cheese using on-line supercritical fluid extraction-gas chromatography. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, 203, 236-240.
- Urbach, G.** (1995) Contribution of lactic acid bacteria to flavour compound formation in dairy products. *International Dairy Journal*, 5, 877-903.
- Urbach, G., Stark, W. y Forss, D.A.** (1972) Volatile compounds in butter oils. II. Flavor and flavor thresholds of lactones, fatty acids, phenols, indole and skatole in deodorized synthetic butter. *Journal of Dairy Research*, 39, 35-47.
- USEPA** (1999) Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. Draft. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- Uthe, J. F. y Musial, C. J.** (1988) Intercomparative study on the determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in marine shellfish tissue. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 71, 363-368.
- Vaessen, H. A. M. G., Schuller, P.L., Jekel, A. A. y Wilbers, A. A. M. M.** (1984) Polycyclic aromatic hydrocarbons in selected foods; analysis and occurrence. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 7, 297-324.

- Vaessen**, H. A. M. G., Wagstaffe, P. J. y Lindsey, A. S. (1990) Reference materials for PAHs in foodstuffs: II. Results of a further intercomparison of methods in experienced laboratories. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 336, 503-510.
- Valero**, E., Sanz, J. y Martínez-Castro, I. (2001) Direct thermal desorption in the analysis of cheese volatiles by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry: comparison with simultaneous distillation-extraction and dynamic headspace. *Journal of Chromatography Science*, 39, 222-228.
- Vamos-Vigyazo**, L. y **Kiss-Kutz**, N. (1974) Estimation of volatile acids in Emmental cheese by gas-liquid chromatography. *Acta Alimentaria*, 3, 309-325.
- Vandeweghe**, P. y **Reineccius**, G. A. (1990) Comparison of flavor isolation techniques applied to Cheddar cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 1549-1552.
- Verzera**, A., Ziino, M., Condurso, C., Romeo, V. y Zapala, M. (2004) Solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry for rapid characterisation of semi-hard cheeses. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 380, 930-936.
- Viallon**, C., Verdier-Metz, I., Denoyer, C., Pradel, P., Coulon, J. B. y Berdagué, J. L., (1999) Desorbed terpenes and sesquiterpenes from forages and cheeses. *Journal of Dairy Research*, 66, 319-326.
- Vidal-Aragón**, M. C., Sabio, E., González, J. y Mas, M. (1994) Contribution of the volatile compounds study of goat cheese from Extremadura: Effect of the season of production. *Alimentaria*, 258, 25-29.
- Wasilewski**, S. y **Kozkowski**, J. (1977) The use of the smoke flavouring preparation in cheese-making. *Acta Alimentaria Polonica*, 3, 307-312.
- Watkins**, P. J., Shen, Z. y Wijesundera, C. (2002) Determination of volatile flavour compounds in cheese by SPME and GC/MS. *Australian Journal of Dairy Technology*, 57, 70.
- Wendorff**, W. L., Riha, W. E. y Muehlenkamp, E. (1993) Growth of molds on cheese treated with heat and liquid smoke. *Journal of Food Protection*, 56, 963-966.

- Wenzl**, T., Simon, R., Kleiner, J. y Anklam, E. (2006) Analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in food and the environment needed for new food legislation in the European Union. *Trends in Analytical Chemistry*, 25, 716-725.
- Wise**, S. A., Chesler, S. N., Guenther, F. R.; Hertz, H. S., Hilpert, L. R., May, W. E. y Parris, R. M. (1980) Interlaboratory comparison of determinations of trace level hydrocarbons in mussels. *Analytical Chemistry*, 52, 1828-1233.
- Wolf**, I. V., Perotti, M. C., Bernal, S. M. y Zalazar, C. A. (2010) Study of the chemical composition, proteolysis, lipolysis and volatile compounds profile of commercial Reggianito Argentino cheese: Characterization of Reggianito Argentino cheese. *Food Research International*, 43, 1204-1211.
- Ziino**, M., Concurso. C., Romeo, V., Giuffrida, D. y Verzera, A. (2005) Characterization of “Provola dei Nebrodi”, a typical Sicilian cheese, by volatiles analysis using SPME-GC/MS. *International Dairy Journal*, 15, 585-593.

OTRAS CONTRIBUCIONES

OTRAS CONTRIBUCIONES DERIVADAS DEL TRABAJO DE ESTA MEMORIA.

Algunos de los resultados derivados del trabajo de esta memoria han sido difundidos en artículos en Libros de Actas o Proceedings de Congresos Nacionales o Internacionales o en forma de Comunicaciones Orales o de Poster.

X JORNADAS DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL (26-29 noviembre 2002, Barcelona).

Dos Comunicaciones en forma de Póster.

- M^a Dolores Guillén, Gemma Palencia y Patricia Sopelana. “Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en quesos ahumados. Comparación de la información proporcionada por la microextracción en fase sólida con la de las clásicas técnicas de extracción”.
- M^a Dolores Guillén, Gemma Palencia y Patricia Sopelana. “Estudio de la eficacia de la tripa en la retención de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en chorizo ahumado”.

III CONGRESO ESPAÑOL DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS (CESIA 2004) (15-17 septiembre 2004, Pamplona).

Una Comunicación en forma de Póster, y un Artículo publicado en el Libro de Actas del congreso.

- M^a Dolores Guillén, M. L. Ibargoitia, Patricia Sopelana, Begoña Abascal, Gemma Palencia y Marichu Fresno. “Algunos de los efectos del ahumado en la manufactura del queso ahumado con humo o con aromas de humo”.

3rd EURO FED LIPID CONGRESS, (5-8 septiembre 2004, Edimburgo).

Una Comunicación en forma de Póster.

- M^a Dolores Guillén, Patricia Sopelana y Gemma Palencia. “Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in edible vegetable oils”.

III CONGRESO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS, (29 mayo-1 junio 2005, Burgos).

Dos Comunicaciones en forma de Póster.

-M^a Dolores Guillén, Gemma Palencia, Patricia Sopelana y Begoña Abascal. “Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en quesos ahumados con aromas de humo”.

-M^a Dolores Guillén, Begoña Abascal, Patricia Sopelana y Gemma Palencia. “Eficacia de distintas fibras en el estudio, mediante SPME-CG/EM, del espacio de cabeza de queso ahumado”.

INNOVATIONS IN TRADITIONAL FOODS, (INTRADFOOD), (25-28 octubre 2005, Valencia).

Una Comunicación en forma de Póster y un Proceeding publicado en el Libro de Actas del congreso.

-M^a Dolores Guillén, Gemma Palencia, Patricia Sopelana M. L. Ibargoitia y María Fresno. “Prospective study on the presence of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Herreño cheese”.

2º CONGRESO INTERNACIONAL DE AUTOCONTROL Y SEGURIDAD ALIMENTARIA, (17-18 octubre 2005, Bilbao).

Una Comunicación en forma de Póster.

-M^a Dolores Guillén, Gemma Palencia, Begoña Abascal, Patricia Sopelana y M. L. Ibargoitia. “La seguridad del queso referida a la presencia de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos. Control de estos contaminantes”.

4th EURO FED LIPID CONGRESS, (1-4 octubre 2006, Madrid).

Una Comunicación en forma de Póster.

-M^a Dolores Guillén, Gemma Palencia, Encarnación Goicoechea, Nerea Cosmes.
“Demonstration for the first time of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the oxidation of edible oils”.

X JORNADAS DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL, 2002.

Dos Comunicaciones en forma de Póster.

-M^a Dolores Guillén, Gemma Palencia y Patricia Sopenana. “Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en quesos ahumados. Comparación de la información proporcionada por la microextracción en fase sólida con la de las clásicas técnicas de extracción”.

-M^a Dolores Guillén, Gemma Palencia y Patricia Sopenana. “Estudio de la eficacia de la tripa en la retención de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en chorizo ahumado”.

PAHs in smoked cheeses. Comparison of the information given by Solid Phase Microextraction (SPME) with that obtained from classical extraction techniques.

M. D. Guillén, G. Palencia, P. Sopelana

Universidad del País Vasco. Tecnología de alimentos. Facultad de Farmacia. Paseo de la Universidad, 7. 01006-Vitoria (Spain). Teléfono: 945-013081. Fax: 34-45-013014. Correo electrónico: knpgulod@vc.ehu.es

Subject: Foods (A). Field: Gas Chromatography (1) / Mass Spectrometry (5)

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) constitute a group of contaminants that is widespread in foods, either as a result of environmental contamination or of certain processes during their manufacture. Taking into account the toxic and carcinogenic effects produced by some of these compounds in experimental animals [1], the levels of PAHs in foods must be strictly controlled. However, the methods employed for the determination of PAHs in this type of matrices are generally tedious and time-consuming, and require large volumes of organic solvents, with all the inconvenience that this involves [2]. Solid Phase Microextraction (SPME) appears to be a useful tool in combination with the classical extraction methods. SPME is quick and simple and does not need the use of solvents. Besides, it can be applied to liquid and solid samples and small sample amounts are used [3].

In order to know if a relation can be established between the results obtained by using classical extraction techniques and SPME, five samples of smoked cheese were analyzed by both methods. The classical extraction scheme included an alkaline treatment of the samples, extraction of PAHs with cyclohexane, clean-up by means of solid phase extraction tubes and, finally, identification and quantitation of the PAHs isolated by Gas Chromatography/Mass Spectrometry operating in SIM mode. Deuterated PAHs were used as internal standards. In relation to the analysis of the samples by SPME, the main steps are: generation of the

headspace of the samples by heating small quantities in closed vials, adsorption of the PAHs present in the headspace onto a fiber covered by polyacrylate and, lastly, desorption of the compounds in the inlet of a gas chromatograph. The detector used was also a mass spectrometer and the acquisition mode selected was SIM

The results obtained show that, firstly, all the samples studied present varying levels of PAHs and that there is a relation between the results obtained from both techniques. It can be also observed that, in general, the samples where PAHs are in higher concentrations give higher areas in the analysis by SPME. It must be pointed out that SPME only allows the detection of low molecular weight PAHs. Taking into account that, in the samples subject of study, low molecular weight PAHs are usually more abundant and have higher concentrations than heavy PAHs, it could be said that SPME is useful to discriminate between samples with different degrees of PAH contamination.

References

- [1] Guillén, M.D.; Sopelana, P. In Food Safety. Ed. J.P.F. D’Mello. CABI Publishing, UK (in press).
- [2] Guillén, M.D.; Sopelana, P.; Partearroyo, M.A. (2000) Food Addit. Contam. 17: 27-44.
- [3] Doong, R.-A.; Chang, S.-M.; Sun, Y.-C. (2000) J. Chrom. A, 879: 177-188.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the financial support of the MCYT (MCYT CAL00-054-C3-2) and of the University of the Basque Country (9/UPV 00101.125.1366712001). G. Palencia thanks the University of the Basque Country for a predoctoral fellowship.

HAPs EN QUESOS AHUMADOS. COMPARACIÓN DE LA INFORMACIÓN PROPORCIONADA POR LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME) CON LA OBTENIDA MEDIANTE TÉCNICAS CLÁSICAS DE EXTRACCIÓN



M.D. Guillén, G. Palencia y P. Sopelana
 Tecnología de Alimentos, Facultad de Farmacia, UPV
 Paseo de la Universidad, 7, 01006 Vitoria
 Teléfono: 945-013081; Fax: 945-013014; E-mail: knpgulod@vf.ehu.es

INTRODUCCIÓN

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) constituyen un grupo de contaminantes ampliamente distribuidos en el medio ambiente y en los alimentos, procediendo en este último caso de la propia contaminación ambiental o de ciertos procesos llevados a cabo durante su producción y preparación como, por ejemplo, el ahumado (1). Dado que muchos de estos compuestos presentan actividad carcinogénica demostrada en animales y, en algunos casos, probable en el hombre, su presencia y niveles en alimentos deben ser controlados. No obstante, los métodos empleados habitualmente para determinar HAPs en alimentos son largos y laboriosos y requieren grandes volúmenes de disolventes, con todos los inconvenientes que ello conlleva. Como complemento a este tipo de metodologías que podríamos denominar clásicas, en este trabajo se plantea el uso de la Microextracción en Fase Sólida (SPME), que es una técnica sencilla y rápida, basada en el empleo de una fibra recubierta por una fase en la que los HAPs quedan retenidos. Además, no se requiere el uso de disolventes y las cantidades de muestra utilizadas son muy pequeñas. La SPME ha sido empleada fundamentalmente para el estudio de HAPs en muestras de agua de procedencia diversa (2-4) y, en algunos casos, en suelos (3) y sedimentos (5), casi siempre por inmersión de la fibra en las muestras ("DIRECT SPME"), si bien también puede aplicarse al espacio de cabeza de las mismas ("HS-SPME") (2, 3). Cabe señalar que, a pesar de las numerosas ventajas de la Microextracción en Fase Sólida, hasta donde nosotros sabemos, esta técnica no se ha aplicado al estudio de HAPs en alimentos. En este trabajo se ha determinado el contenido de HAPs en muestras de queso ahumado, tanto por medio de un método de extracción clásico como por SPME, y se han comparado los resultados obtenidos por ambas técnicas, con objeto de ver si puede establecerse alguna relación entre los dos grupos de datos.

EXPERIMENTAL

Se han estudiado cinco quesos ahumados de procedencia diversa, designados como Q1, Q2, Q3, Q4 y Q5. La parte elegida para determinar los HAPs fue la zona exterior de los mismos, ya que estudios preliminares ponen de manifiesto que es en el exterior donde los HAPs aparecen en mayor proporción, excluyendo la corteza, que habitualmente no suele consumirse. El procedimiento seguido para el estudio de las muestras, tanto por un método clásico de extracción como por SPME aparece esquematizado en la Figura 1. La cuantificación de HAPs por el método clásico se llevó a cabo mediante la adición de una mezcla de HAPs deuterados al principio del proceso.

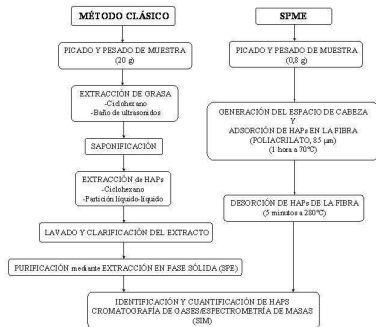


Figura 1. Esquema del procedimiento empleado para el estudio de las muestras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos por ambas técnicas aparecen en la **Tabla 1**. Los valores correspondientes al método clásico de extracción (MCE) expresan concentraciones de HAPs en μg por kg de parte exterior, mientras que los de SPME corresponden a las áreas de los iones seleccionados para la cuantificación de cada compuesto que, en general, coinciden con sus iones moleculares. En todos los casos, las muestras se analizaron por duplicado. Los resultados obtenidos por MCE revelan la presencia de niveles variables de numerosos HAPs en todas las muestras estudiadas, entre los que predominan los compuestos de 2, 3 y 4 anillos aromáticos (naftaleno, fenantreno, pireno), con un alto número de derivados alquilados. Además, las muestras Q1, Q2 y Q5 presentan algunos HAPs de 5 anillos o más (benzofluoranteno, benzopirenos, benzo(ghi)perileno), si bien sólo se ha identificado benzo(a)pireno en Q1 y Q2, y en concentraciones bajas (0,20 y 0,08 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente). En cuanto a las concentraciones de los HAPs identificados, cabe mencionar que los valores más altos corresponden, en general, a los HAPs más ligeros y, a medida que el peso molecular de los compuestos aumenta, sus concentraciones van disminuyendo. Por otra parte, las concentraciones de los derivados alquilados también son más bajas que las de los HAPs cabezas de serie, a excepción de la muestra Q4, en la que los niveles de algunos dimetilnaftaleno son superiores a las del propio naftaleno. Si se comparan los resultados obtenidos por MCE y por SPME, se observa que:

- 1.- Con SPME se detecta un número menor de HAPs, siendo todos ellos compuestos con cuatro anillos aromáticos o menos. Esto concuerda con los resultados de otros autores (2, 3), según los cuales, la HS-SPME no es útil para detectar HAPs con más de cinco anillos aromáticos. Sin embargo, en estas muestras se observa que, a pesar de que por MCE se han determinado HAPs con 5 anillos en algunas de las muestras, tampoco éstos son detectables por SPME, aun cuando la alta temperatura utilizada para la generación del espacio de cabeza de las muestras (70°C) favorece la vaporización de los compuestos más pesados. Esto puede explicarse por la baja volatilidad de los HAPs de alto peso molecular y porque el queso es una matriz compleja, con un alto contenido en grasa, que tiene gran capacidad para retener a los HAPs, lo que impide o dificulta que éstos escapen a la fase vapor.
- 2.- En general, para un mismo HAP, el valor del área obtenida por SPME guarda relación con la concentración obtenida por MCE. Así, las muestras con concentraciones más altas de HAPs, tienen también áreas más altas de SPME y lo mismo ocurre en el caso de las concentraciones más bajas. Además, cabe señalar que, en el caso de algunos compuestos, como

naftaleno, fluoreno y fenantreno, la relación entre los valores obtenidos por SPME y por MCE se mantiene bastante constante en todas las muestras estudiadas. Sin embargo, al ir aumentando el peso molecular de los HAPs, así como los grupos alquilados, la respuesta por SPME no sólo es más baja, sino que llega un momento en el que, independientemente de las concentraciones de los compuestos, con SPME apenas se aprecian diferencias. Este hecho se ha observado especialmente en el caso de fluoranteno y pireno.

Tabla 1. Comparación de los valores de HAPs obtenidos en quesos ahumados siguiendo un método clásico de extracción (MCE) y por SPME.

	Q1		Q2		Q3		Q4		Q5	
	MCE ^a	SPME ^b	MCE	SPME	MCE	SPME	MCE	SPME	MCE	SPME
Naftaleno	175,74	1.661,59	38,56	352,49	27,97	342,23	31,41	326,82	18,80	196,71
2-Metilnaftaleno	129,97	437,02	19,62	86,09	24,33	108,99	26,79	75,15	25,73	72,28
1-Metilnaftaleno	82,50	275,72	13,32	56,38	15,36	28,99	24,16	69,61	13,20	35,51
2,6-Dimetilnaftaleno	115,10	162,49	11,25	-	21,22	48,73	37,34	44,27	13,94	16,55
1,7-Dimetilnaftaleno	91,63	150,51	9,07	17,79	17,72	43,88	31,41	43,88	12,07	15,27
1,6-Dimetilnaftaleno	93,01	146,14	10,29	17,74	14,43	33,49	32,29	105,43	10,95	11,59
1,4+2,3-Dimetilnaftaleno?	39,09	71,46	5,50	-	9,17 ⁶	19,44	19,96	21,74	2,20	21,77
1,5-Dimetilnaftaleno	21,01	35,96	1,96	-	3,87	11,45	14,91	22,33	2,30	20,27
Dimetilnaftaleno o isómero	79,32	152,71	3,15	-	4,28	42,41	11,37	37,26	1,31	-
Acenafileno	44,48	453,65	9,92	107,73	4,28	40,04	1,79	10,44	1,31	-
Acenafteno	10,37	-	1,97	8,66	3,30	-	1,46	-	0,85	-
Fluoreno	57,86	223,03	7,37	40,44	8,05	42,51	8,42	34,89	2,03	8,54
Fenantreno	42,90	179,40	15,45	57,89	6,65	27,83	13,85	47,76	3,76	14,35
Antraceno	7,04	41,17	3,43	27,79	1,23	15,87	1,42	3,48 ⁶	0,44 ⁶	6,70
o-Terfenilo	2,24	-	0,57	12,48	1,45	-	-	-	3,41	-
2-Metilfenantreno	7,20	-	1,58	2,44	1,76	-	5,54	-	0,92 ⁶	-
2-Metilfenantreno	10,25	-	2,84	4,09	2,44	-	8,24	-	1,20	-
2-Metilantraceno	5,85	-	1,29	-	-	-	-	-	0,95	-
3-Metilantraceno	6,15	-	1,76	3,73	1,74	-	5,99	-	1,59	-
1-Metilfenantreno	6,85	-	1,86	-	1,52	-	7,08	-	0,75	-
Dimetilfenantreno o isómero	-	-	-	-	-	-	-	-	0,40	-
Dimetilfenantreno o isómero	1,46	-	-	-	-	-	-	-	0,38	-
Dimetilfenantreno o isómero	1,40	-	-	0,55	-	-	1,96 ⁶	-	0,38	-
Dimetilfenantreno o isómero	0,79	-	-	0,52	-	-	2,04 ⁶	-	-	-
Dimetilfenantreno o isómero	1,07	-	-	-	-	-	-	-	1,28	-
Dimetilfenantreno o isómero	2,53	-	-	1,97	-	-	7,44	-	0,82	-
Dimetilfenantreno o isómero	2,71	-	1,43	-	1,12	-	4,55	-	0,70	-
Dimetilfenantreno o isómero	3,08	-	-	-	0,88	-	14,17	-	-	-
Dimetilfenantreno o isómero	1,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fluoranteno	5,22	5,75	2,10	4,26	5,88	6,72	1,09	4,91	0,48	5,34
Pireno	5,83	4,99	1,56	2,77	0,54	5,47	1,52	4,96	0,62	4,73
o-Terfenilo	0,21	-	0,12	-	0,12	-	-	-	0,10	-
p-Terfenilo	0,09	-	0,06	-	0,07	-	-	-	0,12	-
2-Metilfluoranteno	0,22	-	0,09	-	-	-	-	-	-	-
2-Metilfluoranteno o isómero	0,38	-	0,13	-	-	-	-	-	-	-
Metilfluoranteno o isómero	0,16	-	0,09	-	-	-	-	-	-	-
1-MFl+1H-3(gh)P ⁶	0,94	-	0,52	-	-	-	-	-	-	-
1H-Benzo(b)fluoreno	0,38	-	0,38	0,14	-	-	-	-	-	-
1H-Benzo(c)fluoreno	0,18	-	0,09	-	-	-	-	-	-	-
Metilfluoranteno o isómero	0,21	-	0,18	-	-	-	0,26	-	-	-
Metilfluoranteno o isómero	0,23	-	0,19	-	-	-	0,27	-	0,09 ⁶	-
1-Metilpireno	0,24	-	0,17	-	-	-	0,30	-	-	-
Benzo(a)antraceno	0,39	-	0,22	-	-	-	-	-	0,04	-
Benzo(b)antraceno	0,64	-	0,38	-	0,12	-	-	-	0,11	-
Benzo(k)fluoranteno	0,19	-	0,12	-	-	-	-	-	0,28	-
Benzo(e)pireno	0,26	-	0,11	-	-	-	-	-	-	-
Benzo(a)pireno	0,13	-	0,11	-	-	-	-	-	0,06 ⁶	-
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0,11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Benzo(ghi)perileno	0,11	-	0,08 ⁶	-	-	-	-	-	0,04	-

^a Concentraciones de HAPs obtenidas siguiendo un método clásico de extracción (MCE), expresadas en $\mu\text{g}/\text{kg}$. ^b Áreas de HAPs obtenidas por SPME, divididas por 1×10^6 . ⁶ Identificado sólo en una de las muestras. ⁶ Po-iblemente 1-Metilfluoranteno+1H-Benzo(c)fluoreno

Estudios anteriores han puesto de manifiesto que se puede llegar a establecer una relación entre las concentraciones de pireno y benzo(a)pireno en aromas de humo (6). Sin embargo, cuando se emplea SPME, esto no es posible ya que, en el caso del pireno, no existe una respuesta proporcional entre MCE y SPME. Por consiguiente, se ha pasado en otro HAP más frecuente en alimentos ahumados y fácilmente detectable por ambas metodologías, el fenantreno, como indicador potencial de la presencia de benzo(a)pireno ya que, tal como se ha mencionado anteriormente, para este compuesto sí existe una proporcionalidad entre los resultados de ambas técnicas. No obstante, previamente debe comprobarse que efectivamente existe una relación entre las concentraciones de fenantreno y benzo(a)pireno. En la **Tabla 2** se han representado los cocientes entre los valores de fenantreno por SPME y MCE, y entre las concentraciones obtenidas por MCE de fenantreno y pireno, pireno y benzo(a)pireno y, finalmente, fenantreno y benzo(a)pireno, para cada una de las muestras.

Tabla 2. Cocientes entre los valores de fenantreno obtenidos por SPME y por MCE, y entre concentraciones de MCE de fenantreno y pireno, pireno y benzo(a)pireno, y fenantreno y benzo(a)pireno.

	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5
Fenantreno (SPME)/Fenantreno (MCE)	4,18	3,75	4,18	3,45	3,82
Fenantreno (MCE)/Pireno (MCE)	8,88	9,90	12,31	9,11	6,06
Pireno (MCE)/Benzo(a)pireno (MCE)	24,15	19,50	-	-	-
Fenantreno (MCE)/Benzo(a)pireno (MCE)	214,50	193,13	-	-	-

Esta tabla pone de manifiesto que la relación entre los valores de SPME y MCE se mantiene bastante constante en todas las muestras, al igual que el cociente fenantreno/pireno que, exceptuando la muestra Q5, puede considerarse muy parecido en todos los casos. En cuanto a los otros dos cocientes, a pesar de que sólo se pueden calcular en dos de las muestras, se observa que

también son del mismo orden. Además, si se tiene en cuenta que el área de fenantreno obtenida por SPME en la muestra Q2 (ver **Tabla 1**), en la que el nivel de benzo(a)pireno es de 0,08 $\mu\text{g}/\text{kg}$, es de 57.890 (57,89 $\times 10^3$), podría pensarse que áreas de fenantreno del orden de 50.000 pueden estar relacionadas con una posible presencia de benzo(a)pireno que, a su vez, suele estar asociado a otros HAPs con mayor o menor grado de carcinogenicidad.

CONCLUSIONES

- 1.- Todos los quesos estudiados presentan niveles variables de HAPs y en dos de las muestras se ha encontrado benzo(a)pireno que, a pesar de encontrarse en concentraciones bajas, supera en ambos casos el límite máximo establecido para este compuesto en alimentos ahumados con aromas de humo.
- 2.- La Microextracción en Fase Sólida en las condiciones de este estudio, y en este tipo de muestras, no permite detectar HAPs con peso molecular superior a 202.
- 3.- Se ha observado una relación bastante constante entre los resultados obtenidos por medio de un método clásico de extracción y por SPME para algunos HAPs.
- 4.- La SPME en las condiciones de este estudio no permite determinar el contenido total de HAPs en queso ahumado, pero puede servir como una herramienta de screening para diferenciar muestras que puedan presentar un cierto grado de contaminación. Por otra parte, el área de fenantreno podría considerarse como un posible indicador de la presencia de benzo(a)pireno y otros HAPs carcinogénicos, si bien esta posibilidad debería ser confirmada por estudios más exhaustivos con un mayor número de muestras que contengan benzo(a)pireno.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Guillén, M.D.; Sopelana, P.; Partearroyo, M.A. (1997) *Rev. Env. Health*, 12: 133-146.
- (2) Doeng, R.-a.; Chang, S.-m.; Sun, Y.-c. (2000) *J. Chrom. A*, 879: 177-188.
- (3) Doeng, R.-a.; Chang, S.-m.; Sun, Y.-c. (2000) *J. Chrom. Sci.*, 38: 528-534.
- (4) Larsenfeld, J.; Hawthorne, S.B.; Miller, D.J. (1996) *Anal. Chem.*, 68: 144-155.
- (5) Cam, D.; Gagn, S.; Méthode, L.; Galletti, G. (2000) *J. Chrom. Sci.*, 38: 55-60.
- (6) Guillén, M.D.; Sopelana, P.; Partearroyo, M.A. (2000) *J. Agric. Food Chem.*, 48: 126-131.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación concedida por el MCYT (AGL2000-1696), por el MAPA (CAL00-054-C3) y por la Universidad del País Vasco (UPV-101.123 EB83799 y 9/UPV 01010.125.1367/2001). G. Palencia agradece a la Universidad del País Vasco la concesión de una beca predoctoral.

Study of the effectiveness of the natural casing of smoked paprika sausage in retaining Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

M. D. Guillén, G. Palencia, P. Sopelana

Universidad del País Vasco. Tecnología de alimentos. Facultad de Farmacia. Paseo de la Universidad, 7. 01006-Vitoria (Spain). Teléfono: 945-013081. Fax: 34-45-013014. Correo electrónico: knpgulod@vc.ehu.es

Subject: Foods (A). Field: Gas Chromatography (1) / Mass Spectrometry (5)

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) constitute a group of contaminants which are widespread in the environment and in foods. Some of these compounds have been considered as probably carcinogenic to humans by the IARC (International Agency for Research on Cancer), so their presence in foods must be avoided. Contamination with PAHs can be attributed to environmental contamination or to treatments used in the processing of foods, such as smoking [1]. In fact, smoked foods have usually been related to high concentrations of PAHs, especially when the conditions of the smoking process are not controlled. Among smoked foodstuffs, meat products deserve a special mention because of the numerous studies on the occurrence of PAHs in this type of food [2,3]. Some authors have studied the protective effect of the casings used for the manufacture of some of these products [4,5] and it seems that these casings reduce the concentrations of PAHs in the product. Furthermore, differences have been found between the protective effect of natural and synthetic casings [6].

In this work, a smoked paprika sausage, wrapped in a natural casing, has been selected in order to study the occurrence of PAHs and the distribution of these compounds through the product. For this purpose, three different types of samples were taken: the sausage both with and without casing and the casing alone. All the samples were subjected to an alkaline treatment, extracted with cyclohexane and cleaned up by solid phase extraction, and the PAHs

isolated were separated, identified and quantified by Gas Chromatography/Mass Spectrometry operating in SIM mode. Deuterated PAHs were used as internal standards.

The results reveal that, in spite of the above mentioned protective effect of the casing, the filling contains a high number of PAHs, including some of those considered as possibly or probably carcinogenic to humans, such as benz(a)anthracene or benzo(a)pyrene. It is also observed that the casing acts as a barrier against the diffusion of PAHs into the product. However, not all the compounds are retained in the same way. For example, methylated PAHs find more difficulty in diffusing through the natural casing than do their parent hydrocarbons.

References

- [1] Guillén, M.D.; Sopelana, P.; Partearroyo, M.A. (1997) *Rev. Env. Health*, 12: 133-146.
- [2] Gomaa., E.A.; Gray, J.I.; Rabie, S.; Lopez-Bote, C.; Booren, A.M. (1993) *Food Addit. Contam.*, 10: 503-521.
- [3] García Falcón, M.S.; González Amigo, S.; Lage Yusty, M.A.; Simal Lozano, J. (1999) *Food Addit. Contam.*, 16: 9-14.
- [4] Simon, S.; Rypinski, A.A.; Tauber, F.W.; Pencyla, R.M.; Westberg, D.O. (1969) *J. Agric. Food Chem.*, 17: 1128-1134.
- [5] Rhee, K.S.; Bratzler, L.J. (1970) *J. Food Sci.*, 35: 146-149.
- [6] Engst, R.; Fritz, W. (1977) *Acta Aliment. Pol.*, 3: 255-267.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the financial support of the MCYT (MCYT AGL2000-1696) and of the University of the Basque Country (9/UPV 00101.125.1366712001). G. Palencia thanks the University of the Basque Country for a predoctoral fellowship.

CAPACIDAD DE LOS HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS PARA DIFUNDIR A TRAVÉS DE LA PIEL DE EMBUTIDO AHUMADO



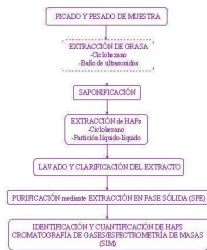
M.D. Guillén, G. Palencia y P. Sopelana
 Tecnología de Alimentos, Facultad de Farmacia, UPV
 Paseo de la Universidad, 7, 01006 Vitoria
 Teléfono: 945-013081; Fax: 945-013014; E-mail: knpgulod@vf.ehu.es

INTRODUCCIÓN

Numerosos estudios han puesto de manifiesto la presencia de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) en alimentos ahumados, a menudo en concentraciones elevadas. No obstante, hay que señalar que la metodología empleada para llevar a cabo el ahumado puede determinar que el producto final resulte más o menos contaminado con este tipo de compuestos. Así, si se controlan parámetros como la temperatura y la duración del proceso, o la distancia desde la fuente de humo hasta el alimento, se pueden obtener productos ahumados con bajos niveles de HAPs (1). Entre los alimentos más comúnmente ahumados se pueden citar los productos cárnicos, entre los que se encuentran carnes de muy variada procedencia, como cordero, cerdo, vaca, y productos más elaborados, como salchichas y otros embutidos (2). Los embutidos gozan de gran popularidad en muchos países europeos, entre ellos España. Así, en nuestro país, uno de los embutidos típicos es el chorizo. Éste es un producto que se elabora tanto a nivel industrial como doméstico y que, a menudo, se somete a procesos de ahumado bastante intensos, sobre todo en ciertas regiones; sin embargo, apenas hay estudios sobre la presencia de HAPs en este tipo de productos. En este trabajo se muestra un estudio sobre chorizo ahumado con humo natural, con un doble objetivo: por un lado, determinar su contenido en HAPs y, por otro, estudiar el efecto que la tripa que lo envuelve ejerce sobre la concentración de HAPs en el interior del producto.

EXPERIMENTAL

Se estudiaron tres tipos de muestras: el producto entero incluyendo la piel, el interior sin la piel y, por último, la piel sola. La metodología empleada aparece esquematizada en la Figura 1.



Cabe señalar que, para la preparación de las muestras, se ensayaron dos tipos de procedimientos. En uno de ellos se extrajo primero la grasa de la muestra y, a continuación, se sometió a un proceso de saponificación y, en el otro, la muestra se saponificó directamente. En el caso de la piel, que se trata de una tripa de cerdo natural, ésta fue saponificada directamente, ya que su naturaleza es fundamentalmente proteica. La cuantificación de los HAPs se llevó a cabo mediante la adición de una mezcla de HAPs deuterados al principio del proceso.

Figura 1. Esquema del procedimiento empleado para el estudio de las muestras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En lo relativo a la metodología empleada, cabe señalar que apenas se encontraron diferencias entre los resultados obtenidos con o sin extracción previa de grasa. Las concentraciones de los HAPs identificados en los tres tipos de muestras aparecen representados en la Tabla 1.

Tabla 1. HAPs identificados en tres tipos de muestras de chorizo ahumado y sus concentraciones, en µg/kg

	CHORIZO ENTERO	INTERIOR	PIEL	% PENETRACIÓN
Naftaleno	317,65	272,46	122,68	85,77
2-Metilnaftaleno	190,42	132,53	146,49	69,60
1-Metilnaftaleno	148,56	101,51	131,53	68,19
2,6-Dimetilnaftaleno	250,81	107,74	209,88	42,95
1,7-Dimetilnaftaleno	127,36	65,37	202,12	51,33
1,6-Dimetilnaftaleno	136,72	98,96	247,87	50,30
1,4-,2,3-Dimetilnaftaleno?	29,35	29,35	97,89	51,19
1,5-Dimetilnaftaleno	53,69	25,54	71,36	47,57
Dimetilnaftaleno o isómero	120,26	59,22	145,39	49,24
Acenftaleno	187,55	116,02	194,18	61,86
Acenftileno	18,01	10,67	24,31	59,22
Fluoreno	103,75	65,06	140,60	62,70
Fenantreno	496,55	294,10	991,50	59,23
Antraceno	37,66	55,19	180,99	55,66
o-Terfenilo	3,97	1,73	32,58	43,45
3-Metilfenantreno	72,96	37,57	305,39	51,49
2-Metilfenantreno	54,67	29,54	224,07	54,02
2-Metilantreno	32,12	14,57	105,14	45,35
9-Metilfenantreno	43,41	20,59	195,80	47,43
1-Metilfenantreno	39,99	22,27	164,55	55,69
Dimetilfenantreno o isómero	5,30	2,99	24,32	56,42
Dimetilantreno o isómero	10,25	3,81	76,94	37,17
2,7-Dimetilfenantreno o isómero	22,42	7,26	164,59	32,38
Dimetilfenantreno o isómero	4,79	1,89	29,44	39,46
Dimetilantreno o isómero	19,90	9,01	159,68	45,29
Dimetilfenantreno o isómero	29,13	12,64	269,10	43,39
Dimetilantreno o isómero	12,28	4,75	93,72	38,68
Dimetilfenantreno o isómero	5,68	1,92	36,79	33,80
Fluoranteno	259,93	371,13	309,86	61,95
Pireno	54,05	31,27	274,70	57,84
m-Terfenilo	2,43	0,76	21,86	31,07
p-Terfenilo	1,37	0,56	13,15	40,88
2-Metilfluoranteno o isómero	3,00	0,89	29,80	29,69
Metilfluoranteno o isómero	2,37	0,93	15,45	39,03
Metilfluoranteno o isómero	3,14	1,35	30,29	42,83
1-Metilfluoranteno+1H-Benz(a)fluoreno?	9,59	3,91	52,97	33,68
Metilfluoranteno o isómero	0,31	0,21	1,75	67,74
1H-Benz(b)fluoreno	3,43	1,22	20,33	35,42
1H-Benz(c)fluoreno	1,70	0,79	11,99	46,18
Metilfluoranteno o isómero	4,77	1,62	30,62	33,86
Metilfluoranteno o isómero	4,92	1,70	34,41	34,55
1-Metilpireno	4,76	1,85	32,21	38,87
Benzo(a)antraceno	2,36	1,51	25,67	63,98
Criseno+Trifenileno	3,91	2,44	36,72	69,40
Metilcriseno o isómero	0,45	0,0	6,29	-
3-Metilcriseno	0,43	0,0	5,43	-
2-Metilcriseno	0,36	0,0	6,01	-
1-Metilcriseno	0,47	0,0	4,78	-
Benzo(b)fluoranteno	0,47	0,30	7,54	62,77
Benzo(h)fluoranteno	0,45	0,23	7,21	51,11
Benzo(g)fluoranteno	0,13	0,13	1,45	-
Benzo(e)pireno	0,36	0,22	5,20	59,72
Benzo(a)pireno	0,36	0,17	3,99	47,22
2(a)P	0,0	0,0	1,38	-
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0,20	0,08	4,43	37,50
Pireno	0,07	0,0	1,47	-
Benzo(ghi)perileno	0,24	0,09	2,82	37,50
TOTAL	2.888,62	1.693,19	5.772,58	58,62

*) Pico detectado pero no identificado
 **) HAP con peso molecular 276

1.- **Contenido de HAPs del producto entero.** En la Tabla 1 se observa que se ha identificado un alto número de HAPs (56) que, además, comprende un amplio rango de compuestos. Así, se han encontrado tanto HAPs de bajo peso molecular (naftaleno, fluoreno, fenantreno) como de elevado peso molecular (benzofluoranteno, benzopireno, benzo(ghi)perileno). También cabe destacar la presencia de 32 compuestos alquilados, derivados tanto de HAPs ligeros (naftaleno, fenantreno) como de otros más pesados (pireno, criseno). Cabe señalar que, entre los HAPs identificados, se encuentran algunos considerados probablemente carcinogénicos en humanos por la IARC (International Agency for Research on Cancer), tales como benz(a)antraceno o benzo(a)pireno, y otros posiblemente carcinogénicos, como algunos benzofluoranteno y el indeno(1,2,3-cd)pireno. También se han identificado varios metilcrisenos, pero no se ha detectado 5-metilcriseno, también considerado probablemente carcinogénico por la IARC. En relación a las concentraciones de los HAPs identificados, los valores más altos corresponden a compuestos de 2 y 3 anillos aromáticos, siendo el más abundante el fenantreno. Los HAPs más pesados (5 anillos aromáticos o más) se encuentran en concentraciones muy pequeñas. Hay que señalar que, a pesar de que el chorizo es un producto típico de nuestro país, apenas existen datos relativos a la concentración de HAPs en este producto. García Falcón y colaboradores (3) estudiaron el contenido de benzo(a)pireno en varios productos ahumados españoles y encontraron niveles de 0,12 y 0,34 µg/kg en chorizo, que son del mismo orden que los 0,36 µg/kg encontrados en este estudio. Si se tiene en cuenta que el límite máximo de benzo(a)pireno establecido para alimentos ahumados con aromas de humo es de 0,03 µg/kg, se observa que la concentración en este tipo concreto de producto es 10 veces superior.

2.- **Comparación del contenido de HAPs en los tres tipos de muestras.** En la Tabla 1 se observa que:

- El número de HAPs identificados en las tres muestras es prácticamente el mismo. Únicamente algunos compuestos que se encuentran en concentraciones muy bajas en el producto entero (metilcriseno, benzo(a)fluoranteno y piceo), no se han podido identificar en el interior y, por otra parte, en la piel se ha encontrado un isómero del indeno(1,2,3-cd)pireno y del benzo(ghi)perileno (276) que no había podido ser identificado en las otras muestras.

- Si se observan las concentraciones totales de HAPs en las tres muestras, se puede comprobar que el contenido total de HAPs en el interior del producto es menor que en el producto entero, y que la concentración encontrada en la piel es doble que la de este último. Asimismo, se puede apreciar que las concentraciones individuales de los diferentes compuestos son más bajas en el interior que en el producto entero. Sin embargo, en la piel se observa que, en general, la concentración de casi todos los HAPs, exceptuando los de menor peso molecular, es mayor que en las otras dos muestras.

3.- **Comparación de proporciones de HAPs en los tres tipos de muestras.** En la Figura 2 se han organizado los HAPs en 10 grupos y se han representado las proporciones de cada uno respecto a la concentración total en los tres tipos de muestra. En esta figura puede observarse que, hasta el grupo 8, las proporciones de los compuestos no alquilados (grupos 1, 3, 4, 6 y 8) son algo mayores en el interior del

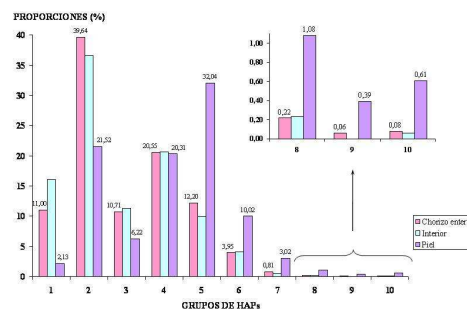


Figura 2. Proporciones de los distintos grupos de HAPs en cada una de las muestras: 1: Naftaleno; 2: Derivados alquilados de naftaleno; 3: Acenftileno+Acenftileno+Fluoreno; 4: Fenantreno+Antraceno; 5: Derivados alquilados del grupo 4; 6: Fluoranteno+Pireno; 7: Derivados alquilados del grupo 6; 8: Benzo(a)antraceno+Criseo+Trifenileno; 9: Derivados alquilados del grupo 8; 10: HAPs con cinco anillos aromáticos o más

Estas observaciones coinciden con las de otros autores (4,5) que también han encontrado que la piel ejerce un efecto de barrera frente a la penetración de algunos HAPs hacia el interior del producto. Sin embargo, hay que señalar que, tal como se puede comprobar en la Tabla 1, la piel no impide totalmente la penetración de HAPs que pueden suponer un riesgo para la salud humana, encontrándose porcentajes de penetración que oscilan entre el 37,50% de indeno(1,2,3-cd)pireno y el 63,98% de benzo(a)antraceno. No obstante, estos valores son inferiores a los encontrados por otros autores en productos embutidos en tripa natural (6).

CONCLUSIONES

- 1.- El chorizo ahumado estudiado presenta un elevado número, así como un amplio rango de HAPs, algunos de ellos con actividad carcinogénica probable en el hombre, si bien las concentraciones de estos últimos son bajas. Se ha encontrado benzo(a)pireno en una concentración 10 veces superior a la permitida en alimentos ahumados con aromas de humo.
- 2.- La piel ejerce un efecto de barrera selectiva sobre el producto, ya que restringe la difusión hacia el interior de los HAPs más pesados y de compuestos alquilados, entre los que se encuentran algunos HAPs con gran actividad carcinogénica, como 5-metilcriseno ó 7,12-dimetilbenzo(a)antraceno, si bien éstos no han sido detectados en estas muestras.
- 3.- Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, sería conveniente evitar el consumo de la piel de los embutidos ahumados como medida para reducir la ingesta de HAPs procedentes de la dieta.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Guillén, M.D., Sopelana, P., Parlesroyro, M.A. (1997) *Rev. Env. Health*, 12: 133-146.
- (2) Oema, E.A., Gray, J.I., Rabie, S., Lopez-Bote, C., Booren, A.M. (1993) *Food Addit. Contam.*, 10: 503-521.
- (3) García Falcón, M.S.; González Amigo, S.; Lage Tusty, M.A.; Simal Lozano, J. (1999) *Food Addit. Contam.*, 16: 9-14.
- (4) Engst, R., Fritz, W. (1977) *Acta Aliment. Pol.*, 3: 255-267.
- (5) Simon, S.; Rypinski, A.A.; Tauber, F.W.; Pencyla, R.M.; Westerberg, D.O. (1969) *J. Agric. Food Chem.*, 17: 1128-1134.
- (6) Filipovic, J.; Toth, L. (1971) *Fleischwirtschaftl.*, 51: 1323-1325.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación concedida por el MCYT (AGL2000-1696), por el MAPA (CAL00-654-C-2) y por la Universidad del País Vasco (UPV-101.123 EB08799 y 90UPV 0010.125.13667/2001). G. Palencia agradece a la Universidad del País Vasco la concesión de una beca predoctoral.

III CONGRESO ESPAÑOL DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS (CESIA 2004).

Una Comunicación en forma de Póster, y un Artículo publicado en el Libro de Actas del congreso.

-M^a Dolores Guillén, M. L. Ibargoitia, Patricia Sopelana, Begoña Abascal, Gemma Palencia y Marichu Fresno. “Algunos de los efectos del ahumado en la manufactura del queso ahumado con humo o con aromas de humo”.

ALGUNOS DE LOS EFECTOS DEL AHUMADO EN LA MANUFACTURA DEL QUESO. AHUMADO CON HUMO O CON AROMAS DE HUMO

Guillén M.D.*, Ibargoitia M.L., Sopelana P., Abascal B., Palencia G. y Fresno M^a.

Tecnología de Alimentos. Facultad de Farmacia. Universidad del País Vasco. Paseo de la Universidad, nº 7, 01006 Vitoria (Alava). Teléfono: 945 013081; Fax: 945 013014; E-mail: knpgulod@vf.ehu.es. ^a Instituto Canario de Investigaciones Agrarias

El proceso de ahumado es uno de los más antiguos empleados por el hombre para conservar alimentos, y enriquecerlos en notas aromáticas. Por esta razón, el humo ha sido considerado por algunos como la primera especia utilizada por el hombre.

Uno de los productos alimenticios que tradicionalmente se viene sometiendo al proceso de ahumado es el queso. Éste, al igual que cualquier otro alimento, se puede ahumar mediante humo natural o mediante aromas de humo, aunque este segundo tipo de procesado está prohibido en España por la legislación española.

En trabajos previos hemos estudiado la composición de aromas de humo, los componentes volátiles y menos volátiles de alimentos ahumados, así como la contaminación por HAPs en alimentos ahumados. En esta comunicación se comparan los efectos que el ahumado tradicional provoca en queso fresco de cabra con los que el ahumado mediante aromas de humo puede provocar en quesos experimentales en relación con el color, con la concentración de componentes responsables del sabor y olor, así como en relación al nivel de contaminación adquirida como consecuencia del ahumado. Se estudian quesos Palmeros, amparados por la Denominación de Origen de queso Palmero, ahumados por métodos tradicionales, con quesos experimentales ahumados con aromas de humo de composición variada.

En los quesos ahumados por métodos tradicionales se producen inevitablemente cambios en el color, que son la manifestación externa de otros cambios más profundos producidos por reacciones químicas; mientras que en los quesos ahumados con aromas de humo los cambios de color dependen del aroma de humo empleado, pudiéndose producir quesos con sabor y olor a humo sin que su color se diferencie del de quesos no ahumados. En

relación con los cambios en sabor y olor, ambos procedimientos permiten controlar estos atributos, si bien este control se puede ejercer de forma más efectiva y homogénea cuando se emplean aromas de humo. El grado de contaminación por HAPs se puede controlar mejor cuando se ahuma con aromas de humo.

ALGUNOS DE LOS EFECTOS DEL AHUMADO EN LA MANUFACTURA DEL QUESO. AHUMADO CON HUMO O CON AROMAS DE HUMO

Guillén M.D.*, Ibargoitia M.L., Sopelana P., Abascal B., Palencia G. y Fresno M^a.

Tecnología de Alimentos. Facultad de Farmacia. Universidad del País Vasco. Paseo de la Universidad, nº 7, 01006 Vitoria (Alava). Teléfono: 945 013081; Fax: 945 013014; E-mail: knpgulod@vf.ehu.es. ^a Instituto Canario de Investigaciones Agrarias

Palabras clave: Color, sabor, aroma, componentes volátiles y semivolátiles, hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Resumen. Se comparan los efectos que provocan en el queso dos procesos de ahumado diferentes, el ahumado tradicional con humo y el ahumado con aromas de humo, este último prohibido por ley en España. Se ofrece una visión de los cambios que se producen en características tales como color, aspecto externo, sabor y olor, así como en la composición del espacio de cabeza, y en el grado de contaminación por hidrocarburos aromáticos policíclicos de quesos sometidos a ambos tipos de ahumado, haciendo especial hincapié en estos dos últimos aspectos.

INTRODUCCIÓN

El ahumado es uno de los procesos más antiguos de conservación de alimentos, que además los enriquece en notas aromáticas; por esta razón, ha sido considerado por algunos como la primera especia utilizada por el hombre. En nuestros días, el ahumado se sigue empleando, fundamentalmente, por las propiedades sensoriales que proporciona a los alimentos; no obstante, este proceso sigue manteniendo sus funciones de ampliar la vida útil de los mismos (Möhler, 1982; Maga, 1988; Girard, 1991).

A pesar de que el ahumado de alimentos es una práctica muy antigua, hasta tiempos recientes no se ha podido profundizar en las bases científicas sobre las que se asientan los distintos cambios que este proceso provoca en el alimento.

El proceso de ahumado consta de una primera etapa en la que se genera el humo y de una segunda etapa en la que el humo se aplica al alimento. En algunos procesos artesanales de ahumado no hay separación entre estas dos etapas. Sin embargo, en los procesos industriales, ambas etapas pueden diferenciarse, ya que en algunos casos el humo puede ser sometido a procesos de purificación o de ionización antes de ser aplicado al alimento. El caso extremo de separación entre producción del humo y aplicación de éste al alimento lo constituye el ahumado con aromas de humo. Los aromas de humo los define la legislación como extractos de humo utilizados en los procedimientos tradicionales de ahumado de los productos alimenticios (Directiva 88/388/CEE); a esta definición, en diciembre de 2003, se ha añadido que también son aromas de humo los condensados primarios de humo y las fracciones primarias de alquitrán, así como otros posibles aromas derivados de éstos (Reglamento CE nº 2065/2003 del Parlamento Europeo). En este caso, la generación del humo está totalmente alejada, tanto en el tiempo como en el espacio, de la aplicación de los componentes del humo al alimento.

Uno de los productos alimenticios que tradicionalmente se viene sometiendo al proceso de ahumado es el queso. Éste, al igual que cualquier otro alimento, se puede ahumar mediante humo natural o mediante aromas de humo, aunque este segundo tipo de procesado está prohibido en España por ley (Orden de 29 de noviembre de 1985). El ahumado con aromas de humo ofrece múltiples ventajas frente al ahumado tradicional en cuanto a versatilidad de aplicación, homogeneidad del producto acabado, ahorro económico y de instalaciones, reducción de emisiones a la atmósfera, etc.; sin embargo todavía no se han estudiado en profundidad los cambios que provoca en los alimentos.

En trabajos previos hemos estudiado la composición de aromas de humo comerciales y de otros obtenidos a escala de laboratorio (Guillén et al., 1995; Guillén y Manzanos, 1996; Guillén e Ibargoitia, 1996, 1998), así como su grado de contaminación por hidrocarburos aromáticos policíclicos (Guillén et al., 2000a,b). En este trabajo se comparan los efectos que el ahumado mediante humo o mediante aromas de humo provoca en características del queso tales como color, aspecto externo, olor y sabor; además, se comparan los cambios que se

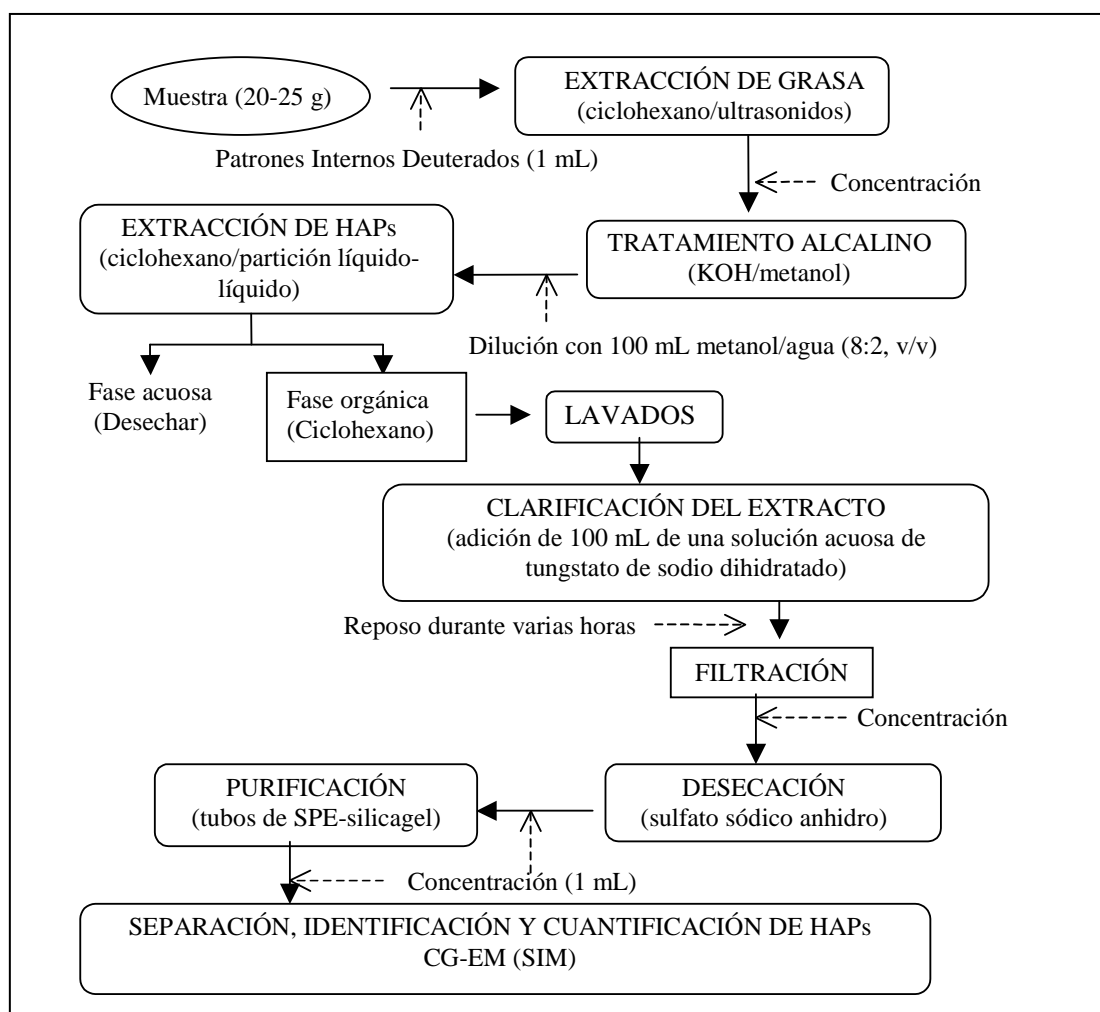
producen en su espacio de cabeza, así como en su grado de contaminación por hidrocarburos aromáticos policíclicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales. Los quesos estudiados son de varios tipos. Uno de ellos es queso de cabra fresco, elaborado artesanalmente en la Isla de la Palma, que puede ser ahumado con cuatro tipos de materia vegetal diferente (*hoja de pino, madera de pino, penca de tunera y cáscara de almendra*), tal y como viene recogido en la Denominación de Origen Palmero (Orden de 31 de agosto de 2001); de este tipo de queso se estudiaron muestras ahumadas con cada uno de los cuatro materiales citados. También se estudiaron quesos experimentales, de tipo curado, elaborados con una mezcla de leche de oveja y vaca pasteurizada, que se ahumaron por inmersión en cuatro aromas de humo líquidos diferentes de composición previamente estudiada (Guillén et al., 1995; Guillén y Manzanos, 1996; Guillén e Ibargoitia, 1998). Además, en relación con la contaminación por hidrocarburos aromáticos policíclicos, el estudio se ha ampliado a otros quesos ahumados por métodos tradicionales, todos ellos adquiridos en supermercados locales.

Métodos. El análisis del aspecto externo, color, sabor y olor lo realizaron paneles entrenados. El estudio de los componentes volátiles y semivolátiles del queso implica: la generación del espacio de cabeza estático de 1 g de queso en un vial cerrado a 50°C; captación de los componentes del espacio de cabeza mediante microextracción en fase sólida (SPME) durante 60 minutos con fibras de distinta naturaleza; desorción de los componentes retenidos en la fibra en el inyector de un cromatógrafo de gases con detector de espectrometría de masas donde se separan, cuantifican e identifican los componentes extraídos. El estudio cromatográfico se realizó como en trabajos previos (Guillén y Errecalde, 2002).

La determinación de la potencial contaminación por hidrocarburos aromáticos policíclicos se llevó a cabo siguiendo la metodología indicada en el Esquema 1, tal y como se ha detallado previamente (Guillén y Sopelana, 2004).



Esquema 1. Metodología seguida para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en quesos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Color y Aspecto Externo. Tanto el color como el aspecto externo del queso influyen en la decisión del consumidor, ya que se produce la inevitable asociación de estas características con determinadas sensaciones que permanecen en la memoria sensorial. *El ahumado tradicional provoca un cambio de color en el queso que implica un oscurecimiento del mismo.* Se ha comentado que el desarrollo del color en los quesos ahumados se debe a varios factores, entre los que se pueden citar: depósito de algunos componentes del humo que poseen

color, así como de compuestos coloreados que se generan por procesos de oxidación o polimerización de componentes del humo (Möhler, 1982; Tóth y Potthast, 1984); formación de compuestos pardos que se generan tanto en reacciones de tipo Maillard entre componentes del humo que soportan grupos carbonílicos y grupos amina de proteínas y aminoácidos del queso (Ruiter, 1979; Gilbert y Knowles, 1975; Hollenbeck, 1994), como en otros tipos de reacciones.

Como consecuencia del ahumado tradicional, el queso adquiere color oscuro, generalmente homogéneo, cuya intensidad es función del grado de ahumado. Además, el ahumado tradicional puede ser aprovechado para que al queso adquiriera características específicas de apariencia externa que lo diferencian de otros. Éste es el caso del queso Palmero que se ahuma soportado en rejillas (Fresno et al., 2002), lo que da lugar a que sobre su superficie se generen bandas oscuras y claras, que constituyen una característica distintiva de este queso, recogida en el Reglamento de la Denominación de Origen.

Sin embargo, en el ahumado con aromas de humo, el desarrollo del color depende del aroma de humo empleado. Los aromas de humo líquidos que contienen todos los tipos de componentes que hay en el humo y en proporciones parecidas a las que se encuentran en éste, provocan modificaciones más o menos intensas del color en la corteza del queso dependiendo de la concentración de los componentes del humo en el aroma; en este sentido, los condensados modifican sensiblemente el color del queso. Los aromas de humo constituidos solamente por derivados fenólicos apenas provocan cambios en el color del queso debido a la ausencia de derivados carbonílicos, que son los que pueden dar lugar a reacciones similares a la de Maillard y generar melanoidinas pardas. También se ha comentado que algunos derivados fenólicos de muy elevado peso molecular pueden reaccionar con las proteínas para dar lugar a compuestos pardos; no obstante, esos derivados fenólicos no son muy frecuentes en aromas de humo.

Olor y Sabor. El olor del queso ahumado lo proporcionan todos aquellos componentes aromáticos volátiles que escapan del mismo en concentración suficiente para ser percibida por los receptores del olor. El sabor se define como el conjunto de impresiones olfativas y gustativas que aparecen en el momento del consumo del alimento. El sabor, así entendido, es una sensación global, producida tanto por las sustancias que interaccionan con los receptores del gusto como con los del olfato, y que incluyen tanto a componentes propios y específicos de cada queso como a componentes del humo que simplemente se han adherido al queso, y a otros potenciales componentes que hayan podido surgir de reacciones entre componentes del humo y del queso. Al sabor del queso ahumado se considera que contribuyen los componentes que contribuyen al olor y, además, otros componentes que probablemente no escapan de la matriz del queso a la fase gas, pero unos y otros se deben encontrar en concentraciones por encima de su concentración umbral en dicha matriz.

Tanto el sabor como el olor del queso Palmero fue juzgado como muy agradable por el panel de cata y su aceptabilidad viene avalada por los al menos seis siglos, de los que se tiene constancia escrita, de tradición en su elaboración. En términos genéricos, las preferencias se centraron en aquellos quesos que presentaban un grado de ahumado y un nivel de lipólisis intermedios.

Al olor y sabor de los quesos ahumados con aromas de humo contribuirán los componentes específicos del queso y los que se generen o se adicionen como consecuencia de la inmersión del queso en el aroma de humo. También el olor y sabor de los quesos ahumados con aromas de humo han sido juzgados como agradables por el panel de cata, si bien con unas notas a humo mucho más ligeras que los ahumados por métodos tradicionales; no obstante, hay que señalar que la intensidad de las notas a humo se puede incrementar prolongando el tiempo de ahumado o aumentando la concentración de los componentes aromáticos en el aroma.

Componentes del Espacio de Cabeza. El espacio de cabeza de los quesos ahumados, como hemos comentado anteriormente, está constituido por los componentes que escapan de la

matriz del queso y pasan a formar parte de la fase gaseosa que lo envuelve, y de él forman parte tanto componentes aromáticos como no aromáticos.

El espacio de cabeza de quesos ahumados por métodos tradicionales lo hemos estudiado en distintos quesos entre ellos en quesos Palmeros artesanales ahumados con cuatro tipos de madera diferentes. A pesar de tratarse de un queso fresco, el número de componentes que forma parte de su espacio de cabeza es muy elevado. Se detectaron más de trescientos compuestos; entre los que se pueden citar: ácidos, alcoholes, ésteres, hidrocarburos, aldehídos, cetonas, derivados de furano y de pirano, terpenos y sesquiterpenos, derivados nitrogenados, fenol, guayacol, siringol y derivados de éstos, éteres, y otros. Sin embargo los mayoritarios son los ácidos y los componentes del humo, y las diferencias más marcadas entre los quesos ahumados con el mismo tipo de madera se deben precisamente a las concentraciones en que se encuentran estos dos grupos de componentes o, lo que es lo mismo, al grado de lipólisis sufrida por cada queso y a la intensidad del proceso de ahumado (Guillén et al., 2004; Guillén y Sopelana, 2004).

En la Figura 1 se muestran los cromatogramas de los componentes extraídos mediante SPME del espacio de cabeza estático de distintos quesos Palmeros ahumados con humo obtenido de hoja de pino. Puede observarse que las mayores diferencias se detectan en las concentraciones de los picos anchos, que se deben a ácidos y se encuentran en concentraciones muy elevadas en el queso A2, y en las concentraciones del resto de picos con alturas significantes, la mayoría de los cuales corresponden a los componentes comunes a todos los tipos de humo; estos últimos se encuentran en concentraciones más elevadas en el queso denominado A4.

Algunos de los olores aportados por los ácidos desde cuatro a doce átomos de carbono se han descrito como a rancio, a cabra o a oveja (Molimard y Spinnler, 1996), y las notas aportadas por algunos componentes del humo se han descrito como: picantes y cresólicas las que aportan fenol y alquil-fenol derivados (Kim et al., 1974); dulces y a humo las que aportan

guayacol y derivados; a humo, a quemado las que aportan siringol y derivados; a dulce, a quemado, a caramelo las notas que aportan ciclopentanodionas, furanonas; agradables, dulces, a flores las notas de algunos derivados de furano tales como 2-furancarboxaldehído, 5-metil-2-furancarboxaldehído y acetilfurano; y a hierba las de algunas ciclopentanonas (Baltes et al., 1981; Tóth y Potthast, 1984).

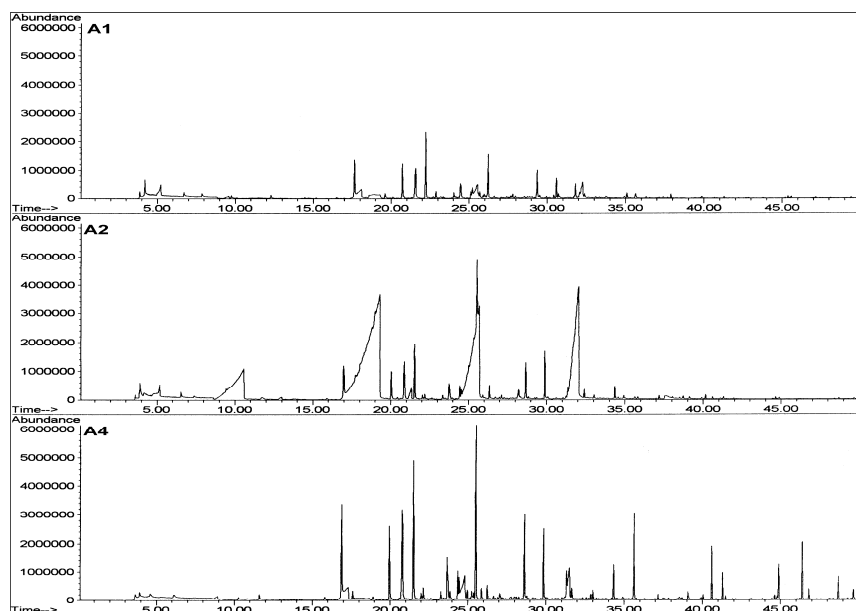


Figura 1. Cromatogramas de los componentes extraídos del espacio de cabeza de la zona exterior de distintos quesos Palmeros (A1, A2 y A4) ahumados con humo procedente de un mismo tipo de madera.

Entre quesos Palmeros artesanos ahumados con humo procedente de distintas maderas las variaciones en los espacios de cabeza se deben, además de a las diferencias anteriormente comentadas, a las características específicas del humo que genera cada tipo de madera. En relación a este último aspecto, las diferencias se manifiestan por la presencia o ausencia de determinados terpenos o sesquiterpenos típicos de algunas de las maderas empleadas, así como en las proporciones relativas de los componentes considerados comunes a todos los tipos de humo.

El espacio de cabeza de los quesos ahumados con aromas de humo, al igual que los ahumados por métodos tradicionales, contienen componentes típicos de queso y componentes

típicos de humo, si bien, en este caso tanto el número de componentes de humo detectados como sus concentraciones son muy inferiores a los encontrados en los quesos Palmeros ahumados por métodos tradicionales. Esto tiene como consecuencia que los quesos ahumados con aromas de humo presentan unas notas a humo mucho más suaves que los ahumados por métodos tradicionales, pero se pueden intensificar si se desea. Se ha observado que, a pesar de que todos los aromas de humo aportan al queso componentes típicos de humo, cada uno de ellos aporta otras características específicas debidas a que este proceso de ahumado favorece o dificulta ciertos procesos que dan lugar a la formación de algunos de los componentes típicos de queso. Así, todos los aromas provocan un incremento en el espacio de cabeza de hidrocarburos monoaromáticos y el mayor se ha observado con aromas de humo líquido donde los componentes típicos de humo se encuentran en bajas concentraciones. Todos los aromas provocan un incremento en la concentración de ácidos en el espacio de cabeza del queso ahumado en relación con el queso sin ahumar; este efecto es más pronunciado en los quesos ahumados con condensados de humo; estos condensados provocan asimismo un incremento en las proporciones de alcoholes en relación con el queso sin ahumar. Por esta razón, se puede entender que sean los quesos ahumados con condensados de humo los que muestren un incremento importante en la concentración de ésteres, mientras que los otros aromas provocan el efecto contrario, es decir dificultan la formación de ésteres en relación con el queso sin ahumar. En todos los casos, el ahumado con aromas de humo impide la formación de aldehidos, y su efecto sobre la formación de cetonas es específico de cada aroma. En resumen, puede decirse que, además de aportar componentes de humo, el ahumado con aromas de humo contribuye a modificar el espacio de cabeza del queso con variaciones específicas asociadas a cada aroma, que son dependientes de la composición del mismo.

Grado de Contaminación por Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos se generan en procesos de combustión y pirólisis de materiales orgánicos y pueden llegar a los alimentos por vías muy diversas. Todos ellos son eminentemente lipofílicos, si bien los de menor peso molecular son algo solubles en agua; por

esta razón, tienen tendencia a mezclarse con los lípidos alimentarios, de donde es muy difícil aislarlos. A pesar de que hasta hace poco tiempo se había extendido la idea de que todos los alimentos ahumados eran sospechosos de estar contaminados por este tipo de contaminantes, y a pesar del elevado porcentaje de grasa en quesos, han sido muy pocos los trabajos publicados dirigidos a determinar la concentración de este tipo de contaminantes en quesos ahumados.

Los resultados obtenidos en relación con la contaminación por hidrocarburos aromáticos policíclicos en quesos ahumados de forma tradicional han puesto de manifiesto que, si el proceso de ahumado se lleva a cabo de forma adecuada, se pueden obtener quesos con concentraciones muy bajas de estos contaminantes en corteza y, por lo tanto, mucho menores todavía en el interior del queso.

De los numerosos quesos estudiados, ninguno de ellos alcanza los niveles máximos permitidos por la legislación española, que se concretan en 10 µg de benzo(a)pireno por Kg en corteza de queso (Orden de 29 de noviembre de 1985); no obstante hay que señalar que esta Norma permite niveles muy altos de benzo(a)pireno en relación con la Norma sobre alimentos ahumados con aromas de humo (Reglamento CE nº 2065/2003 del Parlamento Europeo).

En la Tabla 1 se muestran las concentraciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos correspondientes a los quesos ahumados con humo, QH1 y QH2, que son los que presentan la mayor y menor contaminación entre todos los estudiados (14 tipos diferentes).

En cuanto a los quesos ahumados con aromas de humo, el grado de contaminación vendrá determinado por los hidrocarburos que puedan aportar los aromas, cuyos niveles se pueden conocer con precisión antes del ahumado, y por los que posea el queso. Hay que recordar que el queso es un producto con una elevada proporción de grasa en cuya elaboración se necesitan cantidades importantes de leche, por lo que los contaminantes lipofílicos que pueda contener la leche aparecerán concentrados en el queso. En la Tabla 1 se muestran las concentraciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos correspondientes a los quesos ahumados con aromas de humo, QAH1 y QAH2, que son los que presentan la mayor y menor contaminación entre

todos los estudiados (4 tipos diferentes). Hay que destacar que la legislación vigente en Europa y en España limita la concentración de benzo(a)pireno a 0,03µg/Kg (Directiva 88/388/CEE), es decir, los límites establecidos para alimentos ahumados con aromas de humo son mucho más exigentes que para los alimentos ahumados con humo.

Tabla 1. Concentraciones máximas y mínimas de algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos detectados en la zona externa de *quesos ahumados con humo* (QH1 y QH2) y *con aromas de humo* (QAH1 y QAH2). Los valores, en µg/Kg, vienen dados como valor medio ± desviación estándar.

Compuesto	QH1	QH2	QAH1	QAH2
Naftaleno ¹	232,7±12,1	9,3±0,4	46,6±3,5	55,2±12,0
2-Metilnaftaleno	245,3±1,7	5,3±0,4	16,2±1,2	18,4±5,6
1-Metilnaftaleno	173,3±0,2	3,1±0,1	10,4±0,8	10,8±3,3
2,6-Dimetilnaftaleno	257,9±3,7	2,5±0,1	19,5±1,0	17,7±3,6
1,7-Dimetilnaftaleno	247,3±6,5	2,3±0,0	20,2±0,2	16,8±3,3
1,6-Dimetilnaftaleno	233,7±5,6	2,0±0,1	15,7±0,6	13,4±2,6
1,4-+2,3-Dimetilnaftaleno	90,0±2,2	--	9,8±1,0	7,3±2,1
1,5-Dimetilnaftaleno	55,3±1,9	0,7±0,3	3,6±0,0	3,3±0,9
Acenaftileno	68,6±5,3	0,4±0,0	9,8±1,5	1,9±0,0
Acenafteno	20,6±0,8	0,3±0,0	1,9±0,5	1,1±0,0
Fluoreno	65,6±2,2	0,8±0,0	11,8±1,5	3,8±0,0
Fenantreno	105,3±4,3	1,9±0,0	27,2±2,5	3,5±0,3
Antraceno	23,0±0,5	0,1±0,0	--	--
3-Metilfenantreno	20,8±0,5	0,7±0,1	4,8±0,4	1,5±0,0
2-Metilfenantreno	26,3±0,9	0,9±0,0	5,5±0,4	1,5±0,0
2-Metilantraceno	13,2±0,3	--	3,0±0,2	2,1±0,0
9-Metilfenantreno	20,2±0,5	0,7±0,0	--	--
1-Metilfenantreno	18,8±0,4	0,5±0,0	4,8±0,4	1,1±0,0
Dimetilfenantreno o isómero	4,5±0,7	--	0,8±0,1	--
Dimetilfenantreno o isómero	4,4±0,6	0,3±0,0	0,7±0,4	--
Dimetilfenantreno o isómero	2,1±0,3	0,2±0,0	2,1±0,5	1,4±0,0
Dimetilfenantreno o isómero	3,2±0,7	--	1,5±0,3	0,7±0,0
Dimetilfenantreno o isómero	8,1±1,0	0,8±0,0	2,8±0,4	0,6±0,0
Dimetilfenantreno o isómero	8,4±1,1	0,5±0,1	--	--
Dimetilfenantreno o isómero	8,9±1,2	0,4±0,0	--	--
<i>o</i> -Terfenilo	4,1±0,3	0,8±0,1	0,5±0,2	0,4±0,0
Fluoranteno	13,5±0,1	0,4±0,0	3,7±0,3	0,5±0,0
Pireno	12,8±0,3	0,8±0,0	3,5±0,2	0,7±0,0
2-Metilfluoranteno	1,1±0,0	--	0,4±0,0	--
Metilfluoranteno o isómero	1,0±0,0	--	0,4±0,0	--
Metilfluoranteno o isómero	1,2±0,0	--	0,3±0,0	--
Metilfluoranteno o isómero	1,8±0,0	<0,1	0,4±0,2	--
Metilfluoranteno o isómero	2,4±0,0	0,1±0,0	0,4±0,0	--

Tabla 1. (continuación)

Compuesto	QH1	QH2	QAH1	QAH2
1-Metilpireno	2,1±0,0	<0,1	0,5±0,0	0,1±0,0
11H-Benzo(b)fluoreno	1,7±0,0	--	0,4±0,0	--
11H-Benzo(c)fluoreno	0,9±0,0	--	0,3±0,0	--
<i>m</i> -Terfenilo	0,9±0,0	0,3±0,0	0,2±0,0	0,2±0,0
<i>p</i> -Terfenilo	0,2±0,0	0,1±0,0	--	--
Benzo(a)antraceno ¹	2,0±0,0	0,1±0,0	0,5±0,0	--
Criseno + Trifenileno	2,3±0,0	0,1±0,0	0,8±0,0	0,4±0,0
Benzo(b)fluoranteno ¹	0,6±0,0	--	0,1±0,0	--
Benzo(j+k)fluorantenos ¹	0,9±0,0	--	0,2±0,1	--
Benzo(a)pireno ¹	0,8±0,0	--	0,2±0,0	--
Indeno(1,2,3-cd)pireno ¹	0,6±0,0	--	0,1±0,0	--
Benzo(ghi)perileno	0,5±0,0	<0,1	--	--
TOTAL	2.238,5	36,3	236,8	165,0

¹ Compuesto con cierto grado de carcinogenicidad de acuerdo con la clasificación de la International Agency for Research on Cancer (IARC, 1973, 1983)

CONCLUSIONES

El ahumado mediante aromas de humo permite aportar notas aromáticas de humo al queso pudiéndose modificar o no el color de éste empleando el aroma de humo adecuado para ello.

El ahumado tradicional implica siempre modificación del color del queso pero permite diseñar exteriores de quesos con características distintivas como en el queso Palmero artesanal. Tanto los quesos ahumados con la técnica tradicional como con aromas de humo tienen un olor y un sabor que han sido juzgados como agradables por los paneles sensoriales, siendo más tenues las notas a humo en los quesos ahumados con aromas de humo; no obstante, en éstos últimos, la intensidad de estas notas se puede aumentar y regular a voluntad, de forma mucho mas controlada que en el ahumado tradicional. Ambos procesos de ahumado modifican la composición del espacio de cabeza de los quesos; hay que destacar que no se han detectado componentes en el espacio de cabeza de los quesos ahumados con aromas que no hayan sido detectados en los quesos ahumados por métodos tradicionales. Por esta razón la prohibición por ley en España de ahumar quesos con aromas de humo debe estar basada en razones no relacionadas con los cambios que se producen en el espacio de cabeza

del queso. Las concentraciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos encontradas en los quesos ahumados por ambos métodos no exceden los límites legales establecidos pero parece necesaria una armonización de la legislación en relación a las concentraciones permitidas de estos contaminantes en alimentos en general.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (Proyectos MCYT, AGL2003-01838 y CAL02-075-C3-2) y por la Universidad del País Vasco (9/UPV 00101.125.13667/2001). G. Palencia agradece a la Universidad del País Vasco la concesión de una beca predoctoral.

BIBLIOGRAFIA

- Baltes, W.; Wittkowski, R.; Sochtig, I.; Block, H. y Tóth, L. (1981). En *The Quality of Food and Beverages*, Eds. Charalambous G. e Inglett, G., Academic Press, New York.
- Directiva 88/388/CEE del Consejo de 22 de junio de 1988 (*Diario Oficial n° L 184* del 15/07/1988).
- Fresno, M.; Álvarez, S.; Darmanin, N.; Batista, P. y Pino, V. (2002). *Alimentación, Equipos y Tecnología*, **173**, 87-92.
- Gilbert, J. y Knowles, M. (1975). *J. Food Technol.*, **10**, 245-261.
- Girard, J. P. (1991). En *Tecnología de la Carne y de los Productos Cárnicos*, Acribia, Zaragoza.
- Guillén, M. D. e Ibargoitia, M. L. (1996). *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 1302-1307.
- Guillén, M. D. e Ibargoitia, M. L. (1998). *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 1276-1285.
- Guillén, M. D. y Errecalde, M. C. (2002). *J. Sci. Food Agric.*, **82**, 945-952.
- Guillén, M. D. y Manzanos, M. J. (1996). *Adv. Food Sci.*, **18**, 121-127. Guillén, M. D. y Sopelana, P. (2004). *J. Dairy Sci.*, **87**, 556-564.

- Guillén, M. D.; Ibargoitia, M. L.; Sopelana, P.; Palencia, G. y Fresno, M. (2004). *J. Dairy Sci.*, **87**, 284-299.
- Guillén, M. D.; Manzanos, M. J. y Zabala, L. (1995). *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 463-468
- Guillén, M. D.; Sopelana, P. y Partearroyo, M. A. (2000a). *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 126-131.
- Guillén, M. D.; Sopelana, P. y Partearroyo, M. A. (2000b). *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 5083-5087.
- Hollenbeck, C. M. (1994). En *Flavor of meat and meat products*, Ed. Shahidi, F., Chapman & Hall, London.
- IARC (1973). *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans*. Vol. 3, Lyon, France.
- IARC (1983). *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans*. Vol. 32, Lyon, France.
- Kim, K.; Kurata, T. y Fujimaki, M. (1974). *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 53-63.
- Maga, J. A. (1988). *Smoke in Food Processing*, CRC Press: Boca Raton, Florida.
- Möhler, K. (1982). *El ahumado*, Acribia, Zaragoza.
- Molimard, P. y Spinnler, H. E. (1996). *J. Dairy Sci.*, **79**, 169-184.
- Orden de 29 de noviembre de 1985. (*BOE*, 6 diciembre 1985, núm. 292).
- Orden de 31 de agosto de 2001. (*BOE*, 11 septiembre 2001, núm. 128).
- Reglamento (CE) n° 2065/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo (*Diario Oficial n° L 309 de 26/11/2003*).
- Ruiter, A. (1979). *Food Technol.*, **33**, 54-63.
- Tóth, L. y Potthast, K. (1984). *Adv. Food Res.*, **29**, 87-158.

ALGUNOS DE LOS EFECTOS DEL AHUMADO EN LA MANUFACTURA DEL QUESO. AHUMADO CON HUMO O CON AROMAS DE HUMO

M.D. Guillén^a, M.L. Ibargoitia^a, P. Sopelana^a, B. Abascal^a, G. Palencia^a y M. Fresno^b

^aTecnología de Alimentos, Facultad de Farmacia, UPV

Paseo de la Universidad, 7, 01006 Vitoria. SPAIN

Teléfono: 34-45-013081; Fax: 34-45-013014; E-mail: knpgulod@vf.ehu.es

^bInstituto Canario de Investigaciones Agrarias



INTRODUCCIÓN

El ahumado es uno de los procesos más antiguos de conservación de alimentos, y en nuestros días, se sigue empleando, fundamentalmente, por las propiedades sensoriales que proporciona a los alimentos (1).

El proceso de ahumado consta de una primera etapa en la que se genera el humo y de una segunda etapa en la que el humo se aplica al alimento. En algunos procesos artesanales de ahumado no hay separación entre estas dos etapas. Sin embargo, en los procesos industriales, ambas etapas pueden diferenciarse, ya que, en algunos casos, el humo puede ser sometido a procesos de purificación o de ionización antes de ser aplicado al alimento. El caso extremo de separación entre producción del humo y aplicación de éste al alimento lo constituye el ahumado con aromas de humo.

Uno de los productos alimenticios que tradicionalmente se viene sometiendo al proceso de ahumado es el queso. Éste, al igual que cualquier otro alimento, se puede ahumar mediante humo natural o mediante aromas de humo, si bien este segundo tipo de procesado está prohibido por ley en España (2).

En este trabajo se comparan los efectos que el ahumado mediante humo y mediante aromas de humo provocan en características del queso tales como color, aspecto externo, olor y sabor; además, se comparan los cambios que se producen en su espacio de cabeza, así como en su grado de contaminación por hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs).

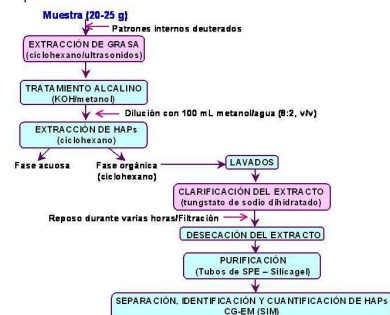
MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras:

- **Queso de cabra fresco**, elaborado artesanalmente en la Isla de la Palma, que puede ser ahumado con cuatro tipos de materia vegetal diferente (hoja de pino, madera de pino, penca de tunera y cáscara de almendra), tal y como viene recogido en la Denominación de Origen Palmero (3).
- **Quesos experimentales**, de tipo curado, elaborados con una mezcla de leche pasteurizada de oveja y vaca, y ahumados por inmersión en cuatro aromas de humo líquidos diferentes de composición previamente estudiada.
- **Quesos ahumados por métodos tradicionales**, adquiridos en supermercados locales.

Métodos:

- **Aspecto externo**, color, sabor y olor → Paneles de catadores entrenados
- **Componentes volátiles y semivolátiles del queso**
Microextracción en fase sólida (SPME) → Cromatografía de gases-Espectrometría de masas (Fibra poliacrilato, 85 µm, 50 °C, 60 minutos) (CG-EM)
- **HAPs** → Esquema 1



Esquema 1. Metodología seguida para la determinación de HAPs en quesos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Color y Aspecto Externo: El ahumado tradicional confiere al queso un color oscuro, generalmente homogéneo, cuya intensidad es función del grado de ahumado. Además, este tipo de ahumado puede ser aprovechado para que al queso adquiera características específicas de apariencia externa, tales como las bandas oscuras y claras que presenta el queso Palmero que se ahuma soportado en rejillas (4) (Figura 1).

Por otra parte, tal como se observa en la Figura 2, el color de los quesos ahumados con aromas de humo líquidos puede variar sensiblemente de unos a otros. Así, los aromas que contienen todos los tipos de componentes que hay en el humo y en proporciones parecidas a las que se encuentran en éste, provocan modificaciones más o menos intensas del color en la corteza del queso dependiendo de la concentración de los componentes del humo en el aroma. Sin embargo, otros aromas de humo no provocan cambio alguno en el color del queso.

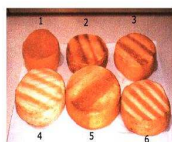


Figura 1. Quesos Palmeros ahumados por el método tradicional.



Figura 2. Quesos ahumados con aromas de humo.

Olor y Sabor: Tanto el sabor como el olor del queso Palmero fueron juzgados como muy agradables por el panel de cata. Las preferencias se centraron en aquellos quesos que presentaban un grado de ahumado y un nivel de lipólisis intermedios. También el olor y sabor de los quesos ahumados con aromas de humo fueron calificados como agradables por el panel de cata, si bien con unas notas a humo mucho más ligeras que los ahumados por métodos tradicionales.

Componentes del Espacio de Cabeza: En la Figura 3 se muestran los cromatogramas de los componentes extraídos mediante SPME del espacio de cabeza estático de distintos quesos Palmeros ahumados con humo obtenido de hoja de pino.

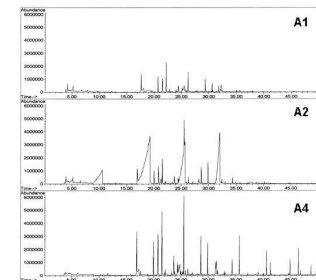


Figura 3. Cromatogramas de los componentes, extraídos mediante SPME, del espacio de cabeza de la zona exterior de distintos quesos Palmeros (A1, A2 y A4) ahumados con humo obtenido de hoja de pino.

Las mayores diferencias se observan en los picos anchos, que se deben a ácidos y se encuentran en concentraciones muy elevadas en el queso A2, y en las concentraciones del resto de picos con alturas significativas, la mayoría de los cuales corresponden a los componentes comunes a los otros tipos de humo; estos últimos se encuentran en concentraciones más elevadas en el queso denominado A4.

El espacio de cabeza de los quesos ahumados con aromas de humo, al igual que los ahumados por métodos tradicionales, contienen componentes típicos de queso y componentes típicos de humo, si bien, en este caso tanto el número de componentes de humo detectados como sus concentraciones son muy inferiores a los encontrados en los quesos Palmeros ahumados por métodos tradicionales.

Grado de Contaminación por HAPs: En la Tabla 1 se muestran las concentraciones de HAPs correspondientes a los quesos que presentan la mayor y menor contaminación entre los ahumados con humo, QH1 y QH2, y entre los ahumados con aromas de humo, QAH1 y QAH2.

Tabla 1. Concentraciones máximas y mínimas de algunos HAPs detectados en la zona externa de quesos ahumados con humo (QH1 y QH2) y con aromas de humo (QAH1 y QAH2), en µg/Kg.

HAP	QH1	QH2	QAH1	QAH2
Naftaleno ¹	232,7 ± 12,1	9,3 ± 0,4	46,6 ± 3,5	55,2 ± 12,0
Metilnaftalenos	418,6	8,4	26,6	29,2
Dimetilnaftalenos	884,2	7,5	68,8	58,5
Acenafiteno	68,6 ± 5,3	0,4 ± 0,0	9,8 ± 1,5	1,9 ± 0,0
Acenafteno	20,6 ± 0,8	0,3 ± 0,0	1,9 ± 0,5	1,1 ± 0,0
Fluoreno	65,6 ± 2,2	0,8 ± 0,0	11,8 ± 1,5	3,8 ± 0,0
Fenantreno	105,3 ± 4,3	1,9 ± 0,0	27,2 ± 2,5	3,5 ± 0,3
Antraceno	23,0 ± 0,5	0,1 ± 0,0	--	--
Metil-fenantrenos-antracenos	99,3	2,8	18,1	6,2
Dimetil-fenantrenos o isómeros	39,6	2,2	7,9	2,7
Fluoranteno	13,5 ± 0,1	0,4 ± 0,0	3,7 ± 0,3	0,5 ± 0,0
Pireno	12,8 ± 0,3	0,8 ± 0,0	3,5 ± 0,2	0,7 ± 0,0
Metil-fluorantenos/-pirenos	9,6	0,1	2,4	0,1
Benzo[fluoreno]	2,6	--	0,7	--
Terfenilos	5,2	1,2	0,7	0,6
Benzo[antraceno]	2,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,5 ± 0,0	--
Criseno + Trifenileno	2,3 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,8 ± 0,0	0,4 ± 0,0
Benzo[fluoranteno]	1,5	--	0,3	--
Benzo(a)pireno	0,8 ± 0,0	--	0,2 ± 0,0	--
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0,6 ± 0,0	--	0,1 ± 0,0	--
Benzo(ghi)perileno	0,5 ± 0,0	<0,1	--	--
TOTAL	2.238,5	36,3	236,8	165,0

¹ Compuesto con cierto grado de carcinogenicidad de acuerdo con la clasificación de la International Agency for Research on Cancer (5-7).

En esta tabla puede comprobarse que la concentración de benzo(a)pireno no excede en ningún caso el límite de 10 µg/kg establecido por la legislación española para la corteza de queso (2). En cambio, en QAH1, la concentración de este HAP es superior al máximo de 0,03 µg/kg permitido en otros alimentos tratados con aromas de humo (8).

CONCLUSIONES

- 1.- El ahumado tradicional implica siempre modificación del color del queso; sin embargo, el color de los quesos ahumados con aromas de humo depende de la composición del aroma empleado.
- 2.- Tanto los quesos ahumados con la técnica tradicional como con aromas de humo tienen un olor y un sabor que han sido juzgados como agradables por los paneles de catadores, siendo más tenues las notas a humo en los quesos ahumados con aromas de humo.
- 3.- En el espacio de cabeza de los quesos ahumados con aromas de humo no se han detectado componentes diferentes de los identificados en los ahumados por métodos tradicionales.
- 4.- Las bajas concentraciones de HAPs que pueden presentar los quesos ahumados de forma tradicional ponen de manifiesto que, si el proceso de ahumado se lleva a cabo de forma adecuada, se pueden controlar los niveles de estos contaminantes.
- 5.- A pesar de que las concentraciones de benzo(a)pireno encontradas en los quesos ahumados por ambos métodos no excede el límite legal establecido, parece necesaria una armonización de la legislación en relación a las concentraciones de HAPs permitidas en alimentos en general.

BIBLIOGRAFIA

1. Mags, J. A. (1988). *Smoke in Food Processing*. CRC Press: Boca Raton, Florida.
2. Orden de 29 de noviembre de 1985. (BOE, 6 diciembre 1985, núm. 292).
3. Orden de 31 de agosto de 2001. (BOE, 11 septiembre 2001, núm. 128).
4. Fresno, M., Álvarez, S., Diamante, N., Batista, P. y Pino, Y. (2002). *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 173, 87-92.
5. IARC (1973). *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans*. Vol. 3, Lyon, France.
6. IARC (1983). *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans*. Vol. 32, Lyon, France.
7. IARC (2002). *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans*. Vol. 82, Lyon, France.
8. Directiva 90/386/CEE del Consejo de 22 de junio de 1990 (Diario Oficial n.º L164 del 15/07/1990).

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a financiación concedida por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCYT AGL2003-01838 y CAL02-075-C3-2) y por la Universidad del País Vasco (9/UPV 00101.125.1366/2001). G. Palencia agradece a la Universidad del País Vasco la concesión de una beca predoctoral.

3rd EURO FED LIPID CONGRESS, 2004.

Una Comunicación en forma de Póster.

M^a Dolores Guillén, Patricia Sopelana y Gemma Palencia. “Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in edible vegetable oils”.

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in edible vegetable oils

M.D. Guillén, P. Sopelana and G. Palencia

Tecnología de alimentos; Facultad de Farmacia; Paseo de la Universidad, 7
01006-Vitoria, Spain

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) constitute a group of contaminants which are widespread in the environment and also in foods (1). Although much attention has been paid to smoked products because large amounts of PAHs have been traditionally associated with them, there are other foodstuffs which make a greater contribution to the total of PAHs ingested (2, 3). Among these latter, the fat and oil group can be cited, since their lipophilic nature makes them very prone to contamination by PAHs. In this work, different types of common vegetable oils have been studied, in order to determine their PAH contamination degree and discuss the possible influence of the manufacturing process on this contamination. For this purpose, samples of commercial extra virgin olive oil, olive oil, and refined seed oils were selected. The methodology consists basically of the dilution of the sample with hexane, extraction of PAHs with dimethylsulfoxide, back extraction with cyclohexane, clean-up by solid phase extraction tubes and, finally, identification and quantification of PAHs by gas chromatography-mass spectrometry operating in selective ion monitoring (SIM) mode. The results show that all the oils studied present a high number of PAHs with a wide range of molecular weights, especially the refined seed oils. Among those PAHs identified, more than half are alkylated derivatives, which account for a great part of the total PAH concentration in some of the samples. Seed oils have the highest total PAH concentrations, and their PAH profile is somewhat different from that of extra virgin olive oils and olive oils. Although the total PAH concentrations of extra virgin olive oils and olive oils are of the same order, the proportion of heavy PAHs is higher in the latter. Differences have also been found between oils having the same label but coming from different batches. PAHs with varying degrees of carcinogenicity have been identified in all the samples, including benzo(a)pyrene, which has been identified in olive oils and in two of the seed oil samples.

References

- (1) Guillén, M.D.; Sopelana, P.; Partearroyo, M.A. (1997) *Rev. Env. Health* 12: 133-146.
- (2) Dennis, M.J.; Massey, R.C.; McWeeny, D.J.; Knowles, M.E. (1983) *Food Chem. Toxicol.* 21: 569-574.
- (3) De Vos, R.H.; Van Dokkum, W.; Schouten, A.; De Jong-Berkhout, P. (1990) *Food Chem. Toxicol.* 28: 263-268.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support of the MCYT (AGL2003-01838) and of the University of the Basque Country (9/UPV 00101.125.13667/2001). G. Palencia thanks the University of the Basque Country for a predoctoral fellowship.

POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN EDIBLE VEGETABLE OILS



M.D. Guillén*, P. Sopenana and G. Palencia
 Tecnología de Alimentos, Facultad de Farmacia, U.P.V.
 Paseo de la Universidad, 7, 01006 Vitoria, SPAIN
 Phone: 34-45-013081; Fax number: 34-45-013014; E-mail: knpgulod@vf.ehu.es

1. INTRODUCTION

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) constitute a group of contaminants which are widespread in the environment and also in foods (1). Although much attention has been paid to smoked products because large amounts of PAHs have been traditionally associated with them, there are other foodstuffs which can make a greater contribution to the total of PAHs ingested (2). Among these latter, the fat and oil group can be cited, since their lipophilic nature makes them very prone to contamination by PAHs. For this reason, in this work, different types of common vegetable oils purchased from local supermarkets have been studied, in order to determine their PAH contamination degree.

2. SAMPLES

- * **Olive oils** (blends of virgin olive oil and refined olive oil) from three different commercial brands: O1, O2 and O3.
- * **Extra virgin olive oils** from two brands: EV1 and EV2.
- * **Two refined sunflower oils**: SF1 and SF2. In the case of oil SF1, samples from two different batches were studied (SF1-A and SF1-B).
- * **A refined oil from a mixture of seeds**: SM.

4. RESULTS AND DISCUSSION

The PAHs identified in the oils studied and their concentrations, in µg/kg, are given in Table 1. This table shows that a high number of PAHs have been identified, with a wide range of molecular weights. It must be noticed the presence of a high number of alkylated derivatives, both from low molecular weight PAHs (naphthalene, phenanthrene) and from higher molecular weight ones (benz(a)anthracene, chrysene). Some of them deserve special attention due to their carcinogenicity, such as some methyl-derivatives of benz(a)anthracene and chrysene (3).

Table 1. PAHs identified in the different vegetable oils studied, and their concentrations, in µg/kg.

	OLIVE OILS				SEED OILS				
	O1	O2	O3	EV1	EV2	SF1-A	SF1-B	SF2	SM
Naphthalene-alkyl-derivatives	118.43	26.03	96.83	141.80	114.84	1,223.83	182.27	513.70	781.22
Naphthalene ¹	13.94 ± 0.24	9.00 ± 2.84	15.01 ± 1.91	22.86 ± 5.56	12.65 ± 0.44	502.08 ± 12.18	14.90 ± 2.03	75.98 ± 0.38	182.37 ± 0.48
Methylnaphthalenes (2 ²)	22.16	6.68	11.42	28.92	20.18	466.08	32.29	217.83	307.03
Dimethylnaphthalenes (3-6)	83.33	9.35	30.20	89.72	62.11	255.67	136.08	221.94	301.62
Acenaphthylene	1.12 ± 0.01	1.12 ± 0.28	1.63 ± 0.34	1.97 ± 0.08	1.25 ± 0.08	-	-	-	0.50 ± 0.02
Acenaphthene	-	-	0.66 ± 0.04	1.96 ³	1.21 ± 0.21	-	0.85 ⁴	-	-
Fluorene	4.52 ± 0.14	2.02 ± 0.78	6.12 ± 2.69	6.09 ± 0.98	3.66 ± 0.18	149.98 ± 14.55	2.18 ± 0.20	62.46 ± 0.05	124.69 ± 12.71
Phenanthrene-anthracene-alkyl-derivatives	106.88	47.07	43.18	75.38	80.11	62.86	71.21	47.83	62.87
Phenanthrene	25.12 ± 1.86	12.08 ± 2.20	15.32 ± 1.67	23.36 ± 2.58	11.69 ± 1.45	11.89 ± 0.51	8.57 ± 1.57	6.53 ± 0.53	9.34 ± 1.07
Anthracene	1.44 ± 0.03	1.00 ± 0.14	0.56 ± 0.05	0.74 ± 0.11	0.34 ± 0.02	0.80 ± 0.06	-	-	-
Methylphenanthrenes-anthracenes (4-5)	37.30	17.79	13.38	34.77	22.60	27.74	29.41	22.71	21.99
Dimethylphenanthrenes-anthracenes (3-9)	41.73	16.20	13.89	26.51	25.48	22.42	33.23	18.59	22.40
Fluoranthene-pyrene-alkyl-derivatives	18.45	50.83	11.27	9.58	8.81	11.31	5.44	2.45	5.81
Fluoranthene	7.90 ± 0.00	17.25 ± 1.15	5.33 ± 0.11	3.78 ± 0.08	3.19 ± 0.06	5.65 ± 0.19	1.78 ± 0.11	0.73 ± 0.04	1.50 ⁵
Pyrene	7.14 ± 0.14	18.80 ± 0.75	4.35 ± 0.02	4.34 ± 0.11	3.53 ± 0.16	5.65 ± 0.36	1.35 ± 0.11	0.95 ± 0.06	2.13 ± 0.09
Methylfluoranthenes-pyrenes (2-6)	4.41	14.30	1.58	1.46	1.79	-	1.71	0.76	1.88
1-Methylfluoranthene+1H-Benzo(a)fluorene	1.47 ± 0.11	3.35 ± 0.05	0.72 ± 0.00	1.24 ± 0.16	0.97 ± 0.01	-	-	-	0.74 ± 0.01
1H-Benzo(a)fluorene+1H-Benzo(c)fluorene	0.81	1.00	0.43	0.54	0.58	-	-	-	0.16
o-Terphenyl+isobergeryll+bergeryll	4.34	5.26	10.86	3.97	3.44	1.61	1.37	4.13	10.04
Benzo(a)anthracene-isomers+alkyl-derivatives	7.28	65.37	5.26	2.85	3.11	6.58	1.33	0.11	2.78
Benzo(a)anthracene	0.95 ± 0.01	5.18 ± 1.37 ⁶	0.60 ± 0.00	0.29 ± 0.01	0.22 ± 0.01	2.48 ± 0.10	0.22 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.65 ± 0.01
Chrysene + 1-phenylene	3.00 ± 0.09	22.50 ± 0.59	2.53 ± 0.03	1.40 ± 0.04	1.98 ± 0.00	3.75 ± 0.11	0.78 ± 0.02	0.53 ± 0.00	1.20 ± 0.04
Methylbenzo(a)anthracenes/chrysenes (2-5)	3.14	30.36	2.22	0.96	1.51	2.33	0.96	-	0.93
Dimethylbenzo(a)anthracene or isomer	-	23.33 ± 1.44	-	-	-	-	-	-	-
Benzo(a)anthracenes ⁷	0.89	11.34	1.13	-	0.30	4.74	0.35	0.45	1.21
Benzo(b)fluoranthene	0.54 ± 0.01	4.91 ± 0.08	0.59 ± 0.04	-	0.23 ± 0.00	2.05 ± 0.23	0.22 ± 0.01	0.19 ± 0.00	0.64 ± 0.05
Benzo(k)fluoranthene	0.31 ± 0.01	5.38 ± 0.01	0.39 ± 0.04	-	-	2.13 ± 0.04	-	-	0.68 ± 0.01
27F ⁸	-	1.53 ± 0.16	-	-	-	-	-	-	-
Indeno(1,2,3-cd)pyrene	0.25 ± 0.00	2.59 ± 0.18	0.33 ± 0.06	0.07 ± 0.01	0.11 ± 0.00	1.44 ± 0.02	-	0.25 ± 0.01	0.37 ± 0.03
Dibenz(a,h)anthracene	-	0.62 ± 0.01	-	-	-	-	-	-	-
Benzo(g,h,i)perylene	-	0.54 ± 0.04	-	-	-	0.42 ± 0.03	-	-	-
Picene	-	2.11 ± 0.02	-	-	-	-	-	-	-
Benzo(g,h)perylene	0.54 ± 0.01	3.28 ± 0.37	0.59 ± 0.11	0.18 ± 0.00	0.36 ± 0.01	1.32 ± 0.00	0.15 ± 0.01	0.20 ± 0.00	0.45 ± 0.02
Anthranthrene	-	0.64 ± 0.10	-	-	-	0.41 ± 0.02	-	-	-
Dibenzofluorenes or isomers (2)	-	-	-	-	-	0.94	-	-	-
Dibenz(a,h)anthracene	-	-	-	-	-	0.24 ± 0.01	-	-	-
TOTAL	268.33	254.89	138.81	244.82	198.80	1,471.73	268.97	632.37	951.96
Alkyl-derivatives	192.07	118.61	72.70	172.34	153.27	774.24	233.68	481.83	655.99
Carcinogenic PAHs	19.86	64.07	20.58	24.62	14.86	519.32	16.44	75.53	187.12

¹ Compound with a certain degree of carcinogenicity (3, 4). ² Number of isomers included in this group. ³ - Not identified. ⁴ Identified only in one of the samples; ⁵ Benzo(b)fluoranthene + benzo(j)fluoranthene + benzo(k)fluoranthene; ⁶ Isomer of indeno(1,2,3-cd)pyrene and benzo(g,h,i)perylene.

Sample O2 is an exception, since the group of benz(a)anthracene-isomers+alkyl-derivatives is the most abundant, followed by fluoranthene, pyrene and their derivatives. This difference in the proportions of PAHs could be due to a different contamination source in this olive oil. In fact, a study on the PAH content of olive pomace oils (7) revealed that their PAH profile was very similar to that of sample O2.

With regard to alkylated PAHs, it must be pointed out that, except for the olive oil O2, their total concentrations are higher than those of parent PAHs, to such an extent that in O1, EV1, EV2, SF1-B and SF2 alkylated PAHs account for the major part of the total PAH concentration, with percentages relative to the total ranging from 70 in EV1 to 88 in SF1-B.

Among the PAHs identified in these oils, there are several compounds with different degree of carcinogenicity, such as naphthalene, benz(a)anthracene, the benzo(a)fluoranthenes, benzo(a)pyrene, indeno(1,2,3-cd)pyrene and dibenzo(a,e)pyrene (3, 4).

Given that there are no legal limits for PAHs in vegetable oils in the European Union, and taking as reference the Spanish legislation for olive pomace oil (6), which permits a maximum of 2 µg/kg for individual concentrations of benz(a)anthracene, benzo(b)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, benzo(e)pyrene, benzo(a)pyrene, dibenz(a,h)anthracene, indeno(1,2,3-cd)pyrene and benzo(g,h,i)perylene, and a maximum of 5 µg/kg for the sum of all, it must be noticed that the concentrations of many of the PAHs mentioned in the disposition exceed the limits in two of the oils of this study, O2 and SF1-A.

5. CONCLUSIONS

- All the oils studied contain a high number of PAHs, in concentrations which are high or even very high in comparison with the data obtained by other authors, especially in the seed oils.
- Taking into account the high proportion of alkylated compounds in these oils, their presence must not be overlooked, since many of the most carcinogenic PAHs belong to this group.
- The high proportion of light PAHs in the oils of this study, either virgin or refined, suggests that the refining process does not reduce effectively the concentrations of this type of PAHs.
- The distribution of the PAH concentrations is, in general, very similar in oils of the same type, what reveals the influence of the manufacturing process of these oils on their PAH contamination.
- The PAH profile in olive oil O2, very similar to that observed in olive pomace oil, could point to a possible adulteration with the latter. Therefore, the PAH profile of the different samples could provide some information about the PAH contamination source.
- The great differences found between oils having the same label but coming from different batches shows the need for more control of the manufacturing process, since it is possible to reduce the PAH burden if this process is carried out correctly.
- The high PAH content of some of the oils studied shows that the contamination of vegetable oils must be carefully controlled, and legal measures are necessary to limit the presence of PAHs in all types of vegetable oils.

6. REFERENCES

- Guillén, M.D.; Sopenana, P.; Partearroyo, M.A. (1997) *Rev. Env. Health*, 12: 133-146.
- Dennis, M. J.; Massey, R.C.; McIlwain, D. J.; Knowles, M.E. (1983) *Food Chem. Toxicol.* 21: 569-574.
- Challin, M. D.; Sopenana, P. (2003) *Food Safety: contaminants and toxins*, I. P. F. D'Mello (ed.), CABI Publishing, Oxon, United Kingdom.
- IARC (2002) *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, Vol. 82, IARC, Lyon, France.
- Larsson, B. K.; Eriksson, A.T.; Cervenka, M. (1987) *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 64: 365-370.
- Orden de 25 de julio de 2001. *B.O.E.* 178, 26-7-2001.
- Guillén, M.D.; Sopenana, P.; Palencia, G. (2004) *J. Agric. Food Chem.* 52: 2123-2131.

7. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge the financial support of the MCYT (AGL2003-01838) and of the University of the Basque Country (9/JUPV 00101.125.13667/2001). G. Palencia thanks the University of the Basque Country for a predoctoral fellowship.

3. METHODOLOGY

The methodology employed for the study of the oil samples is shown in Figure 1. It must be pointed out that some samples also require an additional alkaline treatment. Each oil was studied in duplicate.

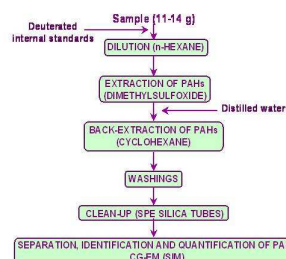


Figure 1. Scheme of the methodology employed for the study of the oil samples.

In relation to the concentrations of the PAHs identified, it can be observed that the total PAH concentrations in the seed oils are, in general, far higher than those of olive and extra virgin olive oils. These results differ from those of other authors, who have found that the PAH content of refined oils is generally lower than that of crude oils, since the refining process usually reduces the initial amount of PAHs (5). Table 1 also shows that there is a great difference between the two batches of refined sunflower oil SF1. Thus, the PAH content of SF1-B, which was acquired after the establishment in Spain of a legal disposition to limit the concentrations of eight PAHs in olive pomace oil (6), is much lower than that of SF1-A.

With regard to the olive and extra virgin olive oils, their total PAH concentrations are of a similar order. Nevertheless, although the total PAH concentrations in olive oils O1 and O2 are almost the same, the levels of heavy PAHs in O2 are very high in comparison with those in O1.

It should be noted that the distribution of the PAH concentrations is not the same in all the oils studied. Thus, whereas in the refined seed oils, naphthalene and its alkyl-derivatives are responsible for the major part of the PAH contamination (69-83%), in most of the olive and extra virgin olive oils, the contribution of this group is lower, even though the proportion of naphthalene and its alkyl-derivatives in the extra virgin olive oils (58%) is somewhat higher than in the olive oils O1 and O3 (45 and 41% respectively).

**III CONGRESO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS,
2005.**

Dos Comunicaciones en forma de Póster.

-M^a Dolores Guillén, Gemma Palencia, Patricia Sopelana y Begoña Abascal. “Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en quesos ahumados con aromas de humo”.

-M^a Dolores Guillén, Begoña Abascal, Patricia Sopelana y Gemma Palencia. “Eficacia de distintas fibras en el estudio, mediante SPME-CG/EM, del espacio de cabeza de queso ahumado”.

HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN QUESOS AHUMADOS CON AROMAS DE HUMO

Guillén-Lorén MD, Palencia-Llorente G, Sopelana-Garay, P, Abascal-Idígoras B.

Tecnología de alimentos; Facultad de Farmacia; Paseo de la Universidad, 7, 01006-Vitoria

E-mail: knpgulod@vf.ehu.es

El ahumado es un proceso de conservación de alimentos, que además les confiere especiales propiedades sensoriales (1). Uno de sus inconvenientes es que puede contaminar los alimentos con Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs), algunos de los cuales son carcinógenos (2). El ahumado puede llevarse a cabo con humo, o con aromas de humo; el empleo de estos últimos presenta numerosas ventajas frente al ahumado tradicional.

Con el fin de conocer en qué grado los aromas de humo pueden contaminar los alimentos, se ha procedido al ahumado de queso con cuatro aromas de humo de composición variada y se ha estudiado su contenido de HAPs. La metodología empleada para el estudio de estos últimos incluye extracción de la grasa con ciclohexano, tratamiento alcalino, extracción de HAPs con ciclohexano, aislamiento mediante extracción en fase sólida y determinación mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas en modo SIM.

Los resultados obtenidos muestran que todos los quesos estudiados, incluido el mismo queso sin ahumar, contienen HAPs, si bien los compuestos predominantes son los de peso molecular bajo. Benzo(a)pireno ha sido identificado únicamente en una de las muestras, en una concentración muy inferior al máximo permitido para este compuesto en la corteza de quesos, ahumados con humo, madurados, que es 10 µg/kg (3). Puede decirse que el ahumado con estos aromas de humo permite obtener quesos con niveles muy bajos de HAPs carcinogénicos.

Referencias

- (1) Maga, J.A. (1988) *Smoke in Food Processing*. CRC Press: Boca Raton, Florida, USA.
- (2) Guillén, M.D.; Sopelana, P. (2003) *Food Safety: Contaminants and Toxins*. Ed. J.P.F. D'Mello. CABI Publishing, Oxon, U.K., pp: 175-198.
- (3) Orden de 29 de noviembre de 1985. BOE, N° 292, 6.12.1985.

Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación concedida por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCYT AGL2003-01838) y por la UPV (9/UPV 00101.125.1366/2001). G. Palencia agradece a la UPV la concesión de una beca predoctoral.

HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN QUESOS AHUMADOS CON AROMAS DE HUMO



M.D. Guillén*, G. Palencia, P. Sopelana, B. Abascal
Tecnología de Alimentos, Facultad de Farmacia, UPV
Paseo de la Universidad, 7, 01006 Vitoria
Teléfono: 945-013081; Fax: 945-013014; E-mail: knpgulod@vf.ehu.es

INTRODUCCIÓN

El ahumado es uno de los procesos más antiguos de conservación de alimentos, si bien hoy en día se emplea, fundamentalmente, por las propiedades sensoriales que confiere. No obstante, si el ahumado no se lleva a cabo adecuadamente, puede contaminar los alimentos con Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs), algunos de los cuales poseen actividad carcinogénica (1, 2). Esta es una de las razones por las que, desde hace tiempo, se vienen utilizando los aromas de humo, cuyo uso presenta numerosas ventajas frente al ahumado tradicional. Entre éstas se pueden citar la posibilidad de controlar su contenido de HAPs, su versatilidad de aplicación, mayor homogeneidad del producto acabado, un menor coste y la reducción de emisiones a la atmósfera (3).

Con el fin de conocer en qué grado los aromas de humo pueden contaminar los alimentos, se ha estudiado el contenido de HAPs de quesos ahumados con cuatro aromas líquidos de composición variada, y se ha comparado con el del mismo queso sin ahumar.

MUESTRAS

- Cuatro **quesos** de tipo curado de un mismo lote, **ahumados con cuatro aromas de humo líquidos diferentes** de composición previamente estudiada (QA1, QA2, QA3 y QA4).
- **Queso del mismo lote sin ahumar** (BLANCO).

Todas las muestras fueron tomadas de la parte más externa de los quesos (aproximadamente 1 cm, incluyendo la corteza) y estudiadas por duplicado.

METODOLOGÍA

- **Ahumado de los quesos.** Éste se llevó a cabo por inmersión directa de las muestras en los aromas de humo convenientemente diluidos, durante 3 min.
- **Determinación de HAPs.** La metodología empleada para el estudio de los HAPs aparece esquematizada en la Figura 1.



Figura 1. Metodología seguida para la determinación de HAPs en queso.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los HAPs identificados en los quesos estudiados y sus concentraciones, en μg por kg de la parte exterior, se presentan en la Tabla 1.

- **Contenido de HAPs e influencia del ahumado.** Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que **todas las muestras estudiadas, incluido el blanco, contienen HAPs.**

Los **compuestos más abundantes son los de bajo peso molecular**, sobre todo naftaleno y sus derivados alquilados, mientras que los HAPs más pesados se encuentran en concentraciones muy bajas. Cabe destacar que los derivados alquilados constituyen más de la mitad de la concentración total de HAPs en todos los casos.

Exceptuando naftaleno y sus alquil-derivados, en general, las concentraciones de HAPs son muy similares en todos los quesos estudiados. Únicamente en QA1 se observa que, a partir de acenafileno, las concentraciones son más altas que en el resto de las muestras. Debe señalarse que el contenido de HAPs del aroma empleado para el ahumado de este queso era muy superior al de los otros tres aromas utilizados (4).

El **queso sin ahumar** presenta las concentraciones más altas de naftaleno y sus alquil-derivados. La presencia de HAPs en queso sin ahumar también ha sido observada por otros autores (5, 6), y podría ser atribuida a una contaminación de la leche de partida. Debe señalarse que estos HAPs de bajo peso molecular se han encontrado también en otros alimentos no ahumados.

- **Presencia de HAPs carcinogénicos.** Todas los quesos estudiados presentan algunos compuestos con diferente grado de carcinogenicidad. **Benzo(a)pireno** ha sido identificado únicamente en QA1, si bien su concentración (0,16 $\mu\text{g}/\text{kg}$) es muy inferior a los 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ establecidos como máximo por la Legislación Española en la corteza de quesos ahumados madurados (7). Hay que tener en cuenta que los valores de la Tabla 1 corresponden únicamente a la parte más externa del queso, que es donde se concentra la mayor parte de la contaminación (8), por lo que la concentración correspondiente al producto entero será menor.

Tabla 1. HAPs identificados en las muestras estudiadas y sus concentraciones, en $\mu\text{g}/\text{kg}$ de parte exterior. Los resultados vienen dados como valor medio \pm desviación estándar.

HAP	QA1	QA2	QA3	QA4	BLANCO
Naftaleno ¹	46,55 \pm 3,48	58,40 \pm 12,60	55,21 \pm 12,02	44,67 \pm 4,85	82,61 \pm 3,36
Metilnaftalenos	26,59	31,21	29,19	22,96	38,47
Dimetilnaftalenos	68,70	91,99	58,46	41,16	119,96
Acenafileno	9,83 \pm 1,53	2,75 \pm 0,22	1,89 \pm 0,00	1,72 \pm 0,21	2,14 \pm 0,07
Acenafiteno	1,86 \pm 0,48	1,10 \pm 0,15	1,05 \pm 0,05	0,93 \pm 0,12	0,96 \pm 0,01
Fluoreno	11,81 \pm 1,50	4,03 \pm 0,53	3,79 \pm 0,05	4,09 \pm 0,08	3,13 \pm 0,18
Fenantreno	27,18 \pm 2,52	4,65 \pm 1,46	3,75 \pm 0,03	4,27 \pm 0,17	4,81 \pm 0,20
Antraceno	5,61 \pm 0,57	0,48 \pm 0,19	0,36 \pm 0,02	0,42 \pm 0,15	0,47 \pm 0,01
Metil-fenantrenos/-antracenos	21,46	7,16	6,18	6,67	5,93
Dimetilfenantrenos o isómeros	7,84	2,83	2,65	3,76	2,28
Fluoranteno	3,69 \pm 0,31	0,69 \pm 0,21	0,45 \pm 0,02	0,54 \pm 0,06	0,53 \pm 0,02
Pireno	3,49 \pm 0,16	0,70 \pm 0,11	0,66 \pm 0,01	0,63 \pm 0,01	0,57 \pm 0,07
Metil-fluorantenos/-pirenos	2,29	0,20	0,18	0,20	0,14
Benzo(a)fluoranteno	2,12	--	--	--	--
Benzo(a)antraceno ²	0,45 \pm 0,07	0,04 \pm 0,00	0,05 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01	0,02 \pm 0,00
Criseno + Trifenileno	0,75 \pm 0,09	0,73 \pm 0,40	0,41 \pm 0,01	0,79 \pm 0,23	0,09 \pm 0,00
Benzo(b+j+k)fluorantenos	0,37	--	--	--	--
Benzo(a)fluoranteno	0,04	--	--	--	--
Benzo(e)pireno	0,10 \pm 0,02	--	--	--	--
Benzo(a)pireno	0,16 \pm 0,04	--	--	--	--
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0,13 \pm 0,03	--	--	--	--
Benzo(ghi)perileno	0,11 \pm 0,02	--	--	--	--
TOTAL	241,97	207,76	164,95	133,97	262,70
HAPs carcinogénicos	48,41	59,17	55,67	45,44	82,72

¹ Compuesto considerado como "posiblemente carcinogénico en humanos" según la clasificación de la IARC (1, 2).

² Compuesto considerado como "probablemente carcinogénico en humanos" según la clasificación de la IARC (1, 2).

Tanto las **concentraciones de HAPs** totales como de benzo(a)pireno son **más bajas que las encontradas en otros quesos ahumados por el método tradicional** con aerosol de humo estudiados previamente (8). Estos resultados concuerdan con los de otros autores, que también han observado que los quesos ahumados con aromas de humo contienen niveles más bajos de HAPs que los ahumados siguiendo el método tradicional (5, 9).

CONCLUSIONES

- 1.- **Todos los quesos estudiados, incluido el queso sin ahumar, contienen HAPs**, si bien todos ellos presentan niveles muy bajos de compuestos carcinogénicos.
- 2.- **El ahumado de queso con aromas de humo** en las condiciones de este estudio, en general, **apenas incrementa su concentración de HAPs**, por lo que este tipo de ahumado se presenta como una buena alternativa para reducir el grado de contaminación del queso ahumado.
- 3.- Es **importante controlar la presencia de HAPs en los aromas de humo**, ya que, si estos contaminantes se encuentran en concentraciones elevadas, pueden pasar a los alimentos.
- 4.- Aun cuando el ahumado de queso con aromas de humo está prohibido por ley en España, los quesos ahumados por esta técnica presentan un **contenido de HAPs inferior al de quesos ahumados de forma tradicional**.
- 5.- **Debería controlarse el grado de contaminación de la leche de partida**, con el fin de evitar la acumulación de HAPs durante el proceso de elaboración del queso.

BIBLIOGRAFÍA

1. IARC (1983). *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans*. Vol. 32. Lyon, France.
2. IARC (2002). *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans*. Vol. 82. Lyon, France.
3. Maga, J.A. (1988) *Smoke in Food Processing*. CRC Press: Boca Raton, Florida, USA.
4. Guillén, M.D.; Sopelana, P.; Partearroyo, M.A. (2000) *J. Agric. Food Chem.*, 48: 126-131.
5. Bosset, J.O.; Buttkofer, U.; Dafflon, O.; Koch, H.; Scheurer-Simonet, L.; Sieber, R. (1998) *Sci. Aliments*, 18: 347-359.
6. Pagliuca, G.; Gazzotti, T.; Zironi, E.; Serrazanetti, G.P.; Mollica, D.; Rosmini, R. (2003) *J. Agric. Food Chem.*, 51: 5111-5115.
7. Orden de 29 de noviembre de 1985. BOE, Nº 292, 6.12.1985.
8. Guillén, M.D.; Sopelana, P. (2004) *J. Dairy Sci.*, 87: 556-564.
9. Anastasio, A.; Mercogliano, R.; Vollano, L.; Pepe, T.; Cortesi, M.L. (2004) *J. Agric. Food Chem.*, 52: 4452-4455.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación concedida por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCYT AGL2003-01838). G. Palencia agradece a la Universidad del País Vasco la concesión de una beca predoctoral.

**EFICACIA DE DISTINTAS FIBRAS EN EL ESTUDIO, MEDIANTE SPME-CG/EM,
DEL ESPACIO DE CABEZA DE QUESO AHUMADO**

Guillén M.D.*, Abascal B., Sopelana P y Palencia G.
Tecnología de Alimentos. Facultad de Farmacia. Universidad del País Vasco.
Paseo de la Universidad, nº 7, 01006 Vitoria (Alava).
Teléfono: 945 013081; Fax: 945 013014; E-mail: knpgulod@vf.ehu.es

El queso es un producto de gran consumo, cuya apreciación se debe, básicamente, a sus propiedades organolépticas. Por esta razón, se ha desarrollado un enorme volumen de trabajo, y se han empleado metodologías muy variadas (1), para determinar la identidad y concentración de los componentes responsables del olor y/o del sabor de muchos de los quesos que se manufacturan en distintos países y regiones.

En los últimos tiempos para llevar a cabo este tipo de estudios, se está utilizando con gran profusión, la captación de los componentes del espacio de cabeza estático mediante microextracción en fase sólida (SPME) seguida del estudio de esos componentes por Cromatografía de Gases Espectrometría de Masas (CG/EM) (2-4), por las múltiples ventajas que ofrece. En esta técnica un factor importante es la naturaleza de la fase estacionaria que recubre la fibra que se emplea en la microextracción en fase sólida. En esta comunicación se presentan los resultados obtenidos al estudiar los componentes volátiles de queso Idiazabal ahumado artesanal mediante esta técnica, con fibras recubiertas con tres fases estacionarias diferentes a saber polydimethylsiloxano (PDMS, 100 μm), polyacrilato (Polyacrilato, 85 μm), y divinilbenzeno-carboxen-polydimethylsiloxano (DVD-CAR-PDMS, 50/30 μm). Los resultados han puesto de manifiesto que las tres fibras retienen componentes de un amplio rango de volatilidad, sin embargo difieren considerablemente en cuanto a la cantidad retenida de cada compuesto.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el MCYT (AGL2003-01838) y por la UPV (9/UPV 00101.125.13667/2001). G. Palencia agradece a la UPV la concesión de una beca predoctoral.

REFERENCIAS

1. Mariaca R., Bosset, JO (1997) *Le Lait* 77, 13-40.
2. Guillén MD, Errecalde MC. (2002) *J Sci Food Agric* 82, 945-952.
3. Guillén MD, Ibargoitia ML., Sopelana P., Palencia G.(2004) *J Dairy Sci.* 87, 556-564.
4. Guillén MD, Ibargoitia ML., Sopelana P., Palencia G.(2004) *Le Lait* 84, 385-397.

EFICACIA DE DISTINTAS FIBRAS EN EL ESTUDIO, MEDIANTE SPME-CG/EM, DEL ESPACIO DE CABEZA DE QUESO AHUMADO



Guillén M.D.*, Abascal B., Sopelana P. y Palencia G.
 Tecnología de Alimentos, Facultad de Farmacia, Universidad del País Vasco.
 Paseo de la Universidad, nº 7, 01006 Vitoria (Alava).
 Teléfono: 945013081; Fax: 945013014; E-mail: knpgulod@vf.ehu.es

INTRODUCCIÓN

El queso es un producto de gran consumo, cuya apreciación se debe, básicamente, a sus propiedades organolépticas. Por esta razón se ha desarrollado un enorme volumen de trabajo, y se han aplicado metodologías muy variadas (1), para determinar la identidad y concentración de los componentes responsables del olor y/o del sabor de muchos de los quesos que se manufacturan en distintos países y regiones.

En los últimos tiempos para llevar a cabo este tipo de estudios, se está utilizando con gran profusión la captación de los componentes del espacio de cabeza estático mediante microextracción en fase sólida (SPME) seguida del estudio de esos componentes por Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (CG/EM) (2-4), por las múltiples ventajas que ofrece. En esta técnica un factor importante es la naturaleza de la fase estacionaria que recubre la fibra que se emplea en la microextracción en fase sólida. En esta comunicación se presentan los resultados obtenidos al estudiar los componentes volátiles del queso Idiazabal ahumado artesanal mediante esta técnica, con fibras recubiertas con tres fases estacionarias diferentes, a saber, divinilbenceno-carboxen-polidimetilsiloxano (DVB-CAR-PDMS, 50/30 µm), poliacrilato (Poliacrilato, 85 µm) y polidimetilsiloxano (PDMS, 100 µm).

EXPERIMENTAL

El queso fue elaborado artesanalmente a partir de leche cruda de oveja latxa, siguiendo un proceso de elaboración que incluye las etapas de coagulación, moldeado, prensado, salado y maduración durante 2 meses, tal y como viene recogido en la Denominación de Origen Idiazabal (5). Al final de esta última etapa, el queso se ahumó de forma tradicional utilizando para ello madera de espiño blanco, y se dejó madurar de nuevo durante dos meses más. Se tomaron varias muestras de la corteza del queso y se estudiaron sus componentes volátiles mediante microextracción en fase sólida (SPME) utilizando tres fibras diferentes: DVB-CAR-PDMS, 50/30 µm; Poliacrilato, 85 µm; y PDMS, 100 µm. El procedimiento seguido para el estudio de los componentes volátiles y semi-volátiles aparece esquematizado en la Figura 1.

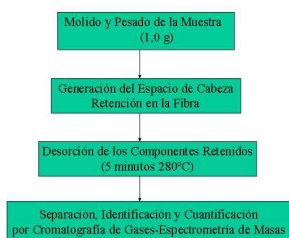


Figura 1. Esquema del procedimiento empleado para el estudio de las muestras

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

1- Como puede observarse en la Figura 2 con los tres tipos de fibra empleados se ha detectado un número muy elevado de compuestos, de naturaleza química variada. Entre ellos hay: ácidos, cetonas, alcoholes, hidrocarburos, aldehídos, ésteres, lactonas, fenoles y otros.

2- Se ha observado que los componentes mayoritarios del espacio de cabeza de este queso son: los ácidos de número par de átomos de carbono, a saber, butanoico, hexanoico, octanoico y decanoico, y las cetonas de número impar de átomos de carbono, a saber, 2-nonanona y 2-undecanona. Este resultado se obtiene cualquiera que sea el tipo de fibra empleada.

3- El espacio de cabeza de este queso también contiene los típicos componentes del humo: fenol, guayacol, siringol y sus derivados alquilados. Estos componentes también se detectan con los tres tipos de fibra. En la Figura 3 se presenta la región del cromatograma en la que eluyen dichos compuestos.

4- Los componentes detectados con las tres fibras tienen un amplio rango de volatilidades, aunque se observan diferencias según la fibra utilizada. Así, los componentes más volátiles son mejor captados por la fibra de DVB-CAR-PDMS.

5- La mayor diferencia observada en los resultados obtenidos con las tres fibras reside en la concentración de los componentes detectados. La Tabla 1 muestra las cantidades relativas de algunos de los compuestos extraídos, expresadas en cuentas de área, con los tres tipos de fibra.

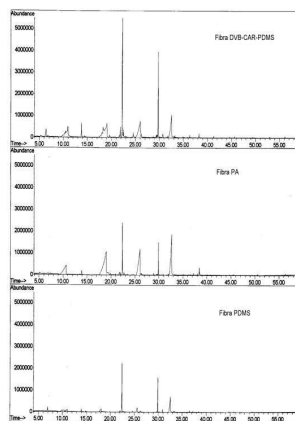


Figura 2. Cromatogramas de los componentes del espacio de cabeza de la corteza del queso ahumado artesanal, extraídos mediante las fibras de DVB-CAR-PDMS 50/30 µm; Poliacrilato, 85 µm; y PDMS, 100 µm

En las Figuras 4 y 5 se ponen de manifiesto las diferencias observadas en las concentraciones de los ácidos y de las cetonas mayoritarias captadas del espacio de cabeza de la corteza del queso, utilizando DVD-CAR-PDMS(50/30 µm), Poliacrilato (85 µm), y PDMS (100 µm).

6- En general, la fase estacionaria que mayores cantidades de analitos capta, a excepción de los ácidos, es la de DVB-CAR-PDMS-50/30 µm. Ver Tabla 1 y Figuras 4 y 5

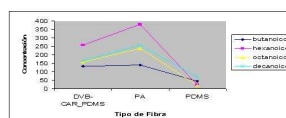


Figura 4. Concentraciones de los ácidos mayoritarios captados del espacio de cabeza del queso, mediante las fibras DVB-CAR-PDMS; PA; y PDMS, expresadas como cuentas de área por gramo de muestra multiplicadas por 10⁵.

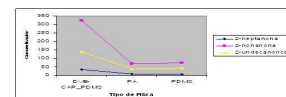


Figura 5. Concentraciones de las cetonas mayoritarias captadas del espacio de cabeza del queso mediante las fibras DVB-CAR-PDMS; PA; y PDMS, expresadas como cuentas de área por gramo de muestra multiplicadas por 10⁵.

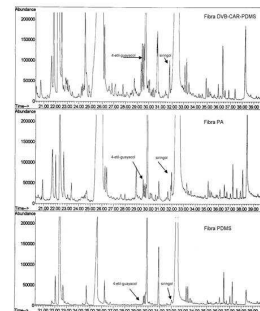


Figura 3. Ampliación de la región del cromatograma de los componentes del espacio de cabeza de la corteza del queso, utilizando fibras de DVB-CAR-PDMS 50/30 µm; Poliacrilato, 85 µm; y PDMS, 100 µm, comprendida entre 20 y 40 minutos

Tabla 1. Concentraciones de algunos componentes captados del espacio de cabeza de la corteza de un queso ahumado artesanal mediante las fibras DVB-CAR-PDMS, 50/30 µm; Poliacrilato, 85 µm; y PDMS, 100 µm, expresadas como cuentas de área por gramo de muestra multiplicadas por 10⁵.

Componente	DVB-CAR-PDMS	PA	PDMS
Ácidos			
Acético(80)	6.0	0.5	1.9
Octanoico	158.3	236.3	158.3
Decanoico	166.2	256.4	70.5
Cetonas			
2-Heptanona	34.3	7.2	7.0
2-Nonanona	322.5	69.8	73.3
2-Undecanona	158.8	39.3	42.4
Alcoholes			
2-Heptanol	0.8	0.5	0.1
2-Nonanol	9.6	4.2	1.9
2-Undecanol	1.1	0.6	0.2
Aldehídos			
3-Metilbutanal	0.2	---	---
Nonanal	0.5	---	0.2
Dodecanal	tr	---	0.2
Hidrocarburos			
Tetradecano	2.3	0.3	1.0
Metilbenceno	tr	tr	tr
Naftaleno(128)	2.2	0.3	0.1
Derivados fenólicos			
Fenol(94)	0.4	0.6	tr
Guayacol(108)	2.2	0.7	0.2
Siringol	3.1	2.0	0.1

(*) Los componentes con asterisco han sido cuantificados con el δ n indicado

7- La fibra de poliacrilato-85 µm es la que tiene mas capacidad para retener ácidos, salvo el ácido acético que queda más retenido en DVB-CAR-PDMS-50/30 µm., y la que menos capacidad muestra para retener aldehídos e hidrocarburos.

8- La fibra de PDMS-100 µm, en general, es la que proporciona las menores concentraciones de todos los tipos de componentes a excepción de los aldehídos e hidrocarburos.

BIBLIOGRAFIA

- Mariaca R., Bossset, JO (1997) *Le Lait* 77, 13-40.
- Guillén MD, Errecalde MC. (2002) *J Sci Food Agric* 82, 945-952.
- Guillén MD, Ibargoitia ML., Sopelana P., Palencia G. (2004) *J Dairy Sci*, 87, 556-564.
- Guillén MD, Ibargoitia ML., Sopelana P., Palencia G. (2004) *Le Lait* 84, 385-397.
- Orden de 30 de Noviembre de 1993 (BOE 298, pag. 34591).

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a financiación concedida por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCYT AGL2003-01838). Gemma Palencia agradece a la Universidad del País Vasco la concesión de una beca predoctoral.

INNOVATIONS IN TRADITIONAL FOODS, (INTRADFOOD), 2005.

Una Comunicación en forma de Póster y un Proceeding publicado en el Libro de Actas del congreso.

-M^a Dolores Guillén, Gemma Palencia, Patricia Sopelana M. L. Ibargoitia y María Fresno.

“Prospective study on the presence of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Herreño cheese”.

Prospective study on the presence of polycyclic aromatic hydrocarbons in Herreño cheese

M.D. Guillén^{1*}, G. Palencia¹, P. Sopelana¹, M.L. Ibargoitia¹, M.Fresno²

¹*Tecnología de Alimentos, Facultad de Farmacia, Paseo de la Universidad, 7, 01006-Vitoria.*

²*Instituto Canario de Investigación Agraria. Tenerife*

knpgulod@vf.ehu.es

The Herreño cheese is a type of cheese produced in El Hierro, the smallest of the Canary Islands. This cheese is manufactured with a mixture of milk from goat, cow and sheep, and it is often subjected to smoking. As is known, the smoking of foods, particularly fatty food, can lead to its contamination with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) if the process is not controlled carefully (1). To the best of our knowledge, little prospective study on the presence of PAHs in smoked cheese has been carried out until now. For this reason, with the aim to guarantee the safety of this cheese, several samples of this type of cheese have been studied, in order to know their PAH contamination degree, and to compare it with that of non smoked cheese.

PAHs were extracted from the outer part of the pieces and determined by gas chromatography-mass spectrometry in SIM mode. As is usual in smoked foods, all the samples studied contain PAHs, the predominant compounds being those of low molecular weight, especially naphthalene and its methyl derivatives. Benzo(a)pyrene was not identified in any of the studied samples. Also noteworthy is the presence of PAHs in the non-smoked Herreño cheese; these contaminants are in lower concentrations in the non-smoked than in the smoked samples. The presence of these contaminants in non-smoked cheeses has been also observed by other authors.

Keywords: Herreño cheese; PAHs; GC/ME in mode SIM

References

(1) Maga, J.A. (1988) *Smoke in Food Processing*. CRC Press: Boca Raton, Florida, USA.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support of the Ministerio de Ciencia y Tecnología (AGL2003-01838; CAL02-075-C3-2). G. Palencia thanks the University of the Basque Country for the concession of a predoctoral fellowship.

Prospective study on the presence of polycyclic aromatic hydrocarbons in Herreño cheese

M.D. Guillén^{1*}, G. Palencia¹, P. Sopelana¹, M.L. Ibargoitia¹, M.Fresno²

¹*Tecnología de Alimentos, Facultad de Farmacia, Paseo de la Universidad, 7, 01006-Vitoria.*

²*Instituto Canario de Investigación Agraria. Tenerife*

knpgulod@vf.ehu.es

Introduction

The Herreño cheese is a type of cheese produced in El Hierro, the smallest of the Canary Islands. This cheese is manufactured with a mixture of milk from goat, cow and sheep, and it is often subjected to smoking. As is known, the smoking of foods, particularly fatty food, can lead to its contamination with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) if the process is not controlled carefully (1). To the best of our knowledge, little prospective study on the presence of PAHs in smoked cheese has been carried out until now. For this reason, with the aim to guarantee the safety of this cheese, several samples of this type of cheese have been studied, in order to know their PAH contamination degree, and to compare it with that of non smoked cheese.

Materials and methods

The samples subject of study were some Herreño cheeses smoked at the same time, as well as another non smoked Herreño cheese, all of the same batch. During the smoking process, the samples were put at different distances from the smoke entrance, some in the upper part of the smoking chamber and the others in the lower. All the samples were taken from the outer part of the cheese pieces, including the rind. A scheme of the methodology employed for the determination of PAHs can be seen in Figure 1.

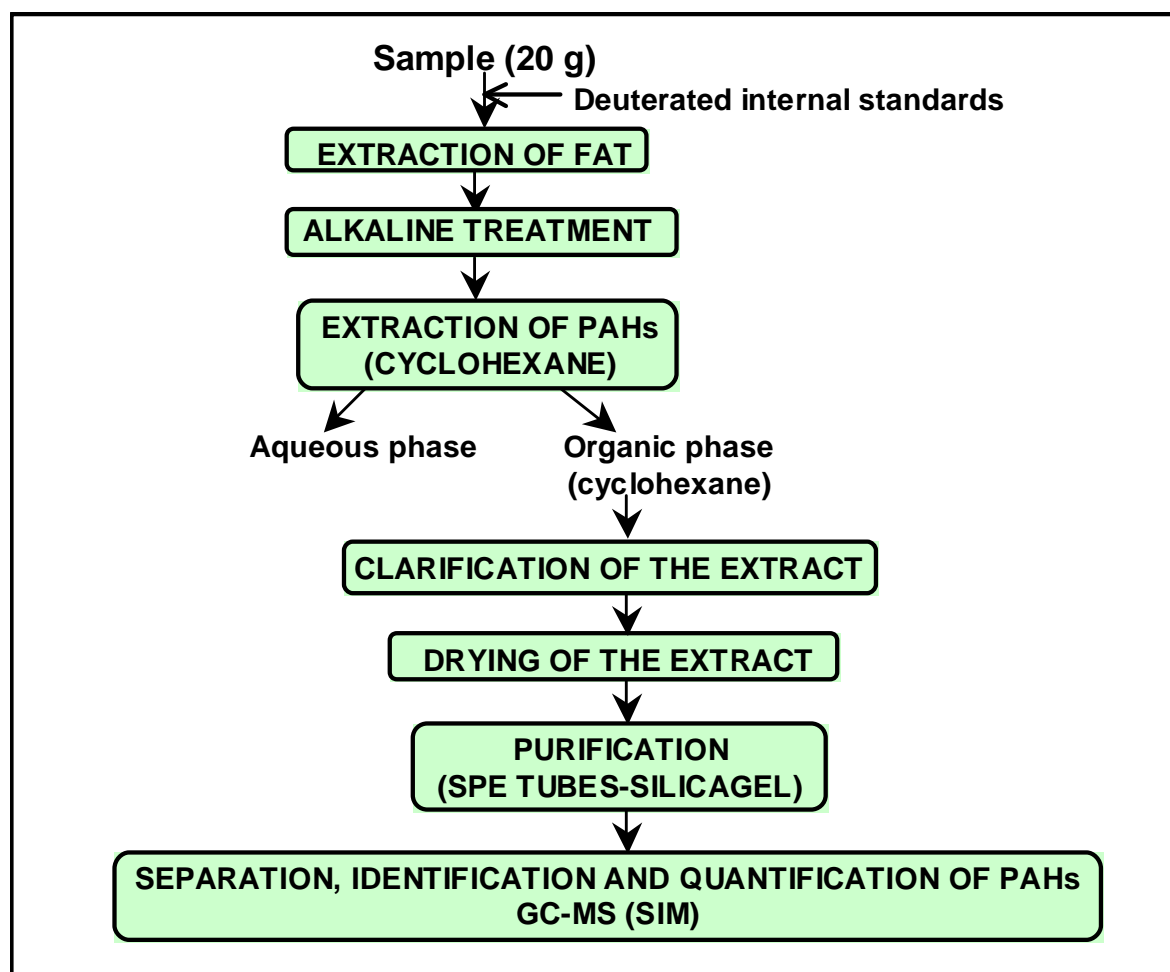


Figure 1. Scheme of the methodology employed for the study of PAHs.

Results and discussion

Table 1 shows the PAH content of two of the smoked Herreño cheese samples studied: SC1 and SC2, expressed in mg/kg. SC1 was taken from the upper part of the smoking chamber whereas SC2 from the lower. Besides, sample SC1 was closer than SC2 to the smoke entrance. The results obtained reveal the absence, in both samples, of PAHs with more than four aromatic rings, among which are some of the most carcinogenic. However, both samples contain PAHs, and the predominant compounds are those of low molecular weight, such as naphthalene and its alkyl derivatives or acenaphthylene.

In relation to the concentrations of the PAH identified, it can be observed that there is a great difference between the total PAH concentration in samples SC1 (1070,32) and SC2 (430,07).

However, in both cases, the highest values correspond to naphthalene and its alkyl derivatives, whereas PAHs with higher molecular weight, such as benz(a)anthracene and its isomers (chrysene + triphenylene), are present in very low concentrations. It should be noticed that alkylated PAHs account for more than 65% in both samples. An explanation for the difference between the PAH content of these samples could be found in their position in the smoking chamber, since SC1 was closer to the smoke entrance and placed in the upper part.

Table 1. PAHs identified in the outer part of two samples of smoked Herreño cheese and their concentrations, expressed in $\mu\text{g}/\text{kg}$. Individual concentrations are given as mean values \pm standard deviation.

PAH	SC1	SC2
Naphthalene ^a	217.73 \pm 21.40	119.51 \pm 18.19
Methylnaphthalenes	364.87	153.95
Dimethylnaphthalenes	372.54	119.90
Acenaphthylene	33.49 \pm 1.35	15.57 \pm 4.92
Acenaphthene	5.85 \pm 1.34	2.37 \pm 0.46
Fluorene	19.23 \pm 8.98	3.57 \pm 0.71
Phenanthrene	23.14 \pm 8.25	5.83 \pm 0.32
Anthracene	5.65 \pm 2.01	1.33 \pm 0.14
Methyl-phenanthrenes/-anthracenes	13.72	5.07
Dimethyl-phenanthrenes/-anthracenes	6.23	1.24
Fluoranthene	2.51 \pm 0.76	0.59 \pm 0.04
Pyrene	2.30 \pm 0.83	0.46 \pm 0.02
Methyl-fluoranthenes/pyrenes	1.06	0.33
Benzofluorenes ^b	0.89	0.13
Benz(a)anthracene^c	0.44 \pm 0.12	0.07 \pm 0.01
Chrysene + Triphenylene	0.67 \pm 0.18	0.15 \pm 0.00
TOTAL PAHs	1,070.32	430.07

^a Compound considered as "possibly carcinogenic to humans" (group 2B) by the IARC (3).

^b 11H-Benzo(a)fluorene+11H-Benzo(b)fluorene+11H-Benzo(c)fluorene

^c Compound considered as "probably carcinogenic to humans" (group 2A) by the IARC (2).

Among the PAHs identified, there are two with different degree of carcinogenicity according to the classification of the International Agency for Research on Cancer (IARC, 1983; 2002): naphthalene, recently considered as "possibly carcinogenic to humans" (group 2B), and benz(a)anthracene, considered as "probably carcinogenic to humans" (group 2A).

Benzo(a)pyrene, a potent carcinogen and the only PAH for which a legal limit exists in some Spanish types of smoked cheeses (10 mg of Benzo(a)pyrene/kg of cheese rind; Orden de 29 de noviembre de 1985), has not been identified in any of the samples studied.

It must be noticed that the results presented here correspond to the outer part of the cheese pieces, including the rind, which represents approximately 60% of the whole piece in both cases. Therefore, taking into account that the external part is the most contaminated (Guillén and Sopelana, 2004), the values corresponding to the whole cheese would be lower.

It is worth pointing out that the non-smoked cheese also contains PAHs, even though their total concentration (34.08 µg/kg) is very low in comparison with the smoked samples. The presence of PAHs in non smoked cheese has also been observed by other authors (Bosset et al., 1998; Pagliuca et al., 2003), and maybe as a consequence of the contamination of the milk.

Conclusions

The samples of Herreño cheese studied present a very low level of contamination by PAHs. Although all samples studied contain PAHs, the concentration of the carcinogenic is very low or null. The concentration of PAHs in the non-smoked cheese is much lower than in the smoked ones. The PAH contamination of the milk should be controlled, in order to avoid the presence of these contaminants in cheese.

Lastly, it would be advisable to place the cheeses as far as possible from the smoke entrance in the smokehouse, in order to reduce their PAH contamination degree.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support of the Ministerio de Ciencia y Tecnología (AGL2003-01838; CAL02-075-C3-2). G. Palencia thanks the University of the Basque Country for a predoctoral fellowship.

References

- Bosset, J.O.; Butikofer, U.; Dafflon, O.; Koch, H.; Scheurer-Simonet, L.; Sieber, R. (1998) *Sci. Aliments*, 18: 347-359.2.
- IARC (1983) *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*. Vol. 32. Lyon, France.
- IARC (2002) *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*. Vol. 82. Lyon, France.
- Maga, J.A. (1988) *Smoke in Food Processing*. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA.
- Orden de 29 de noviembre de 1985. B.O.E. 292, 6-12-1985.
- Pagliuca, G.; Gazzotti, T.; Zironi, E.; Serrazanetti, G.P.; Mollica, D.; Rosmini, R. (2003) *J. Agric. Food Chem.*, 51: 5111-5115.

PROSPECTIVE STUDY ON THE PRESENCE OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN HERREÑO CHEESE

M.D. Guillén^{1*}, G. Palencia¹, B. Abascal¹, P. Sopelana¹, M.L. Ibargoitia¹, M. Fresno²

¹Tecnología de Alimentos. Facultad de Farmacia. UPV

Paseo de la Universidad, 7, 01006 Vitoria

Teléfono: 945-013081; Fax: 945-013014; E-mail: mariadolores.guillen@ehu.es

²Instituto Canario de Investigación Agraria. Tenerife



INTRODUCTION

The Herreño cheese is a type of cheese produced in El Hierro, the smallest of the Canary Islands. This cheese is manufactured with a mixture of milk from goat, cow and sheep, and it is often subjected to smoking. As is known, the smoking of food, particularly fatty food, can lead to its contamination with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) if the process is not controlled carefully (1).

To the best of our knowledge, little prospective study on the presence of PAHs in smoked cheese has been carried out until now. For this reason, and to guarantee the safety of Herreño cheese, some samples of this type of cheese have been studied, with a **double objective**:

- 1.- To know their PAH contamination degree.
- 2.- To compare it with that of non-smoked cheese.

SAMPLES

The samples subject of study were some **Herreño cheeses smoked at the same time**, as well as **another non smoked Herreño cheese, all of the same batch**. During the smoking process, the samples were put at different distances from the smoke entrance, some in the upper part of the smoking chamber and the others in the lower. All the samples were taken from the outer part of the cheese pieces, including the rind, as it is shown in Figure 1.

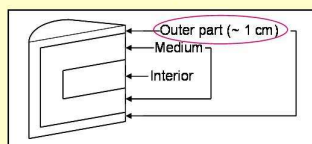


Figure 1. Scheme of the different parts of the cheese piece.

METHODOLOGY

A scheme of the methodology employed for the determination of PAHs can be seen in Figure 2.

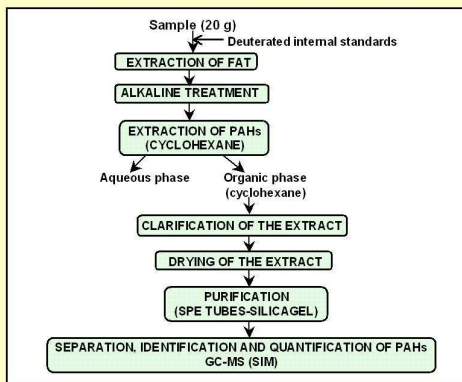


Figure 2. Scheme of the methodology employed for the study of PAHs.

RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 shows the PAH content of **two of the smoked Herreño cheese samples studied**: SC1 and SC2, expressed in $\mu\text{g}/\text{kg}$ of outer part. In this table can be observed the following:

- 1.- Both samples contain PAHs, and **the predominant compounds are those of low molecular weight**, such as naphthalene and its alkyl derivatives, acenaphthylene, fluorene or phenanthrene.
- 2.- **PAHs with more than four aromatic rings**, among which are some of the most carcinogenic ones, **have not been identified** in these samples.
- 3.- There is a **great difference between the total PAH concentration** in samples SC1 and SC2. This could be due to their position in the smoking chamber, since SC1 was closer to the smoke entrance and placed in the upper part. However, in both cases, **the highest values correspond to naphthalene and its alkyl derivatives**.
- 4.- **Alkylated compounds** account for **more than 85% of the total PAH concentration** in both samples.

- 5.- **Among the PAHs identified**, there are **two with different degree of carcinogenicity** according to the classification of the International Agency for Research on Cancer (2, 3): **naphthalene**, recently considered as "possibly carcinogenic to humans" (group 2B), and **benz(a)anthracene**, considered as "probably carcinogenic to humans" (group 2A).
- 6.- **Benzo(a)pyrene**, a potent carcinogen and the only PAH for which a legal limit exists in some Spanish types of smoked cheeses (4), **has not been identified in any of the samples studied**.

Table 1. PAHs identified in the outer part of two samples of smoked Herreño cheese and their concentrations, expressed in $\mu\text{g}/\text{kg}$. Individual concentrations are given as mean values \pm standard deviation.

PAH	Upper part of the smoking chamber Closer than SC2 to the smoke entrance		Lower part of the smoking chamber	
	SC1	SC2	SC1	SC2
Naphthalene ^a	217.73 \pm 21.40	119.51 \pm 18.19		
Methylnaphthalenes	364.87	153.95		
Dimethylnaphthalenes	372.54	119.90		
Acenaphthylene	33.49 \pm 1.35	15.57 \pm 4.92		
Acenaphthene	5.85 \pm 1.34	2.37 \pm 0.46		
Fluorene	19.23 \pm 8.98	3.57 \pm 0.71		
Phenanthrene	23.14 \pm 8.25	5.83 \pm 0.32		
Anthracene	5.65 \pm 2.01	1.33 \pm 0.14		
Methyl-phenanthrenes/anthracenes	13.72	5.07		
Dimethyl-phenanthrenes/anthracenes	6.23	1.24		
Fluoranthene	2.51 \pm 0.76	0.59 \pm 0.04		
Pyrene	2.30 \pm 0.83	0.46 \pm 0.02		
Methyl-fluoranthenes/pyrenes	1.06	0.33		
Benzofluorenes ^b	0.89	0.13		
Benzo(a)anthracene ^c	0.44 \pm 0.12	0.07 \pm 0.01		
Chrysene + Triphenylene	0.67 \pm 0.18	0.15 \pm 0.00		
TOTAL PAHs	1,070.32	430.07		

^a Compound considered as "possibly carcinogenic to humans" (group 2B) by the IARC (3).

^b 1H-Benzo(a)fluorene+11H-Benzo(b)fluorene+11H-Benzo(c)fluorene

^c Compound considered as "probably carcinogenic to humans" (group 2A) by the IARC (2).

It must be noticed that the results presented here correspond to the outer part of the cheese pieces, including the rind, which represents approximately 60% of the whole piece in both cases. Therefore, **taking into account that the external part is the most contaminated** (5), **the values corresponding to the whole cheese would be lower**.

It is worth pointing out that the **non-smoked cheese also contains PAHs**, even though their **total concentration (34.08 $\mu\text{g}/\text{kg}$) is very low in comparison with the smoked samples**. The presence of PAHs in non smoked cheese has also been observed by other authors (6, 7), and maybe as a consequence of the contamination of the milk.

CONCLUSIONS

- 1.- **All the samples** of Herreño cheese studied **contain PAHs**; however, **the carcinogenic ones are practically absent**.
- 2.- **Non-smoked cheese can also contain PAHs**, but their concentrations are much lower than in smoked cheese.
- 3.- It would be advisable to **place the cheeses as far as possible from the smoke entrance** in the smokehouse, in order to reduce their PAH contamination degree.
- 4.- **The presence of PAHs in milk should be controlled**, in order to avoid the incorporation of these contaminants to cheese.

REFERENCES

1. Maga, J.A. (1988) *Smoke in Food Processing*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
2. IARC (1983) *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*. Vol. 32. Lyon, France.
3. IARC (2002) *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*. Vol. 82. Lyon, France.
4. Orden de 29 de noviembre de 1985. B.O.E. 292, 6-12-1985.
5. Guillén, M.D.; Sopelana, P. (2004) *J. Dairy Sci.*, 87: 556-564.
6. Bosses, J.O.; Butikofer, U.; Dafflon, O.; Koch, H.; Scheurer-Simonet, L.; Sieber, R. (1998) *Sci. Aliments*, 18: 347-359.
7. Pagliuca, G.; Gazzotti, T.; Zironi, E.; Serrazanetti, G.P.; Mollica, D.; Rosmini, R. (2003) *J. Agric. Food Chem.*, 51: 5111-5115.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge the financial support of the Ministerio de Ciencia y Tecnología (AGL2003-01838: CAL02-075-C3-2). G. Palencia thanks the University of the Basque Country for a predoctoral fellowship.

2º CONGRESO INTERNACIONAL DE AUTOCONTROL Y SEGURIDAD ALIMENTARIA, 2005.

Una Comunicación en forma de Póster.

-M^a Dolores Guillén, Gemma Palencia, Begoña Abascal, Patricia Sopelana y M. L. Ibargoitia.

“La seguridad del queso referida a la presencia de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos. Control de estos contaminantes”.

**LA SEGURIDAD DEL QUESO REFERIDA A LA PRESENCIA DE
HIDROCARBUROS AROMATICOS POLICICLICOS. CONTROL DE ESTOS
CONTAMINANTES**

M.D. Guillén*, G. Palencia, B. Abascal, P. Sopelana y M. L. Ibargoitia

Tecnología de Alimentos, Facultad de Farmacia, Universidad del País Vasco

Facultad de Farmacia, Paseo de la Universidad, 7, 01006-Vitoria; Tfno.: 945013081; E-mail:

knpgulod@vf.ehu.es

Análisis de la Situación Actual. Desde hace tiempo, la Legislación Española (1) contempla la necesidad de controlar la seguridad del queso madurado ahumado en relación a la presencia de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs), y establece un máximo de 10 µg/Kg de Benzo(a)pireno (B(a)P) en su corteza; sin embargo, no indica cuál debe ser la metodología para llevar a cabo tal determinación. Asimismo, tanto la Legislación Española como la Europea contemplan (2) la necesidad de controlar la presencia de estos contaminantes en alimentos ahumados con aromas de humo, si bien, en nuestro país, el ahumado del queso mediante esta técnica está prohibido por ley. Recientemente, la Unión Europea ha promulgado un Reglamento (3) en el que se incide en la necesidad de controlar y fijar niveles máximos de HAPs en algunos alimentos, entre los cuales no se encuentra el queso; tampoco este Reglamento hace referencia a la metodología a seguir. De hecho, actualmente se emplean métodos muy diversos para la determinación de HAPs en alimentos, algunos de los cuales se centran únicamente en B(a)P o en un número reducido de estos contaminantes, seleccionados en función de su grado de carcinogenicidad. No obstante, son muy pocos los HAPs cuya carcinogenicidad ha sido evaluada y muchos los que pueden contaminar los alimentos (4).

Aspectos Nuevos sobre la Seguridad de Quesos en Relación con la Presencia de HAPs. Al estudiar la presencia de estos contaminantes en quesos curados y no curados hemos observado que el límite fijado en la Orden española de 1985 (1) no tiene valor práctico ya que ni siquiera en las muestras mas contaminadas se han encontrado concentraciones tan altas. También se ha confirmado que los quesos ahumados con humo (5), bien industrialmente o artesanalmente,

contienen HAPs, en la mayoría de los casos en bajas concentraciones, especialmente de los HAPs más pesados. No obstante, hay que añadir que, sorprendentemente, también hemos detectado estos contaminantes en quesos no ahumados. Asimismo, hemos estudiado la presencia de HAPs en quesos ahumados con aromas de humo, cuyo grado de contaminación es, en general, significativamente menor que en los quesos ahumados con humo.

Aspectos Nuevos sobre los Métodos Empleados en el Control de HAPs en Queso. Estamos trabajando con dos tipos de métodos. Por un lado, hemos desarrollado una metodología para la determinación precisa de estos contaminantes en queso, a partir de un método utilizado para estudiar otras matrices alimentarias; este método es laborioso, y exige mucho tiempo (5). Por otra parte, estamos evaluando la capacidad de una metodología rápida y sencilla (6), (aplicable a modo de screening), que permita distinguir las muestras que requieren un estudio más exhaustivo.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el MCYT (AGL2003-01838 y CAL02-075-C3-2). G. Palencia agradece a la UPV la concesión de una beca predoctoral.

Referencias

- (1) Orden de 29 de noviembre de 1985. *BOE*, N° 292, 6.12.1985.
- (2) Directiva 88/388/CEE del Consejo de 22 de junio de 1988. *Diario Oficial*, L 184, 15.07.1988.
- (3) Reglamento (CE) N° 208/2005 de la Comisión de 4 de febrero de 2005. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 34, 8.02.2005.
- (4) Guillén, M. D.; Sopelana, P. (2003) Food Safety: contaminants and toxins. J. P. F. D'Mello, ed. CABI Publishing, Oxon, United Kingdom.
- (5) Guillén, M.D.; Sopelana, P. (2004) *J. Dairy Sci.*, 87, pp. 556-564.
- (6) Guillén, M.D.; Sopelana, P. (2005) *J. Dairy Sci.*, 88, pp. 13-20.

LA SEGURIDAD DEL QUESO REFERIDA A LA PRESENCIA DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS. CONTROL DE ESTOS CONTAMINANTES

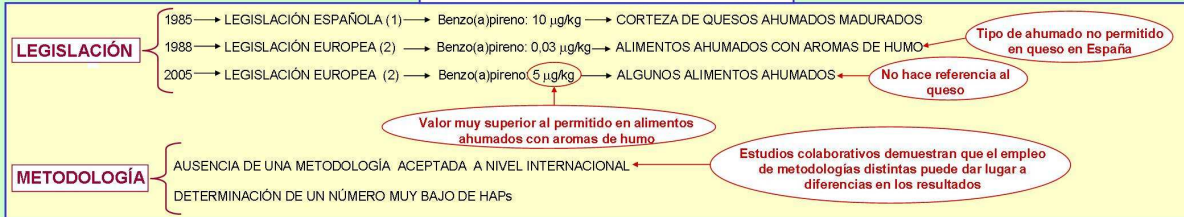


M.D. Guillén*, G. Palencia, B. Abascal, P. Sopelana y M. Ibargoitia
 Tecnología de Alimentos, Facultad de Farmacia, UPV
 Paseo de la Universidad, 7, 01006 Vitoria
 Teléfono: 945-013081; Fax: 945-013014; E-mail: mariadolores.guillen@ehu.es

INTRODUCCIÓN

Los **HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (HAPs)** constituyen un amplio grupo de carcinógenos y/o cocarcinógenos ampliamente distribuidos en la biosfera y en los alimentos. Dado que estos últimos han sido considerados como una de las principales fuentes de exposición del hombre a los HAPs, la presencia de estos contaminantes en alimentos debe ser evitada y controlada. Para ello, existen una serie de disposiciones legales que, sin embargo, no resultan suficientes para garantizar la seguridad de los alimentos y, en este caso concreto, del queso. Por ello, es necesario hacer un análisis de la situación actual y reconsiderar ciertos aspectos, con el fin de llegar a establecer medidas realmente eficaces que permitan minimizar el riesgo derivado de la presencia de HAPs en alimentos.

ANÁLISIS DE LA SITUACIÓN ACTUAL



ASPECTOS NUEVOS SOBRE LA SEGURIDAD DEL QUESO EN RELACIÓN CON LA PRESENCIA DE HAPs

ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE HAPs EN QUESO

Se ha estudiado la presencia de HAPs en diversos tipos de queso: madurados y frescos, ahumados con humo y con aromas de humo, y quesos sin ahumar. La Tabla 1 muestra algunos de los resultados obtenidos. En ella se observa lo siguiente:

- Tanto los quesos ahumados como los quesos sin ahumar contienen numerosos HAPs, cuya concentración total varía mucho de unos a otros.
- A pesar de que la orden española de 1985 (1), que es la única disposición aplicable al queso en nuestro país, se centra exclusivamente en benzo(a)pireno, las muestras estudiadas contienen muchos otros HAPs, la mayoría de ellos ligeros. De hecho, el HAP más abundante es naftaleno, recientemente clasificado como "posiblemente carcinógeno en humanos" (grupo 2B) por la IARC (5).
- Hay una alta proporción de HAPs alquilados, no considerados ni en los estudios existentes ni en la legislación, aun cuando se ha señalado que la presencia de grupos alquilados puede conferir o intensificar el potencial carcinógeno de los HAPs (6).
- A pesar de que en España el ahumado de queso con aromas de humo está prohibido por ley, los quesos así ahumados pueden contener niveles de HAPs inferiores a los de otros ahumados con humo.
- Los quesos sin ahumar pueden presentar concentraciones de HAPs del mismo orden o incluso más altas que las de algunos quesos ahumados.

MÉTODOS PARA EL CONTROL DE HAPs EN QUESO

En general, la determinación de HAPs en matrices complejas como son los alimentos, y, en concreto, el queso, requiere el empleo de metodologías largas y laboriosas (7). Por esta razón, y dada la necesidad de controlar los niveles de estos contaminantes, se han estudiado las posibilidades de una técnica que se caracteriza por su rapidez y sencillez: la microextracción en fase sólida (SPME).

Los estudios realizados hasta la fecha parecen indicar que, aun cuando la SPME no permite determinar todos los HAPs presentes en muestras de queso, tal vez podría servir como herramienta de screening en análisis de rutina (8).

Tabla 1. HAPs identificados en la parte más externa de algunas de los quesos estudiados y sus concentraciones, en µg/kg de parte exterior. Los resultados vienen dados como valor medio ± desviación estándar.

HAP	AHUMADO-HUMO		AHUMADO-AROMAS	SIN AHUMAR	
	AH1	AH2	AA	SA1	SA2
Naftaleno ¹	133,22 ± 22,38	7,10 ± 0,82	46,55 ± 3,48	35,64 ± 0,68	7,00 ± 0,26
Metilnaftalenos	275,79 (2) ²	6,54 (2)	26,59 (2)	44,70 (2)	6,11 (2)
Dimetilnaftalenos	352,41 (5)	8,49 (5)	68,70 (5)	29,21 (5)	5,95 (3)
Acenafileno	15,77 ± 1,01	0,40 ± 0,18	9,83 ± 1,53	1,80 ± 0,45	0,25 ± 0,07
Acenafteno	7,02 ± 0,09	0,29 ± 0,17	1,86 ± 0,48	0,80 ± 0,05	0,62 ± 0,20
Fluoreno	22,73 ± 5,06	0,41 ± 0,00	11,81 ± 1,50	2,75 ± 0,82	0,23 ± 0,05
Fenantreno	19,35 ± 3,14	1,73 ± 0,09	27,18 ± 2,52	2,99 ± 0,64	1,03 ± 0,28
Antraceno	4,64 ± 1,12	0,18 ± 0,04	5,61 ± 0,57	—	0,03 ³
Metil-fenantrenos/-antracenos	23,28 (5)	2,36 (5)	21,46 (5)	4,98 (4)	1,86 (4)
Dimetilfenantrenos o isómeros	12,04 (5)	—	7,84 (5)	—	0,90 (3)
Fluoranteno	3,47 ± 0,65	0,50 ± 0,03	3,69 ± 0,31	0,72 ± 0,25	0,29 ± 0,07
Pireno	3,63 ± 0,68	0,33 ± 0,01	3,49 ± 0,16	0,59 ± 0,18	0,25 ± 0,01
Metil-fluorantenos/-pirenos	4,20 (6)	—	2,29 (6)	0,07 (1)	0,04
Benzofluorenos ⁴	2,07	—	2,12	—	—
Benzo(a)antraceno ⁵	0,80 ± 0,16	0,07 ± 0,02	0,45 ± 0,07	0,15 ± 0,00	—
Criseno + Trifenileno	1,15 ± 0,23	0,22 ± 0,13	0,75 ± 0,09	0,27 ± 0,06	0,13 ± 0,04
Benzo(b+h)fluorantenos	0,71	—	0,37	—	—
Benzo(a)fluoranteno	0,20 ± 0,07	—	0,04 ± 0,01	—	—
Benzo(e)pireno	0,29 ± 0,05	—	0,10 ± 0,02	—	—
Benzo(a)pireno	0,48 ± 0,08	—	0,16 ± 0,04	—	—
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0,19 ± 0,06	—	0,13 ± 0,03	—	—
Benzo(ghi)perileno	0,22 ± 0,06	—	0,11 ± 0,02	—	—
TOTAL	883,66	28,62	241,13	127,32	34,08

¹ Compuesto considerado como "posiblemente carcinógeno en humanos" (grupo 2B) según la clasificación de la IARC (4, 5).
² Número de isómeros dentro del grupo.
³ Identificado sólo en una de las muestras.
⁴ 11H-Benzo(a)fluoreno+11H-Benzo(b)fluoreno+11H-Benzo(c)fluoreno
⁵ Compuesto considerado como "probablemente carcinógeno en humanos" (grupo 2A) según la clasificación de la IARC (4).

CONCLUSIONES

1. LA LEGISLACIÓN RELATIVA A HAPs NECESITA DE UNA RENOVACIÓN CONTINUA PARA ADECUARSE A LOS NIVELES QUE PUEDEN ENCONTRARSE EN LOS ALIMENTOS Y AL RIESGO DE LOS MISMOS.
2. A PESAR DE QUE LAS NUEVAS DISPOSICIONES LEGALES Y RECOMENDACIONES DE LA COMISIÓN EUROPEA TIENDEN A CENTRARSE EN LOS HAPs MÁS PESADOS, **HABRÍA QUE PRESTAR ATENCIÓN TAMBIÉN A LOS HAPs LIGEROS**, QUE SON LOS MÁS ABUNDANTES EN LA MAYORÍA DE LOS CASOS.
3. ES NECESARIO PROFUNDIZAR Y AVANZAR EN EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE ESTOS CONTAMINANTES, YA QUE TODAVÍA SON POCOS LOS QUE HAN SIDO EVALUADOS Y MUCHOS LOS QUE SE ENCUENTRAN EN ALIMENTOS. EN ESTE SENTIDO, LOS COMPUESTOS ALQUILADOS DEBERÍAN SER TENIDOS EN CUENTA, PUESTO QUE REPRESENTAN UNA ALTA PROPORCIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE HAPs.
4. EL LÍMITE DE 10 µg/kg FIJADO PARA BENZO(A)PIRENO EN LA ORDEN ESPAÑOLA REFERENTE A QUESOS AHUMADOS MADURADOS PARECE TENER **ESCASO VALOR PRÁCTICO**, YA QUE NI SIQUERA LAS MUESTRAS MÁS CONTAMINADAS PRESENTAN CONCENTRACIONES TAN ALTAS. ADEMÁS, ESTE LÍMITE HACE REFERENCIA ÚNICAMENTE A LA CORTEZA DEL QUESO QUE, POR OTRA PARTE, NO SUELE CONSUMIRSE.
5. DEBE ESTABLECERSE UNA **METODOLOGÍA ÚNICA PARA LA DETERMINACIÓN DE HAPs EN ALIMENTOS**, QUE PERMITA COMPARAR RESULTADOS Y DETERMINAR TODOS LOS HAPs QUE PUEDEN ENCONTRARSE EN ESTE TIPO DE MATRIZ, INCLUIDOS LOS COMPUESTOS ALQUILADOS.
6. ES NECESARIO CONTROLAR NO SÓLO LOS PROCESOS DE PRODUCCIÓN DE LOS ALIMENTOS, SINO TAMBIÉN LAS MATERIAS PRIMAS, YA QUE UNA DE LAS POSIBLES FUENTES DE HAPs EN QUESO SIN AHUMAR ES PRECISAMENTE LA LECHE DE PARTIDA.

BIBLIOGRAFÍA

1. Orden de 29 de noviembre de 1985. *Boletín Oficial del Estado*, nº 292, 6.12.1985.
2. Directiva 88/388/CEE del Consejo de 22 de junio de 1988. *Diario Oficial*, nº L 184, 15.07.1988.
3. Reglamento (CE) Nº 208/2005 de la Comisión de 4 de febrero de 2005. *Diario Oficial de la Unión Europea*, nº L 34, 8.02.2005.
4. IARC (1983). *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans*. Vol. 32, Lyon, France.
5. IARC (2002). *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*. Vol. 82, Lyon, France.
6. Irwin, R.J.; VanMouwenik, M.; Stevens, L.; Seese, M.D.; Basham, W. (1998) *Environmental Contaminants Encyclopedia*. National Park Service, Water Resources Division, Fort Collins, Colorado (www.nps.gov).
7. Guillén, M.D.; Sopelana, P. (2004) *J. Dairy Sci.*, 87: 558-564.
8. Guillén, M.D.; Sopelana, P. (2005) *J. Dairy Sci.*, 88: 13-20.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación concedida por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCYT AGL2003-01838). G. Palencia agradece a la Universidad del País Vasco la concesión de una beca predoctoral.

4th EURO FED LIPID CONGRESS, 2006.

Una Comunicación en forma de Póster.

-M^a Dolores Guillén, Gemma Palencia, Encarnación Goicoechea, Nerea Cosmes.

“Demonstration for the first time of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the oxidation of edible oils”.

Demonstration for the First Time of the Formation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Oxidation of Edible Oils.

M.D. Guillén*, G. Palencia, E. Goicoechea and N. Cosmes

Tecnología de Alimentos, Facultad de Farmacia, Universidad del País Vasco

01006, Vitoria, Spain. knpgulod@vf.ehu.es

The oxidation of edible oils provokes the formation of different types of secondary oxidation products whose concentrations and natures depend on both the oxidative conditions under which the oil is submitted and its nature. Recently, the formation of toxic oxygenated aldehydes (TOAs) such as 4-hydroperoxyalkenals, 4-hydroxyalkenals, and 4,5-epoxyalkenals has also been shown (1, 2); some of these genotoxic and citotoxic oxygenated aldehydes have been detected in cells and tissues as coming from stress oxidative processes suffered by membrane lipids (3). However, to the best of our knowledge, until now, the formation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in oxidation processes of triglycerides or of oils has not been reported, although these compounds had been found in tissues of wild fish from pristine areas, or in some foods in which the possibility of contaminati can be considered remote.

In a previous study about the oxidation level reached by different sunflower oils, stored for different periods of time, at room temperatura, in presence of limited amounts of air, a posible relationship was observed between the concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons and the oxidation level reached (4). In order to prove if these kinds of toxic contaminants were really produced in the oxidation process, the study of the oxidation level of one sunflower oil, stored at room temperature in different closed receptacles having different proportions of oil and air was carried out; in addition, the determination of the concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons was also determined. The results obtained have shown that the concentration of HAPs was higher in the sunflower oil simple in which the oxidation was in a most advanced stage, showing for the first time that in the oxidation of sunflower oil at room temperatura in presence of limited amounts of air the formation of

HAPs takes place, which opens a new perspective in relation to the origin of these toxic compounds and their presence in some foods.

References

1. Guillén M.D., Cabo N., Ibargoitia M.L. and Ruiz A. (2005). *J. Agric. Food Chem.* 53, 1093-1101.
2. Guillén M.D., and Ruiz A. (2005). *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 107, 36-47.
3. Esterbauer H., Schaur R.J. and Zollner H. (1991). *Free Rad. Biol. Med.* 11, 81-128.
4. Guillén M.D., and Goicoechea E. (2005). **III Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos.** Burgos (Spain).

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support of the MCYT (AGL2003-01838) and of the University of the Basque Country (GIU05/25). G. Palencia and E. Goicoechea thanks the the Basque Country University and the Basque Government respectively, for a predoctoral fellowship.

DEMONSTRATION FOR THE FIRST TIME OF THE FORMATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN THE OXIDATION OF EDIBLE OILS



Universidad del País Vasco
Euskal Herriko Unibertsitatea
The University of the Basque Country

M.D. Guillén*, G. Palencia, E. Goicoechea and N. Cosmes
Tecnología de Alimentos, Facultad de Farmacia, U.P.V.
Paseo de la Universidad, 7, 01006 Vitoria
Teléfono: 945-013081; Fax: 945-013014; *E-mail: knpgulod@vf.ehu.es

1. INTRODUCTION

The oxidation of edible oils provokes the formation of different types of secondary oxidation products, whose concentrations and nature depend on both the oxidative conditions to which the oil is submitted and on its nature. Recently, the formation of toxic oxygenated α,β -unsaturated aldehydes (O α BUAs), such as 4-hydroperoxyalkenals, 4-hydroxyalkenals, and 4,5-epoxyalkenals has been shown (1, 2). Some of these genotoxic and cytotoxic oxygenated aldehydes had previously been detected in cells and tissues as coming from stress oxidative processes suffered by membrane lipids (3). However, to the best of our knowledge, the formation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in oxidation processes of triglycerides or of oils has not been reported until now, although these compounds had been found in tissues of wild fish from uncontaminated areas, or in some foods in which the possibility of contamination can be considered remote.

In a previous study on the oxidation level reached by different sunflower oils, stored for various periods of time, at room temperature, in presence of limited amounts of air, a possible relationship was observed between the concentration of PAHs and the oxidation level reached (4). In order to test if these kinds of toxic contaminants are really produced in the oil oxidation process, the study of the gas and liquid phases of one oil stored at room temperature, during a certain period of time, in closed receptacles having two different oil/air ratios was carried out. In addition, the concentration of PAHs in both samples was determined in order to test if this is related to the oxidation degree of the sample.

2. SAMPLES

The study was carried out with sunflower oil acquired in a local supermarket stored at room temperature over a long period of time in two different closed receptacles, R1 and R2, being the oil/air ratios different in each receptacle.

3. METHODOLOGY

The study of the oil samples headspace composition was carried out by solid phase microextraction followed by gas chromatography/mass spectrometry (SPME-GC/MS) (1), the study of the oil samples liquid phase composition by ^1H nuclear magnetic resonance (^1H NMR) (2), and the determination of the polycyclic aromatic hydrocarbons in the oil liquid phases was carried out as in previous studies (5).

4. RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 shows the region comprised between 8.3 and 10 ppm of the ^1H NMR spectra of R1 and R2 oil samples. It can be observed that R2 is in a much more advanced oxidation stage than R1, having in its liquid phase significant proportions not only of primary (hydroperoxydes; broad signal between 8.5 and 8.7 ppm) but also of secondary (aldehydes; signals between 9.4 and 9.8 ppm) oxidation compounds; whereas R1 spectrum only shows the presence of primary oxidation compounds (hydroperoxydes; signals centred near 8.6 ppm).

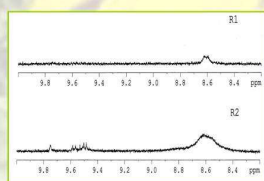


Figure 1. Region between 8.3 and 10 ppm of the ^1H NMR spectra of R1 and R2 oil samples

Figure 2 gives the GC/MS chromatogram of the headspace of samples R1 and R2. It can be observed that, in agreement with the results obtained from the study of oils liquid phases by ^1H NMR, the headspace of R2 sample contains more compounds and in greater concentration than the headspace of sample R1, due to the higher oxidation level of the first sample.

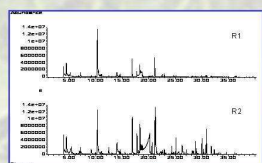


Figure 2. GC/MS chromatograms of the headspace of R1 and R2 oil samples

Table 1 shows as examples the concentrations expressed as area counts multiplied by 10^6 of some compounds present in the headspace of both samples. Among them there are all the well known secondary oxidation compounds, including some oxygenated α,β -unsaturated aldehydes, as well as, a very large number of aromatic hydrocarbons (benzene and many different alkylbenzene derivatives) and some PAHs, all these groups of compounds being in much higher concentration in the R2 headspace than in the R1, in agreement with the higher oxidation degree reached by the first oil sample.

Given that R1 and R2 samples were taken from the same original sunflower oil sample, and that both initially contained the same concentrations of aromatic and polyaromatic hydrocarbons, together with the fact that after storage R2 headspace contains higher concentrations of these compounds than R1 headspace, it suggests that these hydrocarbons are generated in the oxidation process.

Table 1. Concentrations of some of the compounds found in the headspaces of R1 and R2 samples expressed in area counts multiplied by 10^6

Compounds	R1 (Area counts $\cdot 10^6$)	R2 (Area counts $\cdot 10^6$)
Hexan-1-ol	138.58	120.04
1-octanol	18.62	38.82
trans-2-hexenal	28.58	88.20
trans-2-octenal	23.45	131.35
cis/trans-decadienal	2.54	38.42
trans/trans-decadienal	4.94	88.61
4-oxo-trans-2-nonenal	0.62	1.52
4-hydroxy-trans-2-nonenal	0.55	6.52
4-hydroxy-trans-2-nonenal	0.68	10.61
1-methylbenzene	10.80	30.49
1,2-dimethylbenzene	2.50	64.66
1-methyl-3-ethylbenzene	1.53	29.19
1,2,3-trimethylbenzene	0.12	1.52

In order to support these results, the PAHs concentrations in the liquid phase of both oil samples were determined and the results obtained for some of these compounds are given in Table 2. As can be seen, the concentration of PAHs in the liquid phase of the R2 sample is much higher than in the liquid phase of the R1 sample.

Table 2. Concentrations given in $\mu\text{g/kg}$ of the PAHs found in R1 and R2 samples.

PAHs	R1 ($\mu\text{g/kg}$)	R2 ($\mu\text{g/kg}$)
Benzo[a]anthracene	2595.3	9421.387
2-Methylfluoranthene	2054.2	525.0485
1-Methylfluoranthene	3828.8	598.15851
7,8-Dimethylfluoranthene	792.7	586.13
1,2-Dimethylfluoranthene	184.1	684.17
1,6-Dimethylfluoranthene	2662.7	4794.9155
1,4-Dimethylfluoranthene	171.2	815.3
1,5-Dimethylfluoranthene	86.2	661.9
Acenaphthene	108	121.6
Fluorene	2622.8	13379.3184
Phenanthrene	121.2	88.1
6-Fluorophenyl	6525	185.87
3-Methylphenanthrene	82.7	182.1
2-Methylphenanthrene	111.3	182.3
4-Methylphenanthrene	111.3	181.3
5-Methylphenanthrene	214	191.2
7,8-Dimethylphenanthrene	142.6	191.6

The results obtained from the headspaces are in agreement with the results obtained from the liquid phases of both oils.

In short, taking into account that R1 and R2 samples come from the same oil and the same initial composition, and that they have reached different oxidation degree and also different level of PAHs, it is evident that this oxidation process provokes the formation of aromatic and polyaromatic hydrocarbons, in addition to the other well known oxidation products.

5. CONCLUSIONS

- To the best of our knowledge, this is the first time that the formation of aromatic and polyaromatic hydrocarbons in an oxidation process is proved.
- During the storage of sunflower oil in closed receptacles in presence of limited amounts of air, during prolonged periods of time, its oxidation can be produced generating not only well known oxidation compounds, but also aromatic and polyaromatic hydrocarbons.

6. REFERENCES

- Guillén M.D., Cabo N., Ibargoitia M.L. and Ruiz A. (2005). J. Agric. Food Chem. 53, 1093-1101.
- Guillén M.D., and Ruiz A. (2005). Eur. J. Lipid Sci. Technol. 107, 36-47.
- Esterbauer H., Schaur R.J. and Zollner H. (1991). Free Rad. Biol. Med. 11, 81-128.
- Guillén M.D., and Goicoechea E. (2005). III Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Burgos (Spain)
- Guillén, M.D.; Soplana, P.; Palencia, G. (2004). J. Agric. Food Chem. 52: 2123-213.

7. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge the financial support of the MCYT (AGL2003-01838), of the University of the Basque Country (GIU05/25) and of the Departamento de Agricultura, Pesca y Alimentación del Gobierno Vasco. G. Palencia and E. Goicoechea thank the Basque Country University and the Basque Government respectively, for a predoctoral fellowship.

