

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

**ESCUELA TECNICA SUPERIOR DE INGENIEROS INDUSTRIALES Y DE
TELECOMUNICACIÓN**

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y QUÍMICA INORGÁNICA



**SEPARACIÓN DE AROMAS EN ETAPAS DEL PROCESADO DE
ZUMOS DE FRUTAS Y BEBIDAS**

Memoria de tesis para optar al grado de Doctor

Directoras de Tesis:

Dra. Inmaculada Ortiz Uribe

Dra. Ane Miren Urtiaga Mendía

Presentada por la Ingeniera Química:

Nazely Diban Gómez

Santander, Abril 2008

Capítulo 2.

Casos de Estudio. Frutas y Compuestos

“Las ciencias tienen raíces amargas, pero muy dulces los frutos”

Aristóteles, filósofo griego (384-322a.C.)

El objeto de estudio de este trabajo se centra en la recuperación y concentración de aromas de fruta. Puesto que en los zumos de fruta el disolvente de sus componentes (azúcares, aromas y demás) es el agua, se ha trabajado con disoluciones sintéticas o modelo que contienen el aroma impacto característico de la fruta a estudiar disuelto en una mezcla agua/etanol empleada como disolvente. La adición de etanol en mayor o menor medida es necesaria para solubilizar adecuadamente el compuesto aromático objeto de estudio. Se han seleccionado aromas impacto de dos frutas diferentes debido a sus diferentes propiedades, interés comercial y novedad científica: la pera y el arándano.

A continuación se procederá a plantear la importancia de las frutas seleccionadas para este estudio, la caracterización de sus aromas y la selección de los aromas impacto, así como la descripción de los reactivos y los equipos y métodos analíticos empleados tanto para la determinación cualitativa como para su cuantificación.

1. Frutas seleccionadas y sus aromas: caracterización y análisis

1.1. La pera

La pera (*Pyrus communis* L.) pertenece, junto con la manzana y el membrillo, al grupo de frutas conocidas como frutas “pome” (Morton & Macleod, 1990). Esta fruta pertenece a la familia de las Rosáceas, que incluye más de 2.000 especies de plantas herbáceas, arbustos y árboles distribuidos por regiones templadas de todo el mundo. Su forma depende de la variedad que se trate, así como su sabor, textura y color, que va desde el amarillo hasta el verde pasando por el rojo y el pardo. Se consumen tanto como frutas de mesa, como procesadas.

En la Figura 2.1 se recogen los datos estadísticos de la producción mundial de pera en el año 2005. Se observa como España ocupa el cuarto lugar por detrás de China, Italia y Estados Unidos.

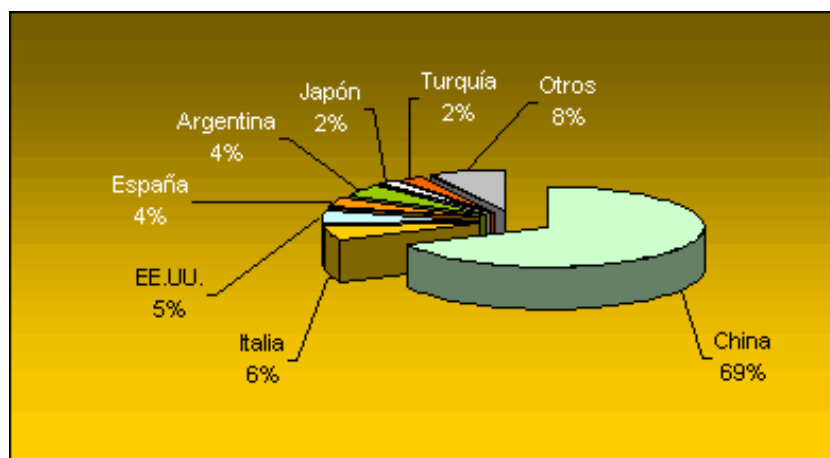


Figura 2.1. Producción mundial de pera fresca en 2005. Fuente: Dirección de Industria Alimentaria de Argentina sobre la base de datos del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (United States Department of Agriculture, USDA).

En España en 2004 se produjeron un total de 609.461 Tm de peras y 639.809 Tm en 2005, y las comunidades con mayor nivel de producción fueron Cataluña y Aragón (Anuario de

Estadística Agroalimentaria 2006, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España). Las exportaciones de pera por parte de España son muy superiores a las importaciones, así por ejemplo, en 2005 las exportaciones al resto del mundo fueron 148.365 Tm mientras que las importaciones sólo alcanzaron las 56.427 Tm, siendo nuestro principal comercio con el resto de países de la Unión Europea.

1.1.1. Identificación de los aromas de pera

Se encuentran pocos trabajos centrados sobre el aroma de la pera. Los primeros cromatogramas se publicaron en 1961 por Buttery & Teranishi, y posteriormente se hicieron análisis de esencia de pera mediante cromatografía HPLC (High Performance Liquid Chromatography) (Russel et al., 1981; Quamme, 1984). En la Tabla 2.1 se recoge una revisión bibliográfica de trabajos que tratan sobre la identificación de los aromas característicos de la pera:

Tabla 2.1. Revisión bibliográfica de análisis de compuestos volátiles de pera (Morton & Macleod, 1990).

Referencia	Preparación de la muestra	Tipo de análisis	Especie de pera
Buttery & Teranishi (1961)	Vapor	GC	Comice d'Anjou
Gascó et al. (1969)	Concentración de zumo	GC	—
Heinz & Jennings (1966)	Esencia	GC, IR	Bartlett
Jennings & Tressl (1974)	Trampa Porapak	GC	Bartlett
Paillard et al. (1970)	Trampa fría	GC	Passe-Crassane
Quamme (1984)	Destilación-extracción	HPLC	Varios tipos
Romani & Ku (1966)	Headspace	GC	Bartlett
Russel et al. (1981)	Destilación-extracción	GC, HPLC	Varios tipos
Strandjev (1982)	Esencia	GC	Beurré Will., Passe-Crassane

En estos trabajos, se encuentra que entre los compuestos más identificados, están presentes los ésteres, principalmente los metil y etil ésteres, y los alcoholes de cadena C₁-C₈. El olor de la pera es muy discreto y contiene altas proporciones de constituyentes de alto peso molecular. Jennings & Sevenants (1964) y Suwanagul & Richardson (1998) encontraron que los ésteres del ácido 2,4- decanoico eran aromas impacto del olor de pera Bartlett y que poseen un fuerte aroma a pera. El etil trans-2-cis-4-decadienoato se identificó como constituyente típico del olor de la pera Bartlett. En el cromatograma de la fracción volátil del extracto de éter los picos más abundantes son los del metil y el etil trans-2-cis-4-decadienoato (Heinz et al., 1966). Estudios de cromatografía de gases, HPLC y evaluación sensorial han mostrado que altas concentraciones de decadienoatos son características de la pera Bartlett y de otras variedades con aroma similares (Quamme, 1984).

De forma adicional a los resultados en la literatura, en este trabajo se procedió a la determinación cualitativa de los compuestos aromáticos de la variedad de pera Bartlett. Se emplearon procedimientos analíticos desarrollados a partir de métodos descritos en investigaciones previas (Cigić et al., 1999; Chervin et al., 2000) para el análisis de perfiles aromáticos de pera Bartlett identificando grupos de ésteres, alcoholes, hidrocarburos, aldehídos y cetonas.

Para la extracción de los aromas, se empleó la técnica de micro-extracción en fase sólida empleando una fibra de SPME (solid-phase micro-extraction) con fase estacionaria de polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 µm de espesor de recubrimiento de la casa comercial Sigma-Aldrich. La fibra es acondicionada mediante desorción térmica en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases a una temperatura de 250°C durante 30 minutos. Después de acondicionada, la fibra se retrae en la aguja y se retira del puerto de inyección.

Las peras fueron compradas en establecimientos de venta de alimentos en estado comercial de madurez, se licuaron, el zumo se filtró (filtro Supelco de 0.45 µm) y se

tomaron 20 mL que fueron introducidos en un vial de cromatografía de 20 mL de capacidad. El vial fue cerrado herméticamente mediante un tapón con septum de silicona/Teflón. Se introdujo el vial en un baño a 50°C durante 10 minutos. Después se insertó la fibra de SPME en el vial durante 30 minutos a 50°C. La desorción de los aromas en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases (GC) se hizo a 250°C durante 5 minutos empleando un flujo de helio de 1 mL min⁻¹ como gas portador o carrier.

La identificación de los compuestos volátiles se llevó a cabo mediante cromatografía de gases con detector de espectrómetro de masas (GC-MS). El equipo empleado fue un cromatógrafo Hewlett Packard 6896 con un espectrómetro de masas de cuadrupolo 5973. Se utilizó una columna de cromatografía de gases de alta resolución DB-Wax (30 m x 0.25 mm ID x 0.25 µm de película de fase estacionaria) de la casa Agilent J&W. Se usó helio como carrier a 1 mL min⁻¹ y una relación de split de 1:50. El programa de temperatura del horno sigue la secuencia 2 minutos a 45°C, se calienta hasta 180°C a una velocidad de 3°C min⁻¹ y se mantiene a 250°C durante 3 minutos más. La temperatura del inyector fue de 250°C y las temperaturas de la fuente de iones y del cuadrupolo fueron 170 y 130°C respectivamente. La ionización de la muestra se produce mediante impacto electrónico con una energía de electrón de 70 eV.

Para la adquisición de datos del espectrómetro de masas se empleó el software ChemStation y los espectros de masa se compararon con los almacenados en la librería NIST para identificar los compuestos. Para la confirmación de la presencia de 2,4-decadienoato de etilo, adicionalmente se analizó una muestra de pera licuada dopada con el compuesto adquirido como reactivo analítico. En la Figura 2.2 se muestra el cromatograma obtenido del análisis anteriormente descrito. Se identificaron 5 picos mayoritarios: (1) acetato de butilo, $t_{R}= 1.5$ min, (2) acetato de hexilo, $t_{R}= 10.5$ min, (3) 2,4-decadienoato de metilo, $t_{R}= 32$ min, (4) 2,4-decadienoato de etilo, $t_{R}= 33.7$ min, (5) 1,3-dihidroxiopropanona, $t_{R}=41.5$ min. Estos resultados confirman la presencia del 2,4-decadienoato de etilo y están de acuerdo con otros trabajos sobre la autenticación del

aroma de pera usando como técnica analítica cromatografía de gases con espectrometría de masa con relación de isótopos (Kahle et al., 2005).

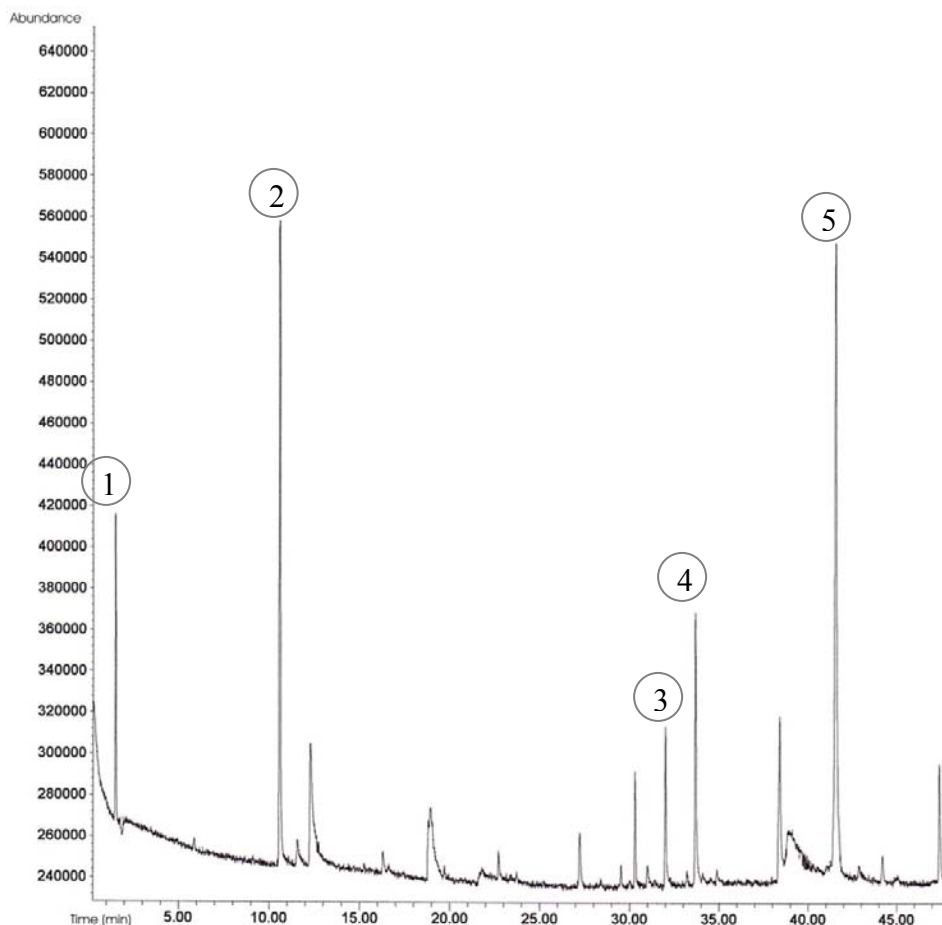


Figura 2.2. Cromatograma GC-MS del análisis cualitativo de los compuestos volátiles constituyentes del aroma característico de la pera Bartlett. Picos identificados: (1) acetato de butilo (1.5 min), (2) acetato de hexilo ($t_R= 10.5$ min), (3) 2,4-decadienoato de metilo ($t_R= 32$ min), (4) 2,4-decadienoato de etilo ($t_R= 33.7$ min), (5) 1,3-dihidroxiopropanona ($t_R=41.5$ min).

1.1.2. Cuantificación del 2,4-decadienoato de etilo

La concentración de trans-2-cis-4-decadienoato de etilo presente en la pera varía mucho dependiendo del estado de madurez de la fruta y las condiciones de almacenamiento (López et al., 2001). Suwanagul & Richardson (1998) identificaron los compuestos aromáticos presentes en diferentes variedades de peras y determinaron su concentración. En la variedad de pera Barlett encontraron la presencia de una concentración de trans-2-cis-4-decadienoato de etilo expresada en masa de aroma por unidad de peso de muestra de fruta y por unidad de volumen de aire del espacio de cabeza de 478.2 ng/kg/100L, que representa el 1.9 % de la concentración de todos los aromas identificados. Riu-Aumatell et al. (2004) han llevado a cabo la evaluación del perfil aromático de los zumos de frutas y néctares de varias frutas, entre las que se encuentra la pera procedente tanto de España como de Italia. Llevan a cabo medidas semicuantitativas de los compuestos identificados encontrando que el contenido de trans-2-cis-4-decadienoato de etilo presente en el zumo de pera se corresponde con un 22.7 ± 12.7 % de la concentración del aroma total.

Valores absolutos de concentración son citados por Cigić & Zupančič-Kralj (1999), que hacen una evaluación sensorial del brandy de pera Barlett. Se determina que los componentes mayoritarios del aroma eran los ésteres del ácido decadienoico de etilo, y en concreto, indicaban rangos de concentración de trans-2-cis-4-decadienoato de etilo comprendidos entre 48-68 mg L⁻¹. Las concentraciones de este compuesto en la pera y sus productos derivados para el consumo se encuentran habitualmente en el rango de 0.01-10 mg kg⁻¹ (Natural Advantage, 2007).

Concentrados aromáticos de 150-*folds* y 3000-*folds* procedentes de la empresa Nufri han sido analizados para determinar la presencia del 2,4-decadienoato de etilo y poder determinar su concentración. Para analizar la concentración de 2,4-decadienoato de etilo se empleó la cromatografía de gases. El equipo empleado en la determinación analítica ha sido un cromatógrafo de gases modelo GC-2010 de la casa Shimadzu, con detector de ionización de llama (FID) y con inyector automático y carrusel de 150 viales. El equipo

permite la inyección de las muestras de forma automática. La columna utilizada es una DB-Wax, que posee polietilenglicol como fase estacionaria, de dimensiones 10 m x 0.10 mm x 0.20 μm , suministrada por la casa comercial Agilent Technologies (Madrid, España). El detector utilizado es de ionización de llama (FID). El detector consiste en un quemador de hidrógeno/oxígeno, donde se mezcla el efluente de la columna con hidrógeno.

Las características del método de análisis se resumen en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Parámetros característicos del método analítico de GC-FID del 2,4-decadienoato de etilo en el concentrado de aroma de pera real.

	Parámetro	Valor
Auto-muestreador	Volumen inyectado (μL)	1.0
	Volumen de limpieza con muestra (μL)	8
Inyector	Modo de inyección	Split
	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	250
	Gas portador	He
	Tipo de control de flujo	Velocidad constante
	Velocidad lineal (cm s^{-1})	50
	Relación de split	1:10
Horno	Temperatura inicial ($^{\circ}\text{C}$)	60
	Tiempo mantenida la Temp. inicial (min)	1
	Temperatura final ($^{\circ}\text{C}$)	230
	Tiempo mantenida la Temp. final (min)	1
	Velocidad de calentamiento ($^{\circ}\text{C min}^{-1}$)	35.0
Detector	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	300
	Gas makeup	N_2/Aire
	Flujo de N_2 (mL min^{-1})	35
	Flujo de aire (mL min^{-1})	350
	Flujo de H_2 (mL min^{-1})	30

Mediante estos análisis se determina que en el concentrado aromático de 150-*folds*, Figura 2.3, hay una gran presencia de la fracción más volátil de los aromas de pera, y se

observa que contiene una concentración aproximada de 2,4-decadienoato de etilo ($t_R=3.920$ min) de 15 mg kg^{-1} .

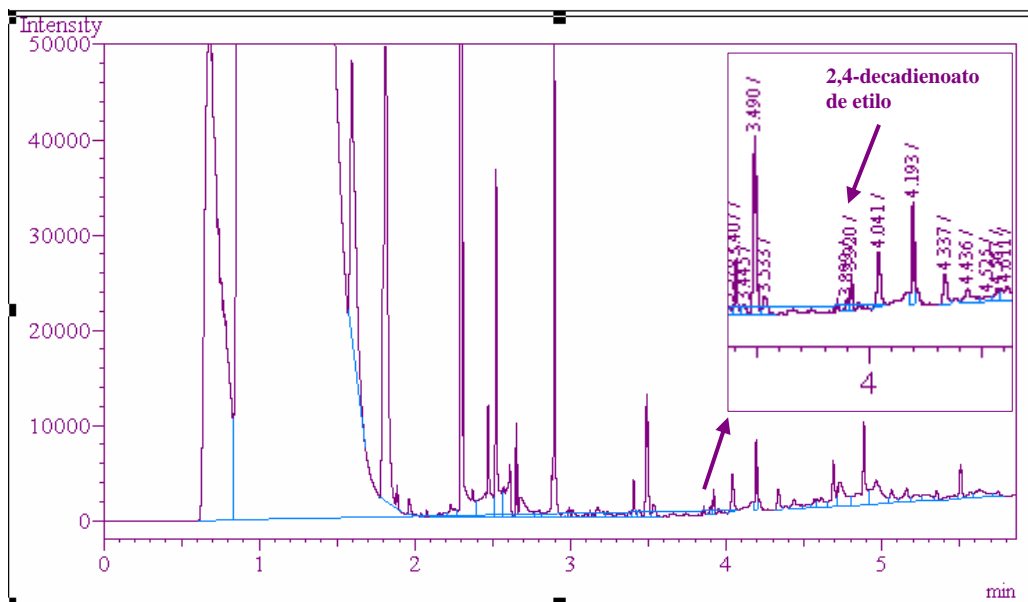


Figura 2.3. Cromatograma GC-FID del análisis de los compuestos volátiles del concentrado de aroma de pera de 150-*folds* de la empresa Nufri.

En el concentrado de 3000-*folds*, aumentan mucho las concentraciones de ciertos compuestos, sobre todo la fracción más volátil, Figura 2.4. En la zona donde debería estar el 2,4-decadienoato de etilo, los picos no se distinguen adecuadamente. Para comprobar la presencia del aroma impacto se dopa la muestra con el reactivo comprado a Sigma Aldrich. Se observa que el pico correspondiente al 2,4-decadienoato de etilo en la muestra dopada no coincide con ningún pico de la muestra sin dopar. Esto podría indicar que el 2,4-decadienoato de etilo es un compuesto pesado que tiene tendencia a ser arrastrado a los fondos de la columna de destilación utilizada en la etapa de recuperación de aromas.

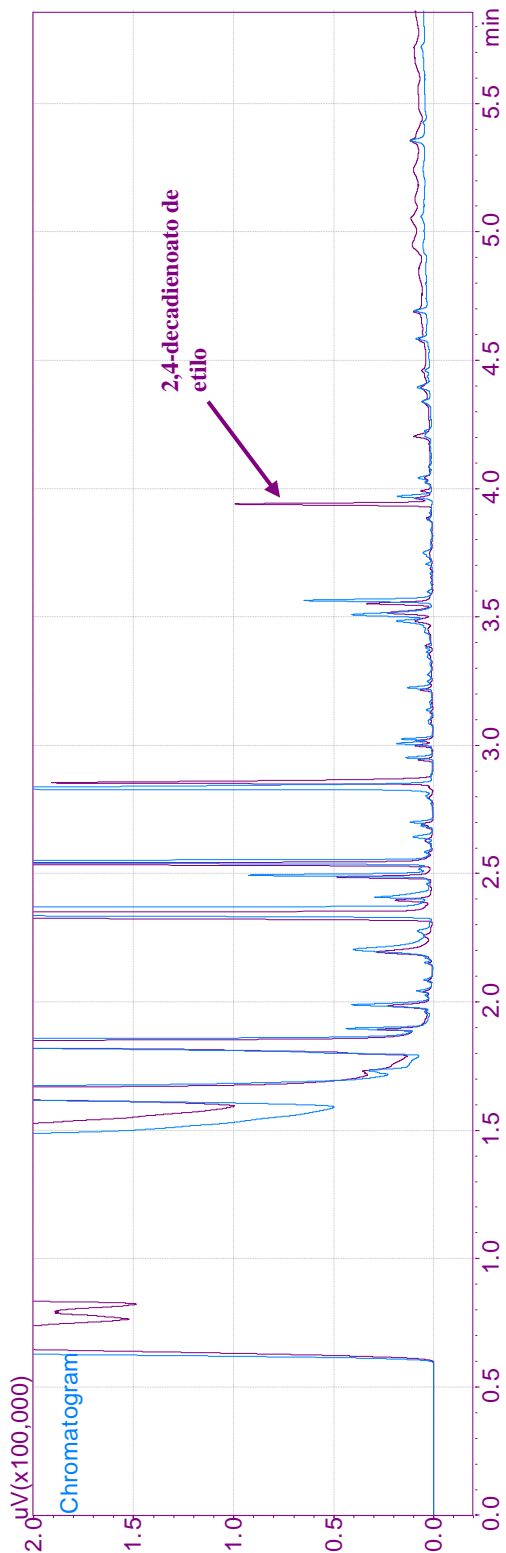


Figura 2.4. Comparación de cromatogramas del concentrado de aroma de pera a 3000-*folids* procedente de la empresa Nufri con y sin adición del compuesto de 2,4-decadienoato de etilo (—) muestra sin dopar, (—) muestra dopada.

1.1.3. Características del 2,4-decadienoato de etilo

Una vez estudiada la bibliografía y teniendo en cuenta los resultados analíticos obtenidos y mostrados en la Figura 2.2, se selecciona el 2,4-decadienoato de etilo como compuesto impacto de la pera para el estudio de su separación y concentración. Su estructura química se muestra en la Figura 2.5:



Figura 2.5. Estructura del 2,4- decadienoato de etilo

Debido a los dos dobles enlaces presentes en esta molécula, existen cuatro isómeros de la misma: trans-trans-; cis-cis-; cis-trans- y trans-cis-. Todos los isómeros descritos se pueden detectar y diferenciar fácilmente mediante cromatografía de gases. El isómero más abundante en el aroma de pera es, el 2-trans-4-cis- decadienoato de etilo y es el isómero que se ha empleado para realizar este estudio. Pocos datos se encuentran de este compuesto. En el Anexo I se incluyen las Hojas de datos de seguridad del mismo. Algunas de las propiedades físico-químicas del 2,4-decadienoato de etilo se recogen en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Propiedades físico-químicas del 2,4-decadienoato de etilo.

Número CAS	Peso molecular	Punto de ebullición	Densidad a 25 °C	Solubilidad en agua a 25 °C	Presión de vapor a 20 °C
3025-30-7	196.29 g mol ⁻¹	260 °C	902 g L ⁻¹	8 mg L ⁻¹	<0.008 mmHg

El valor de solubilidad fue obtenido experimentalmente. La metodología empleada se describe a continuación. Se toma un decantador de 25 mL. Se rellena con 20 mL de agua ultrapura Mili-Q (Millipore Corporation). Se cubre completamente la superficie con el aroma. Se deja en una estancia a 25°C durante 8 días. Una vez alcanzado el equilibrio de disolución se procede a separar la fase acuosa y se analiza mediante cromatografía de gases. Se repite el procedimiento 3 veces para calcular un valor promedio. Comparando el valor obtenido experimentalmente con el estimado con el programa EPI Suite™, desarrollado por la Corporación de Investigación de Siracusa (SRC) y la Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos (EPA) (copyright 2000), que es de 8.6 mg L⁻¹, se observa que es muy próximo. De los datos de presión de vapor obtenidos a diferentes temperaturas y que se han encontrado en diferentes fuentes, tales como Hojas de datos de seguridad (Anexo I), se puede representar la Figura 2.6, donde se observa que la presión de vapor, P^{sat} , cumple la ley de Antoine, y se puede extrapolar las presiones de vapor a otras temperaturas de operación. Calculando la presión de vapor a 25°C aplicando el ajuste representado en la Figura 2.8, se obtiene que $P^{sat}(25^{\circ}\text{C})= 0.013$ mmHg. Cuando se estima este valor con el programa EPI Suite™, $P^{sat}(25^{\circ}\text{C})= 0.017$ mmHg. Se puede observar pues la similitud entre los valores con ambos procedimientos.

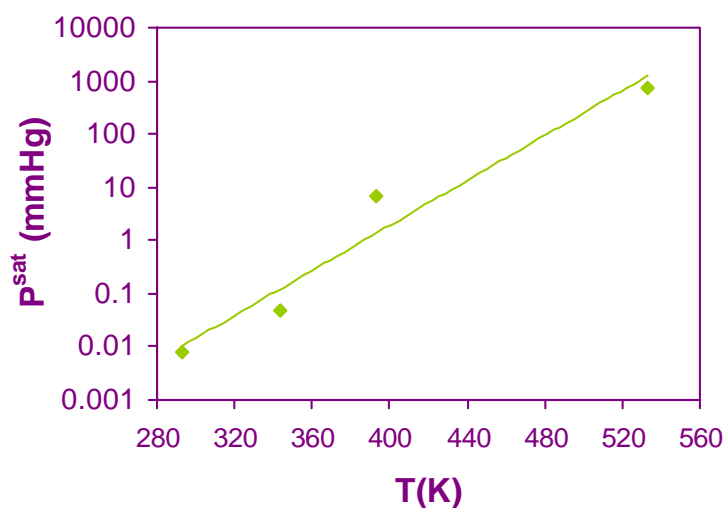


Figura 2.6. Dependencia de la presión de vapor, P^{sat} , del 2,4-decadienoato de etilo con la temperatura según la ley de Antoine ($y=6.5 \cdot 10^{-5} e^{(0.05x)}$, $r^2=0.95$).

1.1.4. Método analítico del 2,4-decadienoato de etilo

Para analizar la concentración de 2,4-decadienoato de etilo se empleó la cromatografía de gases. El equipo utilizado fue el GC-2010 de Shimadzu con detector de llama acoplado (FID). Las características del método de análisis son similares a las empleadas en el método mostrado en la Tabla 2.2, aunque las condiciones de la rampa de temperatura son ligeramente diferentes y se muestran en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4. Valores de la rampa de temperaturas del horno característico del método analítico de GC-FID del 2,4-decadienoato de etilo.

	Parámetro	Valor
Horno	Temperatura inicial (°C)	60
	Tiempo mantenida la Temp. inicial (min)	0
	Temperatura final (°C)	230
	Tiempo mantenida la Temp. final (min)	1
	Velocidad de calentamiento (°C min ⁻¹)	55,5

Un cromatograma característico del análisis de una disolución modelo de 2,4-decadienoato de etilo se presenta en la Figura 2.7. La línea rosa representa la rampa de temperaturas en el horno. El pico a un t_R de 0.770 minutos corresponde al etanol y el de $t_R= 2.301$ min es el correspondiente al aroma.

Para determinar cuantitativamente las concentraciones de aroma de las muestras analizadas se precisa obtener una curva de calibrado, para lo cual es necesario la preparación de unos patrones que poseen diferentes concentraciones de aroma dentro del rango en el que se encuentran las muestras y todas ellas con una concentración constante de etanol. En la Figura 2.8 se muestra una recta de calibrado típica de la concentración de 2,4-decadienoato de etilo en disolución modelo.

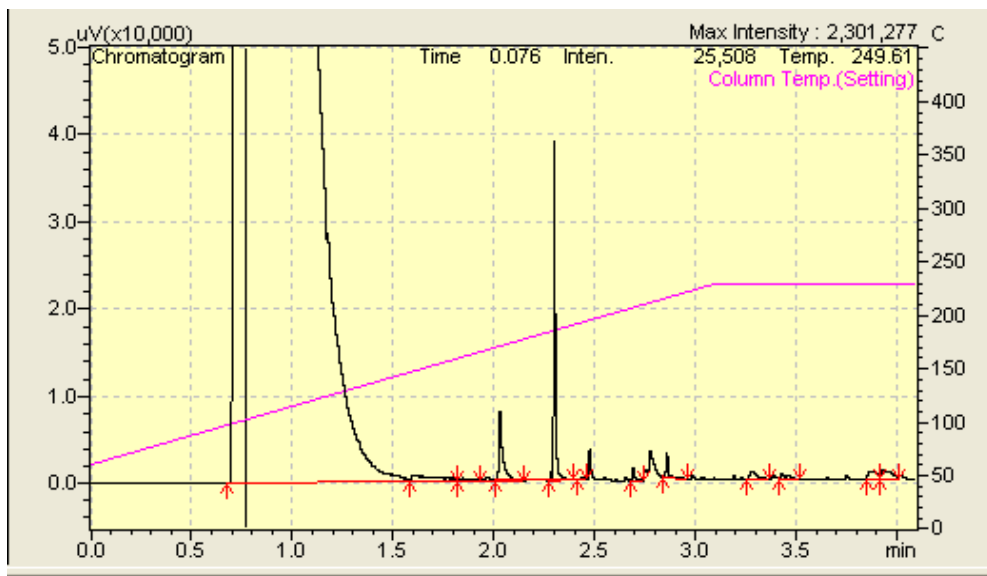


Figura 2.7. Cromatograma característico del análisis GC-FID del 2,4-decadienoato de etilo en disolución sintética agua/etanol/aroma.

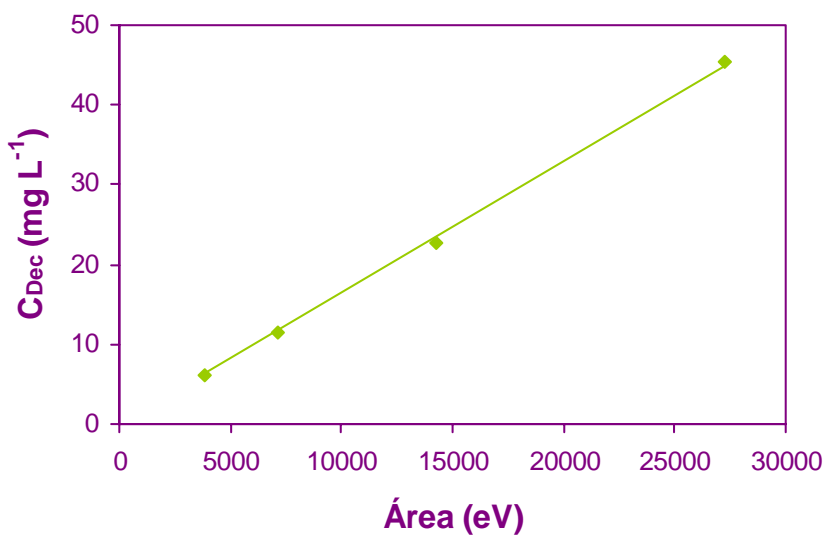


Figura 2.8. Recta de calibrado del 2,4-decadienoato de etilo en disolución sintética agua/etanol/aroma al 30 % v/v de etanol ($y=1.6 \cdot 10^{-3}x$, $r^2=0.999$).

1.2. El arándano

El arándano o bilberry (*Vaccinium myrtillus L*) pertenece a la familia de los “berries” o bayas (Morton & Macleod, 1990). Esta familia incluye especies herbáceas y de arbusto que contienen frutos comestibles que a su vez pertenecen a varias familias botánicas tales como la Rosaceae (fresa, frambuesa), Ericaceae (arándano: blueberry, bilberry), Saxifragaceae (grosella: currants, gooseberry) y Vitaceae (uva).

El arándano se consume tradicionalmente en Norteamérica (EE.UU. y Canadá), y algunos países europeos como así también en Japón. Estados Unidos es el principal productor, consumidor, exportador e importador de arándano del mundo (fuente: FAO).

El arándano aparece en forma silvestre en diversas regiones de Norteamérica y Europa desde hace siglos, está incorporado en la dieta habitual de canadienses, estadounidenses y europeos, quienes la consumen como fruta fresca, deshidratada o congelada, en comidas dulces o saladas, y se utiliza en aplicaciones industriales tan diversas como productos farmacéuticos, colorantes, pastelería, jugos concentrados, purés, mermeladas, salsas, helados, yogures, golosinas, conservas, etc. Canadá y los Estados Unidos consiguen casi el 90% de la producción mundial de arándano, de los cuales, un 70% corresponde a cultivo silvestre y un 30% a cultivado. Otras importantes naciones productoras Europeas son Alemania, Francia, Polonia, Holanda, Austria, España e Italia. La tendencia de consumo del arándano y otras bayas (frambuesas, moras, zarzas), es creciente en Norteamérica, Canadá y algunos países europeos por la incorporación progresiva del concepto de la alimentación sana y natural (Barret et al., 2005).

El hábitat natural de los arándanos en España se encuentra localizado en Los Pirineos y Picos de Europa. Existen en la actualidad algunas plantaciones localizadas en la provincia de Cáceres, Asturias y Huelva. El principal destino de los arándanos en España es la exportación como producto fresco, así como la industria congeladora y conservera. (De la Jara Ayala, 1987).

1.2.1. Identificación de los aromas del arándano

Los compuestos volátiles de las bayas han sido estudiados muy extensamente en las últimas décadas (Morton & Macleoid, 1990). En estos estudios resulta muy importante el método de aislamiento de los aromas que incluyen varios tipos de extracción con disolventes y destilaciones y concentraciones de volátiles en espacio de cabeza. En muchos casos, la evaluación sensorial ha sido utilizada junto con la identificación instrumental de los compuestos volátiles para determinar la cualidad del aroma y la importancia de los aromas de las bayas, es decir, obtener información referente a la fuerza e impacto de los componentes olorosos.

La caracterización química de los aromas de los arándanos ha sido investigada por von Sydow & Anjou (1969), von Sydow et al. (1970), Parliment and Kolor (1975, 1976), Hirvi & Honkanen (1983 a, b) y Horvat et al. (1983). En estos estudios, más de 100 compuestos volátiles han sido identificados. Von Sydow & Anjou (1969) sugirieron que los compuestos impacto del aroma de los arándanos son el trans-2-hexen-1-ol, 3-metilbutanoato de etilo y el 2-metilbutanoato de etilo. Parliment & Kolor (1975) y Parliment & Scarpellino (1977) enfatizaron la importancia del trans-2-hexenal, trans-2-hexen-1-ol y el linalool sobre el olor característico de los arándanos.

En este trabajo, de forma análoga a como se procedió con la pera, se hizo un análisis cualitativo de los aromas presentes en una muestra de arándanos licuada y filtrada. Para ello se compraron los arándanos en estado comercial de madurez y se licuaron. El zumo se filtró empleando un filtro Supelco de 0.45 μm y se tomaron 20 mL que fueron guardados en un contenedor hermético de cristal con tapón inerte. La fracción aromática es separada y concentrada mediante Extracción en Fase Sólida (SPE). Se empleó como fase sorbente resinas Lichrolut EN (Merck) y el lavado del cartucho se realizó con agua Milli-Q y elución con 1 mL de diclorometano. El extracto fue analizado mediante cromatografía de gases con detección por Espectrometría de Masas (40-250 m/z). Se empleó una columna DB-WAXetr de 30 m x 0.25 mm x 0.25 μm . Los criterios empleados

para la identificación fueron la coincidencia del espectro de masas con el presente en las librerías NIST05 y Wiley7n y la comparación de los índices de retención lineales. Los procedimientos de extracción y el análisis fueron realizados por el Laboratorio de Análisis del Aroma y Enología, Universidad de Zaragoza, España.

El cromatograma obtenido se muestra en la Figura 2.9 donde se puede observar que hay 5 picos que son mayoritarios; (1) trans-2-hexenal, $t_R = 14.3$ min (2) 2-butil-1-octanol, $t_R = 16.2$ min; (3) 1-hexanol, $t_R = 18.1$ min; (4) trans-2-hexen-1-ol, $t_R = 20.2$ min; (5) 1-hexadecanol, $t_R = 47.7$ min. El pico detectado a 50 minutos se identificó como tributilfosfato y se consideró una contaminación procedente de los filtros. Como se puede observar, el trans-2-hexen-1-ol es el componente más abundante entre los compuestos volátiles del arándano después de preparar la muestra.

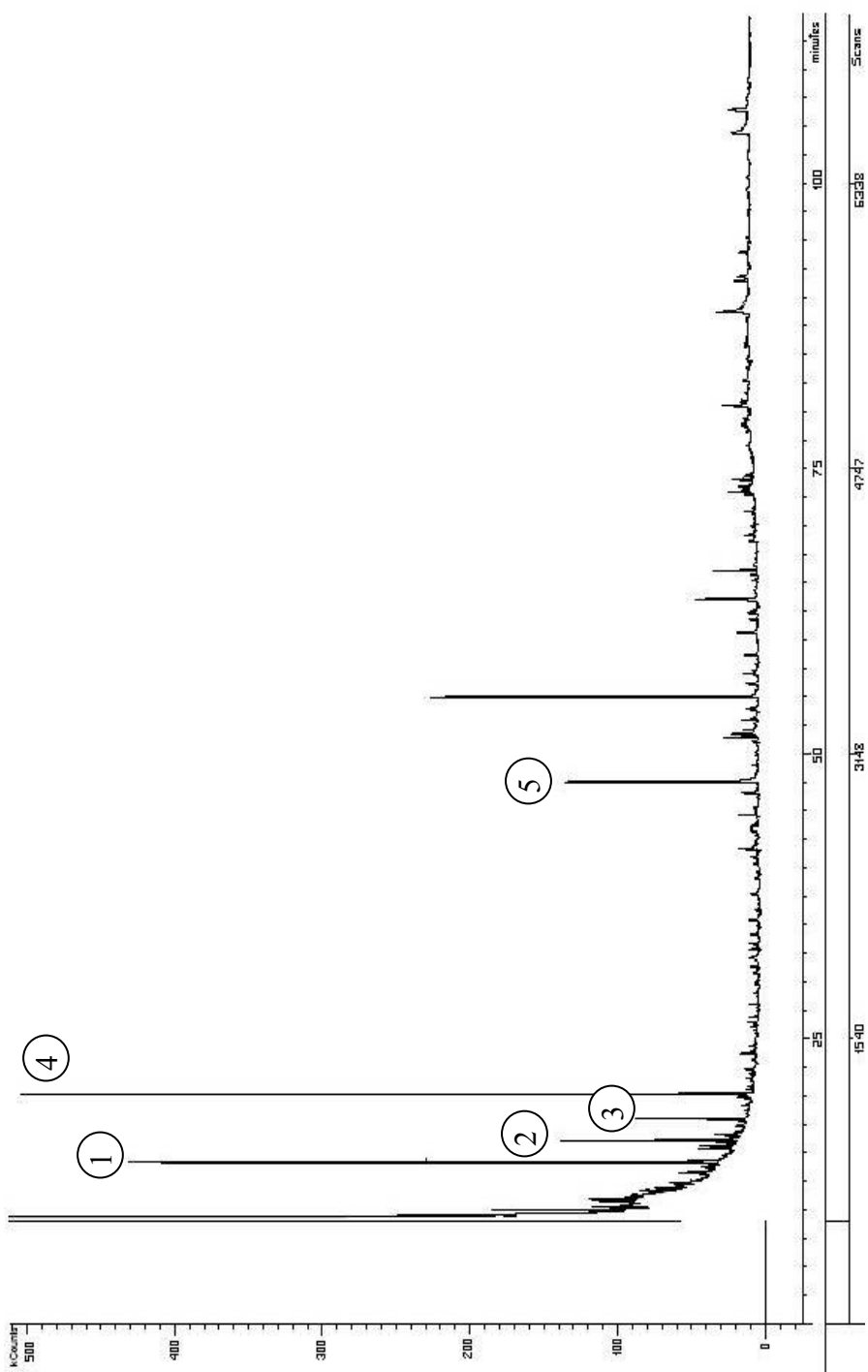


Figura 2.9. Cromatograma GC-MS de arándanos licuados y filtrados. (1) trans-2-hexen-1-ol, (2) 2-butil-1-octanol, (3) 1-hexanol, (4) trans-2-hexen-1-ol, (5) 1-hexadecanol.

1.2.2. Cuantificación del *trans*-2-hexen-1-ol

Hirvi & Honkanen (1983) determinaron las concentraciones características de los aromas presentes en diferentes especies de arándanos encontrando que en la especie *Vaccinium myrtillus* L. la concentración aproximada de *trans*-2-hexen-1-ol era de 0.01 mg kg⁻¹.

En este caso, empleando la muestra de arándanos licuada y filtrada que se utilizó durante la identificación aromática (apartado 1.2.1), se procedió a evaluar la concentración de *trans*-2-hexen-1-ol presente, Figura 2.10, empleando el método de análisis mostrado en el apartado 1.2.4. Como resultado, la concentración de este compuesto observada en las muestras licuadas de arándanos estaba comprendida en un rango entre 20-30 mg kg⁻¹.

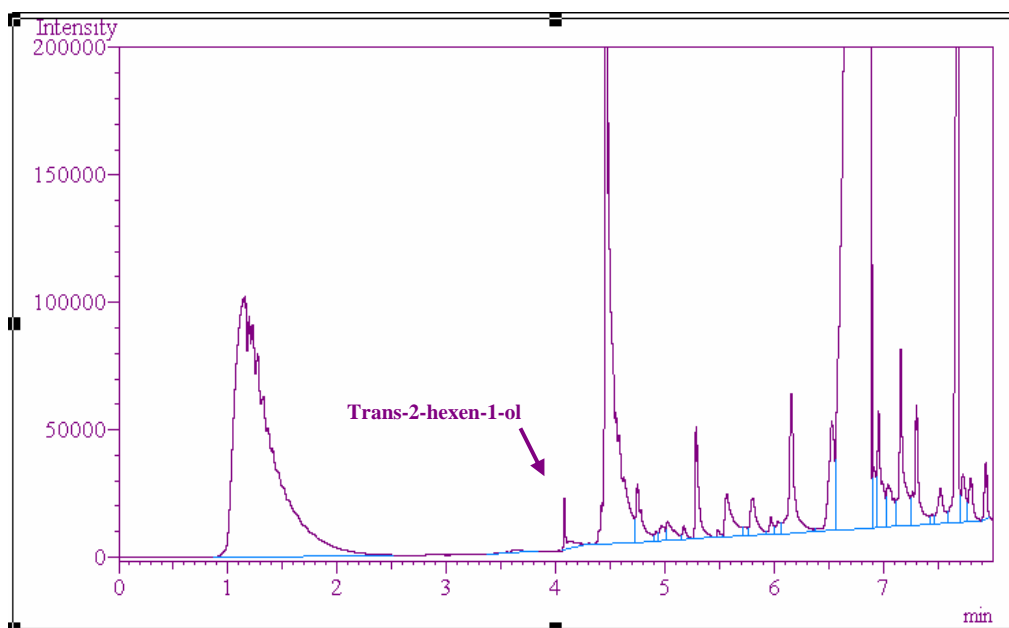


Figura 2.10. Cromatograma GC-FID del análisis de los compuestos volátiles de una muestra real de arándanos licuada y filtrada.

1.2.3. Características del *trans*-2-hexen-1-ol

Del estudio anterior se procede a seleccionar el *trans*-2-hexen-1-ol como aroma impacto del arándano a estudiar en este trabajo. Su estructura química se muestra en la Figura 2.11 y las propiedades físico-químicas más importantes, extraídas de las hojas de datos de seguridad del producto (Anexo I), se recogen en la Tabla 2.5.

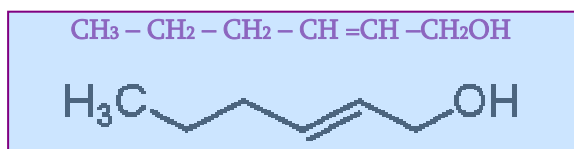


Figura 2.11. Estructura del *trans*-2-hexen-1-ol.

Tabla 2.5. Propiedades físico-químicas del *trans*-2-hexen-1-ol.

Número CAS	Peso molecular	Punto de ebullición	Densidad a 25 °C	Solubilidad en agua a 25 °C	Presión de vapor a 20 °C
928-95-0	100.16 g mol ⁻¹	158-160 °C	849 g L ⁻¹	16 g L ⁻¹	3 mmHg

El valor de solubilidad ha sido estimado mediante el programa de estimación EPI SuiteTM desarrollado por la Corporación de Investigación de Siracusa (Syracuse Research Corporation, SRC) y la Agencia de Protección Medioambiental de U.S. (copyright 2000).

De los datos obtenidos en varias fuentes (Anexo I) se puede construir la dependencia de la presión de vapor del *trans*-2-hexen-1-ol con la temperatura según una expresión de Antoine, Figura 2.12.

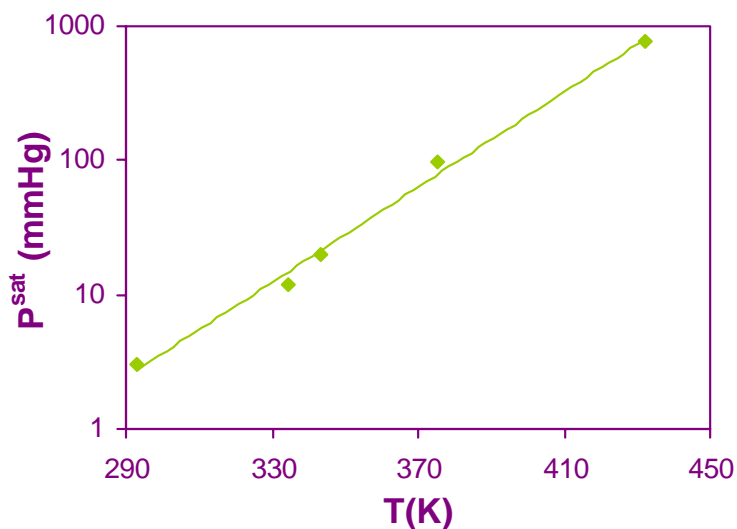


Figura 2.12. Dependencia de la presión de vapor, P^{sat} , del trans-2-hexen-1-ol con la temperatura según la ley de Antoine ($y=1.7 \cdot 10^{-5} e^{(0.04x)}$, $r^2=0.99$).

1.2.4. Método analítico del trans-2-hexen-1-ol

Para analizar la concentración del trans-2-hexen-1-ol se empleó la cromatografía de gases, que al igual que para el aroma de pera, el equipo fue el GC-2010 de Shimadzu con detector de llama acoplado (FID). Las características del método de análisis se resumen en la Tabla 2.6.

Un cromatograma característico del análisis de una disolución modelo de trans-2-hexen-1-ol se presenta en la Figura 2.13. El pico a un t_R de 0.849 minutos corresponde al etanol y el de $t_R= 4.069$ min es el del aroma.

Para determinar cuantitativamente las concentraciones de aroma de las muestras analizadas se precisa obtener una curva de calibrado, para lo cual es necesario la preparación de unos patrones que poseen diferentes concentraciones de aroma dentro del

rango en el que se encuentran las muestras y todas ellas con una concentración constante de etanol. En la Figura 2.14 se muestra una recta de calibrado típica de la concentración de trans-2-hexen-1-ol en disolución modelo.

Tabla 2.6. Parámetros característicos del método analítico de GC-FID del trans-2-hexen-1-ol

	Parámetro	Valor
Auto-muestreador	Volumen inyectado (μL)	1.0
	Volumen de limpieza con muestra (μL)	6
Inyector	Modo de inyección	Split
	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	250
	Gas portador	He
	Tipo de control de flujo	Velocidad constante
	Velocidad lineal (cm s^{-1})	40
	Relación de split	1:10
Horno	Temperatura inicial ($^{\circ}\text{C}$)	80
	Tiempo mantenida la Temp. inicial (min)	2
	Temperatura final ($^{\circ}\text{C}$)	230
	Tiempo mantenida la Temp. final (min)	1
	Velocidad de calentamiento ($^{\circ}\text{C min}^{-1}$)	30
Detector	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	300
	Gas makeup	N_2/Aire
	Flujo de N_2 (mL min^{-1})	35
	Flujo de aire (mL min^{-1})	350
	Flujo de H_2 (mL min^{-1})	30

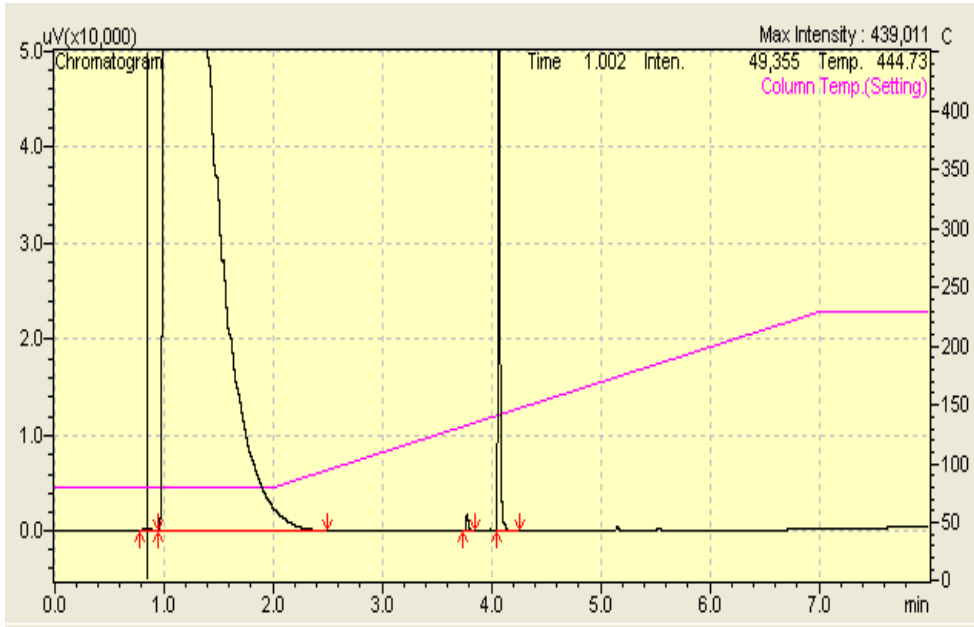


Figura 2.13. Cromatograma característico del análisis GC-FID del trans-2-hexen-1-ol en disolución sintética agua/etanol/aroma.

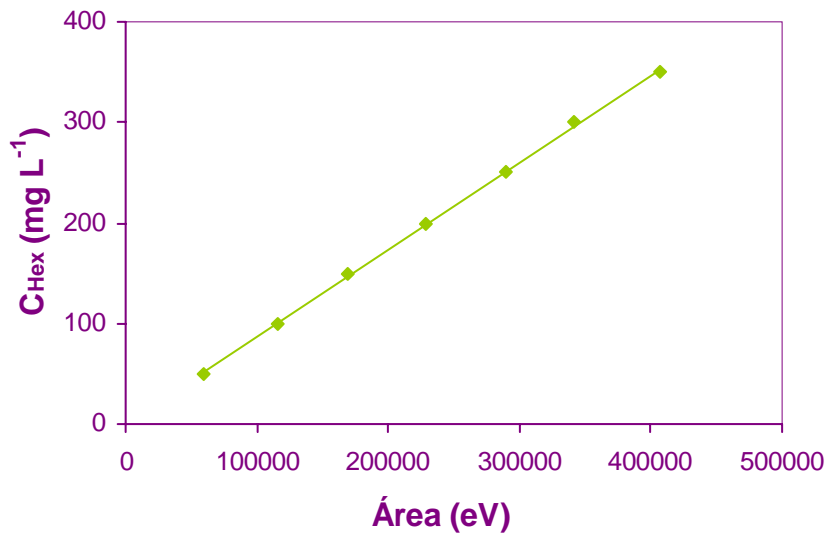


Figura 2.14. Recta de calibrado del trans-2-hexen-1-ol en disolución sintética agua/etanol/aroma al 3% v/v de etanol ($y=9 \cdot 10^{-4}x$, $r^2=0.999$).

2. Etanol y agua ultrapura

Las corrientes reales que contienen los aromas a estudiar son acuosas. Las disoluciones sintéticas que se preparan son por tanto acuosas, sin embargo los aromas anteriormente descritos son muy poco solubles en agua. Por tanto, para solubilizar los aromas en el agua es preciso añadir una cierta cantidad (% v/v) de etanol.

El agua empleada en la preparación de las disoluciones es agua ultrapura obtenida mediante cartuchos Milli-Q Plus de la casa Millipore. Las características del agua se muestran en la Tabla 2.7:

Tabla 2.7. Características del agua ultrapura Milli-Q.

Parámetro	Unidad	Valor
Resistividad	MΩ.cm	18.2
COT	Ppb	<10
Libre de partículas	Mm	0.22
Bacterias	u.f.c./ml	<1

El etanol absoluto empleado en este estudio es suministrado por la casa comercial Panreac Química, S.A y tiene una riqueza mínima del 99.5 %. Algunas de sus propiedades físico-químicas se presentan en la Tabla 2.8 (Véase Anexo I):

Tabla 2.8. Propiedades físico-químicas del etanol absoluto.

Número CAS	Peso molecular	Punto de ebullición	Densidad a 25 °C	Solubilidad en agua a 25 °C	Presión de vapor a 20 °C
64-17-5	46.07 g mol ⁻¹	78 °C	790 g L ⁻¹	>1000 g L ⁻¹	44 mmHg

Para analizar la concentración del etanol se empleó, al igual que con los compuestos anteriores, la cromatografía de gases. El equipo empleado fue el GC-2010 de Shimadzu con detector de llama acoplado (FID). Las características del método de análisis se resumen en la Tabla 2.9.

Tabla 2.9. Parámetros característicos del método analítico de GC-FID del etanol.

	Parámetro	Valor
Auto-muestreador	Volumen inyectado (μL)	0.5
	Volumen de limpieza con muestra (μL)	6
Inyector	Modo de inyección	Split
	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	250
	Gas portador	He
	Tipo de control de flujo	Velocidad constante
	Velocidad lineal (cm s^{-1})	50
	Relación de split	1:800
Horno	Temperatura inicial ($^{\circ}\text{C}$)	60
	Tiempo mantenida la Temp. inicial (min)	2
	Temperatura final ($^{\circ}\text{C}$)	230
	Tiempo mantenida la Temp. final (min)	1
	Velocidad de calentamiento ($^{\circ}\text{C min}^{-1}$)	60
Detector	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	300
	Gas makeup	N_2/Aire
	Flujo de N_2 (mL min^{-1})	35
	Flujo de aire (mL min^{-1})	350
	Flujo de H_2 (mL min^{-1})	30

Un cromatograma característico del análisis de etanol en disolución acuosa se presenta en la Figura 2.15. El pico de etanol sale a un t_{R} de 1.067 minutos.

Para determinar cuantitativamente las concentraciones de etanol de las muestras analizadas se precisa obtener una curva de calibrado, para lo cual es necesario la preparación de unos patrones a diferentes porcentajes en volumen de agua etanol. En la Figura 2.16 se muestra una recta de calibrado típica de la concentración de etanol en disolución. En el caso que resulte necesario, el contenido de agua se calcula por diferencia.

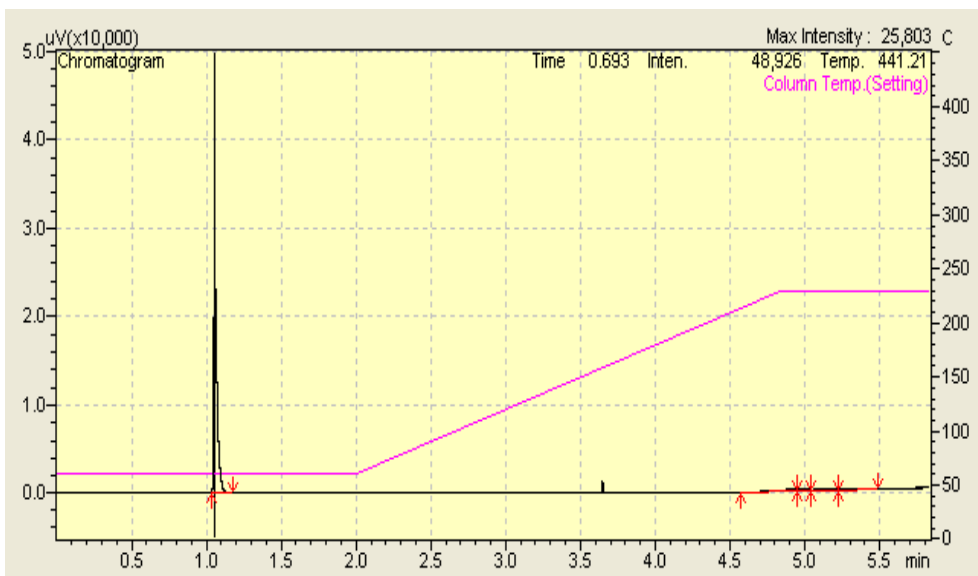


Figura 2.15. Cromatograma característico del análisis GC-FID del etanol.

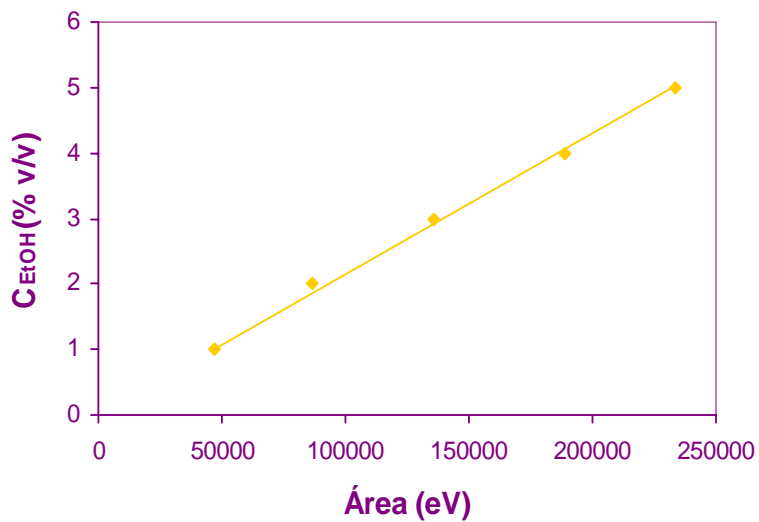


Figura 2.16. Recta de calibrado del etanol en disolución agua/etanol ($y=2 \cdot 10^{-5}x$, $r^2=0.997$).

Nomenclatura

C_{Dec}	Concentración de 2,4-decadienoato de etilo	(mg L ⁻¹)
C_{EtOH}	Concentración de etanol	(mg L ⁻¹)
C_{Hex}	Concentración de trans-2-hexen-1-ol	(mg L ⁻¹)
P_v	Presión de vapor	(mmHg)
r^2	Coefficiente de regresión lineal	(-)
T	Temperatura	(K)
t_R	Tiempo de retención	(min)

Acrónimos

<i>EPA</i>	United States Environmental Protection Agency
<i>FAO</i>	Food and Agriculture Organization
<i>FID</i>	Flame Ionization Detector
<i>GC</i>	Gas Chromatography
<i>HPLC</i>	High Performance Liquid Chromatography
<i>IN</i>	Idéntico al Natural
<i>IR</i>	Infrared Spectroscopy
<i>MS</i>	Mass Spectrometer
<i>PDMS</i>	Polydimethylsiloxane
<i>SFC</i>	European Scientific Comité for Food
<i>SPE</i>	Solid Phase Extraction
<i>SPME</i>	Solid Phase Micro-Extraction
<i>SRC</i>	Syracuse Research Corporation
<i>USDA</i>	United States Department of Agriculture

Bibliografía

Barret, D.M., Somogyi, L. & Ramaswamy, H. *Processing Fruits: Science and Technology*. CRC Press, London, 2005.

Buttery, R.G. & Teranishi, R. *Gas-liquid chromatography of aroma of vegetables and fruit*. *Analytical Chemistry* 33 (1961) 1439-1441.

Cigić, I.K., Plavec, J. & Zupančič-Kralj, L. *Determination of the geometrical isomers of ethyl 2,4-decadienoate*. *Journal of Chromatography A*, 847 (1999) 359-364.

Cigić, I.K. & Zupančič-Kralj, L. *Changes in odour of Barlett pear brandy influenced by sunlight irradiation*. *Chemosphere* 38 (1999) 1299-1303.

Chervin, C., Speirs, J., Loveys, B. & Patterson, B.D. *Influence of low oxygen storage on aroma compounds of whole pears and chorused pear flesh.* *Postharvest Biology and Technology* 19 (2000) 279-285.

De la Jara Ayala, F. *Informe sobre la comercialización de los pequeños frutos, dentro de Hojas divulgadoras del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.* Rivadeneira S.A., Madrid, España, 1987.

Gascó, L., Barrera, R. & De La Cruz, F. *Gas chromatographic investigations of the volatile constituents of fruits aroma.* *Journal of Chromatographic Science* 7 (1969) 228-238.

Goodburn, K. *EU Food Law.* CRC Press, Boca Raton, FL, 2001.

Heinz, D.E. & Jennings, W.G. *Volatile components of Bartlett pear. V.* *Journal of Food Science* 31 (1966) 69-80.

Heinz, D.E., Sevenants, M.R. & Jennings, W.G. *Preparation of fruit essences for gas chromatography.* *Journal of Food Engineering* 31 (1966) 63-68.

Hirvi, T. & Honkanen, E. *The aroma of blueberries.* *Journal of the Science of Food and Agriculture* 34 (1983a) 992-998.

Hirvi, T. & Honkanen, E. *The aroma of some hybrids between high-bush blueberry (*Vaccinium corymbosum*, L.) and bog blueberry (*Vaccinium uliginosum* L.).* *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* 176 (1983b) 346-349.

Horvat, R.J., Seuter, S.D. & Dekazos, E.P. *GLC-MS- analysis of volatile constituents in rabbit eye blueberries.* *Journal of Food Science* 48 (1983) 278-279.

Jennings, W.G. & Sevenants, M.R. *Volatile esters of Bartlett pear III.* *Journal of Food Science* 29 (1964) 158-163.

Jennings, W.G. & Tressl, R. *Production of volatile compounds in the ripening Bartlett pear.* *Chemie, Mikrobiologie, Technologie der Lebensmittel* 3 (1974) 52-55.

Kahle, K., Preston, C., Richling, E., Heckel, F. & Schreier, P. *On line gas chromatography combustion/pyrolysis isotope ratio mass spectrometry (HRGC-C/IRMS) of major volatiles from pear fruit (*Pyrus communis*) and pear products.* *Food Chemistry* 91 (2005) 449-455.

López, M.L., Miró, R. & Graell, J. *Quality and aroma production of Doyenne du Comice pears in relation to harvest date and storage atmosphere.* *Food Science & Technology International* 7 (2001) 493-500.

Natural Advantage. Producers of natural, Khoser flavour ingredients for the food, beverage and flavour industry, ethyl 2,4-decadienoate. www.natural-advantage.net/Et-Deca.htm. (acceso en Noviembre 2007).

Morton, I.D. & Macleod, A. J. *Food Flavours Part C. The flavour of fruits.* Elsevier, Amsterdam, 1990.

Paillard, N., Pitoulis, S. & Mattei, A. *Techniques de preparation et analyse de l'arome de quelques fruits.* Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie 3 (1970) 107-114.

Parliament, T.H. & Kolor, M.G. *Identification of the major components of blueberry.* Journal of Food Science 40 (1975) 762-763.

Parliament, T.H. & Scarpellino, R. *Organoleptic techniques in chromatographic food flavour analysis.* Journal of Agricultural and Food Chemistry 25 (1977) 97-99.

Quamme, H.A. *Decadienoate ester concentrations in pear cultivars and seedlings with Bartlett-like aroma.* HortScience 19 (1984) 822-824.

Romani, R.J. & Ku L. *Direct gas chromatographic analysis of volatiles produced by ripening pears.* Journal of Food Science 31 (1966) 558-560.

Russel, L.F., Quamme, H.A. & Gray, J.I. *Qualitative aspects of pear flavour.* Journal of Food Science 46 (1981) 1152-1158.

von Sydow, E. & Anjou, K. *The aroma of bilberries (Vaccinium myrtillus L.). I. Identification of volatile compounds.* Lebensmittel Wissenschaft und Technologie 2 (1969) 78-81.

von Sydow, E., Anderson, J., Anjou, K., Land, D.G. & Griffiths, N. *The aroma of bilberries (Vaccinium myrtillus L.) II. Evaluation of the press juice by sensory methods and by gas chromatography and mass spectrometry.* Lebensmittel Wissenschaft und Technologie 3 (1970) 11-17.

Strandjev, A. *Influence du temps et de la température de sérialisation sur les substances aromatiques des pomes.* Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences 38 (1982) 1129-1132.

Suwanagul, A. & Richardson, D.G. *Identification of headspace volatile compounds from different pear (Pyrus communis L.) varieties.* In proceedings of the VII international symposium on pear growing, Talca, Chile (1998).