

ELUCIDACION MOLECULAR DEL AROMA DE PRODUCTOS



Presentado por: Jorge Franco Sus

Dirigido por: Vicente Ferreira González



Departamento de
Química Analítica
Universidad Zaragoza

Departamento de Química Analítica

Laboratorio de Análisis del Aroma y Enología



ELUCIDACION MOLECULAR DEL AROMA DE PRODUCTOS

En el presente trabajo se estudió el perfil aromático del mango Kent en dos estados de maduración: verde y maduro. El objetivo del trabajo fue identificar los compuestos más importantes en el aroma de esta fruta, así como estudiar el cambio en el perfil aromático asociado a la maduración.

Los extractos se prepararon a partir de pulpa de mango troceada mediante la técnica espacio de cabeza dinámico - extracción en fase sólida (HS-SPE), optimizando tanto el formato de muestra como el tiempo de extracción. Se realizó el análisis, jerarquización e identificación de los aromas presentes en los extractos mediante cromatografía de gases acoplada a un sistema olfatométrico (GC-O). Aquellos compuestos que no pudieron ser identificados mediante su índice de retención en columna DB-WAX, DB-5 y/o patrón, se sometieron a cromatografía de gases-masas multidimensional.

Se han conseguido identificar de manera inequívoca los compuestos aromáticos con mayor responsabilidad en el aroma característico del mango maduro. Por orden de importancia potencial estos son el butirato de etilo, β -pineno, 2-metilbutirato de etilo, 3-careno, Z-2-nonenal (en este la identificación no es inequívoca, sino probable) y α -pineno.

Asimismo, se ha demostrado que el perfil aromático del mango Kent depende críticamente del estado de maduración de la fruta. De hecho, de los 6 componentes más importantes del aroma del mango maduro, tan solo dos de ellos (α -pineno y Z-2-nonenal) se detectaron con intensidades similares o superiores en el mango verde. Los otros cuatro se detectaron con intensidades inferiores a la mitad, o incluso ni se llegaron a detectar (caso del β -pineno). De manera remarcable, el perfil olfatométrico del mango verde es completamente diferente, ya que resulta dominado de manera casi completa por el 2,4,6-tricloroanisol (TCA) (identificación probable) y por el Z-2-nonenal, seguido por el α -pineno, cuya intensidad no varió durante la maduración.

MOLECULAR ELUCIDATION OF THE AROMA OF PRODUCTS

In this work the aromatic profile of Kent Mango was studied on two maturity stages: ripe and green. The aim of the work is to identify the compounds with more responsibility in the typical aroma of this variety of mango, as well as to study the change in the aromatic profile linked to maturation.

The extracts were prepared from chopped mango flesh by the analytical technique dynamic head space – solid phase extraction (HS-SPE), optimizing both the sample format and the extraction time.

By the use of gas chromatography coupled to an olfactometric system, analysis, the hierarchical classification and ulterior identification of the aromas which form the extract was achieved. Those compounds that could not be identified neither through retention index on DB-WAX, DB-5 columns or patron solution were subjected to multidimensional gas chromatography.

The most relevant aroma compounds, potentially responsible for the typical characteristic ripe Kent mango aroma have been unequivocally identified. By order of potential sensory importance, these compounds are ethyl butyrate, β -pinene, 2-methylbutyrate, 3-carene, Z-2-nonenal (identified as probable, but not as sure) and α -pinene.

It has been also demonstrated that the aroma profile of Kent mango critically depends on the maturity of the fruit. In fact, out of the 6 most important aroma compounds in mature mango, only two of them (α -pinene and Z-2-nonenal) were detected at similar or higher intensities in green mangoes. The other four, were detected at intensities smaller than a half of that found in mature mango, or were even non-detected at all, as happened to β -pinene. Remarkably, the olfactometric profile of green mango is completely different, since comes completely dominated by 2,4,6-trichloroaniso (TCA) –probable identification- and by Z-2-nonenal, followed by α -pinene, whose aromatic intensity did not vary during maturation.

INDICE

1. INTRODUCCION	2
2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO.....	4
3. MATERIALES Y METODOS.....	4
3.1. REACTIVOS.....	4
3.2. MUESTRAS.....	5
3.3. ANALISIS OLFACTOMETRICO.....	5
3.3.1. Selección del dispositivo empleado en la preparación del extracto por HS-SPE.....	5
3.3.2. Análisis por Cromatografía de gases-Olfatometría.....	6
3.3.2.1. Panel olfactométrico.....	7
3.3.2.2. Cromatógrafo de gases Trace (Columna Polar).....	7
3.3.2.3. Cromatógrafo de gases Fisons (Columna Apolar).....	8
3.4. ANALISIS Y CONFIRMACION DE LOS COMPUUESTOS IDENTIFICADOS.....	8
3.5. IDENTIFICACIÓN DE LAS ZONAS DE OLOR DESCONOCIDAS (GC-O-GC-O-MS).....	8
3.6. TRATAMIENTO DE DATOS.....	9
3.6.1. Cálculo del índice de retención de Kovats.....	9
3.6.2. Cálculo de la frecuencia modificada.....	9
3.6.3. Estudio ANOVA.....	10
4. RESULTADOS.....	10
4.1. ANALISIS DE LOS EXTRACTOS POR GC-O.....	10
4.2. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS POR GC-O-GC-O-MS.....	11
5. DISCUSION.....	13
5.1.ELECCION DEL FORMATO DE LA MUESTRA.....	13
5.2.OPTIMIZACION DEL TIEMPO DE EXTRACCION.....	13
5.3.OPTIMIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO.....	14
5.4.IDENTIFICACION DEFINITIVA Y DESCRIPCION DEL AROMA.....	14
6. CONCLUSIONES.....	17
7. BIBLIOGRAFIA.....	18

1. INTRODUCCION

El mango (*mangifera indica*) es una fruta tropical perteneciente a la familia Anacardiaceae, cuyo origen es el Sudeste Asiático. Bajo el nombre de mango se habla de más de 1000 variedades bien diferenciadas. Generalmente, el mango se cultiva con fines comerciales en 87 países de la región tropical (todas las variedades precisan temperaturas de 24-27°C). Entre ellos se encuentran: India (es el mayor productor, cultivando un 37% de las 30,5 millones de toneladas al año que constituyen la producción global), Brasil, México (es el mayor exportador mundial), Perú, USA o España.

El mango fue introducido en España, principalmente en Canarias, a finales del siglo XVIII y comenzó a comercializarse a partir de 1980. Entre las variedades más comercializadas en España se encuentran: Haden (figura 1), Tommy Atkins (figura 2), Keitt (figura 3), Osteen (figura 4) y Kent (figura 5). Sin embargo, solo las cuatro últimas variedades nombradas son producidas en España. Principalmente se cultivan en las Islas Canarias (25% de la producción) y parte de Andalucía (75% de la producción), las únicas regiones donde el clima es favorable. Dentro de Andalucía el mango se cultiva en La Axarquía malagueña y la costa tropical de Granada.



Figura 1. Mango Haden



Figura 2. Mango Tommy Atkins



Figura 3. Mango Keitt



Figura 4. Mango Osteen



Figura 5. Mango Kent

Entre todas las variedades existentes, el mango Kent, además de ser producido en el territorio nacional, tiene unas propiedades sensoriales (dulce, aromático, jugoso y con muy poca fibra) que lo convierten en una de las variedades más apreciadas para el consumo. Por estas razones la variedad Kent ha sido la seleccionada para el presente trabajo. El mango Kent tiene un perfil ovalado y forma regular, con un tamaño de fruto que suele variar entre 400 y 600 gramos, y tiene su origen en Florida en la década de 1940. Actualmente, aunque dentro de España es principalmente producido en Andalucía, también es importado, mayoritariamente desde México, Ecuador y Perú.

Las propiedades aromáticas del mango han motivado a que se realicen numerosos trabajos acerca de su composición. Sin embargo, el perfil aromático del mango no ha sido tan estudiado, sólo algunos autores han realizado esta caracterización en diferentes variedades con técnicas muy diversas. Autores como Pandit¹, Pino² y Munafó³ utilizaron técnicas de extracción sólido-líquido para obtener la composición de diferentes variedades de mango. Por ejemplo, Pandit¹ pulverizó la muestra tras congelarla en nitrógeno líquido, extrayendo los compuestos volátiles con diclorometano. Los extractos obtenidos mediante extracción sólido-líquido o extracción en fase sólida (SPE) buscan, en general, que en este extracto estén contenidos cuantitativamente todos los volátiles presentes en la muestra para evitar perder información^{4,5}. Las limitaciones que tiene esta estrategia es que el extracto contiene tanto los compuestos más volátiles y con más probabilidad de alcanzar los receptores olfativos durante el consumo, como aquéllos otros poco volátiles o que en la matriz original están tan retenidos, que –aunque estén presentes en el producto- a la hora de la verdad no son importantes ya que no llegan a alcanzar los receptores. Las estrategias clásicas resuelven este problema mediante el uso de los valores umbral de olfacción de los compuestos. Esto es, primero identifican todos los compuestos aromáticos presentes en la muestra, importantes o no, segundo los cuantifican, y en tercer lugar comparan los valores de concentración con los valores umbrales obtenidos en matrices similares a las del producto.

Una posibilidad a priori más razonable es preparar los extractos empleando técnicas de espacio de cabeza, de manera que se busque no extraer todos los volátiles presentes en el producto, sino solo aquéllos que durante el consumo serán transferidos hacia los receptores olfativos. Por esta razón, otros autores utilizaron técnicas de espacio de cabeza estático (HS). Lebrun⁶ troceó un mango y lo sometió a HS estática, exponiendo pulpa de mango en un recipiente con espacio de cabeza y posteriormente recogiendo 30 mL de gas del interior del recipiente. No obstante trabajar con HS estática puede tener el inconveniente de conseguir concentraciones insuficientes de los compuestos volátiles en el extracto y además el vapor en equilibrio sobre la muestra no es exactamente igual al vapor que emana una muestra en la atmósfera abierta, ya que su composición no viene determinada solo por la volatilidad, sino por los fenómenos de transferencia de masa del seno del producto a las capas de espacio de cabeza. La variante dinámica de HS (HS-SPE) puede ayudar a solventar dichos problemas, y ya ha sido utilizada con muestras de fruta. Egea⁷ utilizó la combinación de las técnicas HS-SPE dinámica y Cromatografía gas-Olfatometría (GC-O) para realizar el estudio del aroma de fruta, en concreto sobre muestras de guayabas. Ventajas adicionales de este sistema son la limpieza del extracto y su simplicidad, al estar libre de los compuestos más pesados y que, por tanto, tienen pocas probabilidades de volatilizarse de la muestra y ser percibidos durante el proceso natural de olfacción. Por ello, una de las técnicas más empleadas en la actualidad para la preparación del extracto está basada en el uso de un sistema de espacio de cabeza dinámico acoplado a la extracción en fase sólida (HS-SPE)⁸.

La técnica HS-SPE es idónea para obtener un extracto aromático representativo. La ventaja de la técnica dinámica frente a la estática es que mediante un flujo de gas inerte se renueva constantemente el espacio de cabeza, obteniendo un extracto más concentrado. El acoplamiento de esta técnica a otra que permita detectar los compuestos con importancia sensorial del extracto, como la Cromatografía Gas-Olfatometría (GC-O), podría ser una buena estrategia para estudiar el perfil aromático del mango Kent. La olfatometría es una cromatografía en la que se utiliza la nariz humana como detector, en paralelo con un detector instrumental. Mediante una junta de unión o conector en Y, se divide el flujo a la salida de la columna cromatográfica en dos ramificaciones, una que lleva los analitos a un detector instrumental (FID, MS, ...); y otra que los lleva a un puerto olfactométrico, donde la nariz actúa como detector de gran sensibilidad y selectividad. El uso conjunto de ambos detectores (nariz y FID o MS) permite monitorizar cuantitativamente la elución de las moléculas odorantes y al mismo tiempo conocer la naturaleza e intensidad del aroma que poseen. La técnica de GC-O se lleva utilizando desde los años sesenta, y ha probado ser muy útil en la caracterización aromática de infinidad de productos como bebidas, frutas, quesos, carnes, aceites esenciales, perfumes, y un largo etcétera.

Hasta la fecha no se ha publicado ningún trabajo que haga uso de HS-SPE dinámica y GC-O para el estudio del perfil aromático del mango Kent, por ello se eligieron estas técnicas como las más adecuadas para este estudio.

2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

El principal objetivo del presente trabajo es caracterizar el perfil aromático del mango Kent según el grado de maduración. Para ello, se seleccionó un mango en estado maduro óptimo y un mango inmaduro (identificados en función de propiedades físicas como el color, consistencia al tacto y aroma del fruto). Cuestiones relevantes como la preparación de la muestra, entrenamiento de los jueces y optimización del tiempo de extracción serán también tratadas en esta memoria. Se prestará especial atención a la identificación y jerarquización de los principales compuestos responsables del aroma del mango Kent, así como a la variación del perfil aromático entre ambos mangos.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 REACTIVOS

En la tabla 1 se muestran los reactivos empleados durante la preparación del extracto, su casa comercial y la calidad o pureza de estos.

Tabla 1. Casas comerciales y calidad de los reactivos empleados

REACTIVO	CASA COMERCIAL	CALIDAD O PUREZA
Resina LiChrolut EN	Merck	
Diclorometano	Fisher Scientific UK	Distol
Metanol	Fisher Scientific UK	Distol
Nitrógeno	Air Liquide	>99,9%
Butirato de hexilo	Sigma Aldrich	>98%

3.2 MUESTRAS

Las muestras empleadas fueron dos mangos de la variedad Kent (figura 6) adquiridos en el comercio local de Zaragoza “Canelas”. Uno de los mangos estaba en un estado de maduración óptimo para el consumo, mientras que el otro estaba en un punto de maduración temprana (comúnmente conocido como mango verde).



Figura 6. Mangos Kent maduro y verde empleados en este trabajo

Con el fin de obtener los extractos, las muestras fueron preparadas en dos formatos diferentes a partir de mangos pelados y sin hueso: mango triturado o en puré (figura 7) y mango en cubos de 1x1x1cm aproximadamente (figura 8).

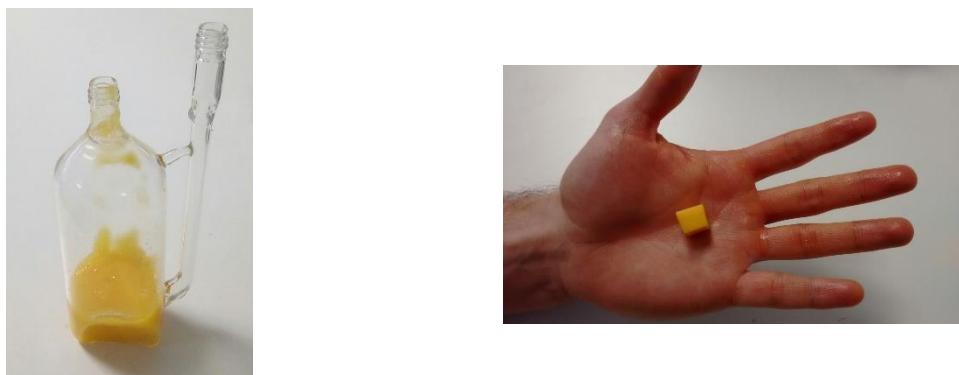


Figura 7. Mango preparado en formato de puré

Figura 8. Mango preparado en formato de cubos

3.3 ANALISIS OLFATOMETRICO

3.3.1 Selección del dispositivo empleado en la preparación del extracto por HS-SPE

Debido a los dos formatos de muestra empleados se probaron dos posibles dispositivos de espacio de cabeza-extracción en fase sólida (HS-SPE), buscando cuál proporcionaba extractos de olor más concentrados y más parecidos al olor real del mango.

El primero fue un dispositivo HS-SPE que dispone de un borboteador de vidrio fritado en su interior (figura 9). Este dispositivo se empleó para la evaluación de la muestra en formato puré. Se introdujeron 80 mL de mango triturado y se fijó un flujo de nitrógeno de 375 mL/minuto.



Figura 9. Dispositivo de extracción HS-SPE para formato puré



Figura 10. Dispositivo de extracción HS-SPE para formato cubos

El segundo dispositivo de HS-SPE consistió en una “boca de extracción” (se llama así al dispositivo de extracción) de 1L de volumen en la que se introdujo la muestra en formato de cubos (figura 10). Se trocearon manualmente 345,9 g de pulpa en cubos de 1x1x1 cm aproximadamente. El mango se depositó en la boca de extracción procurando no dejar residuos de fruta en las conexiones del dispositivo.

Ambos dispositivos tenían situado en la salida del N₂ un cartucho estándar de extracción en fase sólida (diámetro interno de 0,8 cm; volumen interno de 3 mL) con 400 mg de resina LiChrolut EN que había sido previamente purificado a presión atmosférica con 20 mL de diclorometano y posteriormente secado a vacío durante 20 minutos.

Después de elegir la muestra en formato de cubos (con su correspondiente dispositivo de extracción) se procedió a preparar los extractos. Un flujo controlado de nitrógeno de 375 mL/minuto pasó a través de la muestra durante 5 h 25 minutos. Los volátiles presentes en el espacio de cabeza generados por la muestra fueron arrastrados por el nitrógeno hacia el cartucho, y retenidos por éste. Tras 5 h 25 minutos, el cartucho fue retirado del dispositivo y secado con un flujo suave de nitrógeno. Posteriormente 3,2 mL de una mezcla de disolventes (95% DCM - 5% MeOH) fueron utilizados para eluir cuantitativamente los compuestos de la resina. Al eluato se le adicionaron 40 µL de estándar interno (butirato de hexilo, 30 mg/L) antes de ser trasvasado a un concentrador tipo Kuderna-Danish, donde fue concentrado a un volumen final de 200 µL por un flujo suave de nitrógeno. Finalmente, el extracto concentrado se almacenó en el congelador a -20 °C hasta su utilización en GC-O.

3.3.2 Análisis por Cromatografía de gases-Olfatometría (GC-O)

La caracterización del perfil aromático de los extractos se realizó empleando la técnica Cromatografía de gases acoplada a un sistema olfactométrico. La utilización de esta técnica engloba tres puntos importantes: el panel olfactométrico, el análisis del extracto en un

cromatógrafo de gases provisto de una columna polar y el posterior análisis en un cromatógrafo de gases provisto de una columna apolar. A continuación, se detallará cada uno de estos puntos.

3.3.2.1 Panel olfatométrico

La técnica GC-O requiere de un conjunto de personas (panel) que evalúe cada una de las muestras a estudio. El panel empleado estuvo integrado por 6 personas (4 mujeres y 2 hombres, todos entre 22 y 31 años, con una media de edad de 28 años), miembros del grupo de investigación y con experiencia previa en análisis olfatométrico. El panel se organizó por parejas, de forma que el primer juez realizó la detección sensorial durante la primera mitad del cromatograma y posteriormente fue relevado por otro panelista. En una olfactometría posterior se invirtió el orden de la pareja de jueces. El objetivo de este fraccionamiento en el tiempo de olfacción se debe a que se intenta evitar la fatiga de los jueces. Durante la olfactometría los jueces debían indicar el tiempo, el descriptor y la intensidad con los que percibían cada uno de los aromas detectados. La escala de intensidades utilizada comprendía valores desde el 0 hasta el 3 (0 = olor no detectado, 1 = olor muy débil, 2 = olor claro, 3 = olor intenso) siendo válidos números enteros y semienteros.



Figura 11. Panelista realizando una olfactometría

3.3.2.2 Cromatógrafo de gases Trace (Columna Polar)

El cromatógrafo de gases Varian Thermo 8000 series Trace incorpora un detector de ionización a la llama (FID) y un puerto olfatométrico ODO-I de SGE (Ringwood, Australia). Este instrumento estaba equipado con una columna DB-WAX (Agilent technologies) de 30 m x 0,32 mm con un espesor de fase de 0,5 µm. Las condiciones cromatográficas en las olfactometrías fueron las siguientes: hidrógeno como gas portador (3,5 mL/min); inyección splitless (tiempo de splitless de 60 segundos); volumen de inyección de 1µL; temperatura del inyector y detector de 250 °C y un programa del horno caracterizado por la siguiente secuencia: temperatura inicial de 40 °C durante 5 minutos, rampa de 4 °C/min hasta 100 °C y rampa de 6 °C/min hasta 220 °C manteniendo la temperatura final durante 10 minutos. El equipo estaba equipado con un humidificador de agua desionizada para evitar la sequedad en la nariz. El control del cromatógrafo y la adquisición de datos se realizaron mediante el uso del software Chromcard data system 2.3 de Thermoelectron (Milan, Italia).

3.3.2.3 Cromatógrafo de gases Fisons (Columna Apolar)

Para complementar los índices de retención de los analitos en la columna polar del cromatógrafo Varian se empleó un cromatógrafo Fisons, con detector FID y un puerto olfatométrico. Este cromatógrafo permitió obtener los índices de retención en una columna apolar. La columna empleada para la separación fue una VF-5ms (Varian) de 30 m x 0,32 mm con un espesor de fase de 1 µm.

Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: hidrógeno como gas portador (3,5 mL/min); inyección en Split 1/10; volumen de inyección de 1 µL; temperatura del inyector y detector de 250 °C y un programa del horno caracterizado por la siguiente secuencia: temperatura inicial de 50 °C durante 3 minutos, rampa de 10 °C/min hasta 100 °C, rampa de 8 °C/min hasta 250 °C y mantenimiento a esa temperatura final durante 10 minutos. El control del cromatógrafo así como la adquisición de datos se llevó a cabo mediante el Software Chrom Card para Windows 3.1.

3.4 ANÁLISIS Y CONFIRMACIÓN DE LOS COMPUESTOS IDENTIFICADOS

Para confirmar la presencia de los compuestos aromáticos identificados mediante olfatometría así como para dilucidar aquellos pendientes de identificar, se empleó un cromatógrafo de gases con detector de masas de captura de iones (GC-MS). El análisis cromatográfico fue realizado en un cromatógrafo de gases GC-450 de Varian (Walnut Creek, CA, USA), equipado con una columna DB-WAX (Agilent technologies) de 60 m x 0,25 mm y con un espesor de fase de 0,25 µm. El espectrómetro de masas acoplado al cromatógrafo fue un Varian Saturn 2200. La adquisición MS se llevó a cabo durante todo el chromatograma en un rango m/z 35-220.

Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: helio como gas portador (1,5 mL/minuto); inyección en splitless (tiempo de splitless de 132 segundos); volumen de inyección de 1 µL; inyector de temperatura programable y un programa de horno caracterizado por la siguiente secuencia: temperatura inicial de 35 °C durante 3 minutos, rampa de 2 °C/min hasta 220 °C seguida por rampa de 20 °C/min hasta 240 °C. La última temperatura se mantuvo durante 30 minutos.

3.5 IDENTIFICACIÓN DE LAS ZONAS DE OLOR DESCONOCIDAS (GC-O-GC-O-MS)

Algunos de los compuestos responsables de las zonas de olor más relevantes no pudieron identificarse con los instrumentos descritos anteriormente. Por ello los extractos se sometieron a un análisis multidimensional (GC-O-GC-O-MS) de Varian (Walnut Creek, CA) compuesto por dos cromatógrafos CP-3800 independientes interconectados a través de una línea de transferencia a 200 °C, y un espectrómetro de masas 240-MS.

Inicialmente se inyectaron 10 µL de extracto para detectar olfatométricamente el tiempo de retención de los compuestos (inicio y fin de la zona de olor) en el primero de los cromatógrafos, equipado con puerto olfatométrico y detector FID. La columna empleada fue una DB-WAX (Agilent technologies) de 30 m x 0,32 mm con un espesor de fase de 0,5 µm. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: helio como gas portador (30 psi);

inyección splitless (tiempo de splitless de 156 segundos); volumen de inyección de 10 µL; temperatura del inyector de 250 °C y un programa de horno caracterizado por la siguiente secuencia: Temperatura inicial de 40 °C a lo largo de 5 minutos, rampa de 4 °C/minuto hasta 100 °C seguida por rampa de 6 °C/minuto hasta 220 °C, temperatura que se mantuvo durante 15 minutos.

A continuación, se inyectó un segundo volumen de 10µL y se criofocalizó con dióxido de carbono el flujo saliente de la primera columna durante el tiempo correspondiente a la elución del aroma de interés. El flujo de CO₂ se mantuvo durante dos minutos antes y después de la elución del aroma para garantizar la transferencia cuantitativa del analito del primer al segundo cromatógrafo. Esta fracción criofocalizada se chromatografió a continuación en el segundo cromatógrafo, que disponía también de un puerto olfatométrico. La columna empleada fue una VF-5ms (Varian) de 30 m x 0,32 mm con un espesor de fase de 1 µm, y el horno chromatográfico siguió la siguiente secuencia de temperaturas: temperatura inicial de 50 °C durante 7,45 minutos, rampa de 4 °C/minuto hasta 200 °C y rampa de 50 °C/minuto hasta 300 °C, manteniéndose dicha temperatura a lo largo de 10 minutos. Se identificó la elución del compuesto objetivo olfatométricamente en este segundo cromatógrafo y se estudiaron los espectros de masas en un rango m/z 35-220 adquiridos en el tiempo de detección del aroma con un espectrómetro de masas Varian 240-MS.

Cabe decir que todos los cromatógrafos empleados con puerto olfatométrico a su vez dispusieron de una resistencia para calentar los gases dirigidos al puerto olfatométrico y de un humidificador con agua desionizada.

3.6 TRATAMIENTO DE DATOS

3.6.1. Cálculo del índice de retención de Kovats

Para agrupar los aromas identificados por distintos panelistas e identificar los compuestos fue necesario calcular los índices de retención de las zonas de olor detectadas, tanto en la columna polar como en la apolar. La fórmula empleada fue la siguiente:

$$IR = 100 \times z + 100 \times \frac{\log t'r(x) - \log t'r(z)}{\log t'r(z+1) - \log t'r(z)}$$

Donde:

- **z** es el número de carbonos del último alcano que eluye antes que el aroma.
- **x** es el tiempo centesimal al que se detecta el aroma.
- **t'r** es el tiempo de retención neto de un compuesto

Los tiempos de elución de los alcanos se obtuvieron inyectando una disolución de alcanos C8-C30 en los mismos cromatógrafos y con los mismos programas empleados para el extracto.

3.6.2 Cálculo de la frecuencia modificada

Una vez calculados los índices de retención se trató el conjunto de datos obtenido por

los 6 panelistas en cada extracto por separado, agrupando los aromas pertenecientes a distintos panelistas que compartían índices de retención y descriptores iguales o similares. Para cada aroma se calculó su frecuencia modificada (FM), la cual es una medida de la importancia de dicho aroma en el extracto y viene dada por la fórmula propuesta por Dravnieks⁹:

$$\%FM = \sqrt{\%Fr \times \%Int}$$

donde:

$$\%Fr = (\text{Nº de panelistas que detectan el aroma} / \text{Nº de jueces en el panel}) \times 100$$

$$\%Int = (\text{Suma de las intensidades} / \text{Suma máxima posible de intensidades}) \times 100$$

La fórmula de Dravnieks considera para el cálculo de la frecuencia modificada tanto la fracción de panelistas que detectan el aroma como las intensidades que los panelistas atribuyen a dicho olor.

Se consideró que los aromas con $\%FM \geq 30$ tenían una importancia significativa en el extracto y posteriormente trataron de identificarse los compuestos que los causaban, mientras que los que no alcanzaron ese valor no se consideraron relevantes en el perfil aromático del mango.

Con esta metodología se obtuvieron los aromas ordenados por importancia sensorial en ambos extractos (mango maduro y mango verde) por separado.

3.6.3 Estudio ANOVA

Para evaluar estadísticamente las diferencias entre ambos extractos se realizó un análisis de varianza de un factor mediante el complemento XLSTAT de Microsoft Excel. En dicho análisis se eligió como factor fijo el tipo de mango (verde o maduro) y se trabajó con las intensidades que cada panelista asignó a cada zona de olor con $\%FM \geq 30$. La interpretación del valor de P fue la siguiente: si $P < 0,05$ existe una diferencia significativa para ese aroma entre los dos extractos.

Aquellos aromas que cumplieron $P < 0,05$ se consideraron interesantes porque la concentración de sus compuestos cambia significativamente durante el proceso de maduración del mango Kent.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS POR GC-O

Los resultados del análisis GC-O realizados sobre los dos mangos seleccionados se encuentran en la tabla 2. Dicha tabla incluye los índices de retención en las columnas DB-WAX y DB-5, los descriptores de aroma asociados a cada zona de olor, la identidad del compuesto odorante –en el caso de que haya sido identificado–, las frecuencias modificadas en cada mango, así como el valor de probabilidad para el factor mango obtenido en el estudio ANOVA. Cuanto menor sea el valor de P, más significativa es la diferencia de intensidad de aroma debida a la maduración, existiendo diferencias significativas si $P < 0,05$. Aquellas zonas

de olor que no alcanzaron un mínimo valor de FM (%) 30 en alguno de los mangos no se incluyeron en esta tabla por considerarse ruido. Con esta condición el número de zonas de olor encontradas se redujo a 18. Un total de 17 zonas de olor (%FM ≥ 30) se encontraron en el mango Kent maduro, mientras que solo 6 zonas de olor fueron destacables en el mango verde.

Tabla 2. Identificación y descripción de aromas por GC-O

IR DB-WAX	IR DB-5	DESCRIPTORES	COMPUESTO	FM verde	FM maduro	P
948		desagradable, comida perro	n.i.948	32		0,02
1020	943	mango, tropical, verde, cítrico	α-pineno ¹	48	50	0,82
1041	804	fresa, chuchería, tropical, manzana	butirato de etilo ¹	38	78	0,01
1059	853	lácteo, fresa, dulce, chuchería	2-metilbutirato de etilo ¹	14	60	0,00
1150		verde, césped, manzana verde	n.i.1150		73	0,00
1171		verde, vegetal, césped, geranio	n.i.1171	19	57	0,04
1327		plátano, frutal, hoja, tomate, verde	n.i.1327	10	35	0,17
1396		verde ,frutal	n.i.1396		33	0,02
1399		licoroso, fruta madura, vainilla, dulce	n.i.1399	19	31	0,51
1460		cítrico, plástico, geranio, suavizante	n.i.1460		41	0,02
1513	1093	plástico, cartón, papel, polvo	Z-2-nonenal ³	67	55	0,36
1545		rancio, café, tostado, cartón	n.i.1545	19	38	0,36
1640		tierra, pimiento verde, esparrago	n.i.1640	17	41	0,21
1826		mentolado, cloro, TCA	2,4,6-tricloroanisol ²	82	33	0,01
1905		frutal, frutal verde, pomelo	n.i.1905		41	0,01
2051		especiado, canela, caramelo	n.i.2051	8	39	0,12
2098		estíercol, purín, cuero, vómito	n.i.2098	41	43	0,83
2371		iglesia, madera, flores	n.i.2371		33	0,07

¹ identificado por olor, índices de retención en columnas DB-WAX y DB-5 y espectrometría de masas. ² identificado por olor, índices de retención en columnas DB-WAX y DB-5 y disolución patrón. ³ identificado por olor e índices de retención en columnas DB-WAX y DB-5. Los compuestos no identificados aparecen como n.i. junto a su índice de retención en columna DB-WAX

4.2 IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS POR GC-O-GC-O-MS

Tras llevar a cabo los análisis de los extractos mediante GC-O en columna polar y apolar, y posteriormente por GC-MS, algunas zonas de olor de los extractos con mucha importancia sensorial permanecían sin identificar (no estaba identificado el compuesto responsable de ese aroma). Por ello se utilizó la técnica GC-GC-O-MS como método definitivo para la identificación. Los análisis permitieron asignar inequívocamente un compuesto a las zonas de olor n.i.1150 y n.i.1170, gracias a la criofocalización del analito y posterior análisis MS.

Zona n.i. 1150: Por el índice de retención lineal y la descripción, se pensó que como

candidatos podían estar el β -pineno, 3-careno, Z-3-hexenal o mirceno. Los índices de retención en la columna DB-WAX eran muy similares, sin embargo, su índice de retención en la columna DB-5 se esperaba que fuera diferente. 10 μL del extracto concentrado se inyectaron en el primer cromatógrafo del equipo multidimensional. Se percibió la zona de olor buscada en el primer horno y se capturó esa zona. En la figura 10 se observa el pico obtenido para esa zona de olor, con descriptores verdes y un índice de retención en la columna DB-5 de 1017. El compuesto fue identificado mediante su espectro de masas (figuras 12 y 13), y resultó ser el β -pineno.

Zona n.i. 1170: Por el índice de retención lineal y la descripción, se pensó que podría tratarse de β -pineno, 3-careno o α -felandreno. Los índices de retención de los tres compuestos en la columna DB-WAX eran muy parecidos en las bases de datos, y los descriptores también eran muy similares. Sin embargo, su índice de retención en la columna DB-5 se esperaba que fuera diferente. Se inyectaron 10 μL del extracto concentrado en el primer cromatógrafo del equipo multidimensional. Se percibió la zona de olor buscada en el primer horno y se criofocalizó esa zona para traspasarla a la segunda columna y obtener el espectro de masas. En la figura 11 se observa el pico obtenido para esta zona de olor con descriptores verdes y un índice de retención en la columna DB-5 de 1032. El compuesto fue identificado mediante su espectro de masas, y resultó ser el 3-careno.

A continuación, se muestran los picos del cromatograma con sus respectivos espectros de masas.

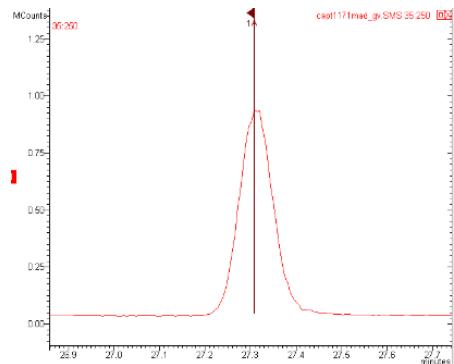


Figura 10. Pico del β -pineno

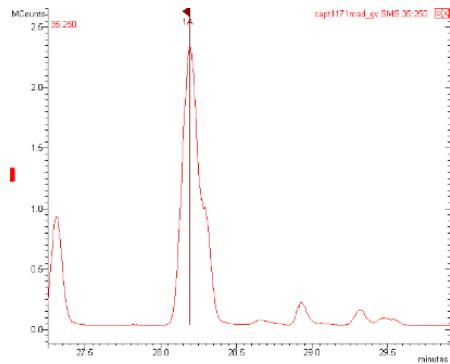


Figura 11. Pico del 3-careno

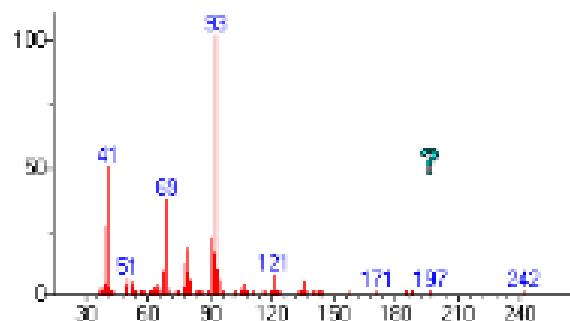


Figura 12. Espectro MS del compuesto identificado como β -pineno

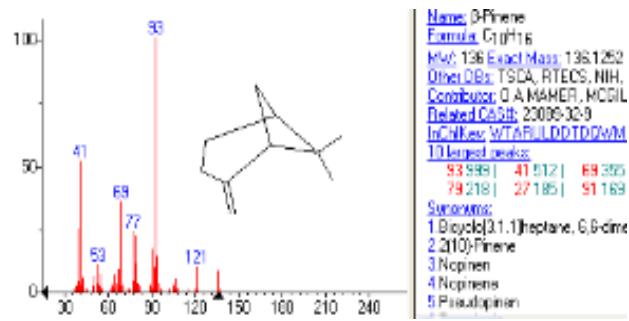


Figura 13. Espectro MS del β -pineno en la base de datos NIST

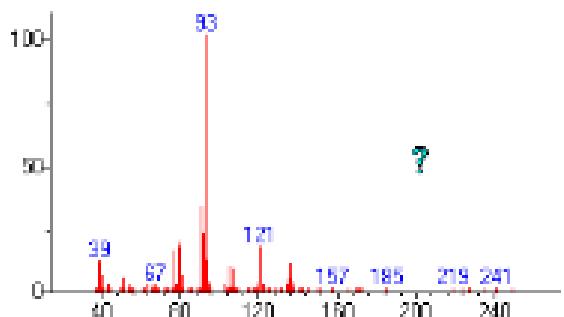


Figura 14. Espectro MS del compuesto identificado como 3-careno

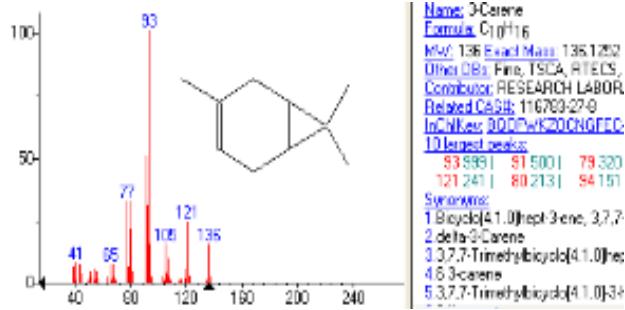


Figura 15. Espectro MS del 3-careno en la base de datos NIST

5 DISCUSIÓN

5.1 ELECCIÓN DEL FORMATO DE LA MUESTRA

Se planteó inicialmente triturar un mango entero sin piel ni hueso en una batidora. La ventaja principal de triturarlo es la homogeneización de la muestra. Sin embargo, el mango triturado tiene una viscosidad muy elevada, por lo que el flujo de nitrógeno en el dispositivo HS-SPE formó un único canal estrecho a través del puré (se establecía un camino preferencial). Al buscarse que el nitrógeno contacte con toda la muestra, se descartó este formato. Cabría la posibilidad de diluir el puré con un poco de agua, pero esta metodología no mantiene el aroma del mango percibido durante el proceso natural de olfacción.

El siguiente formato a estudiar consistió en trocear el mango en cubitos, de suficiente tamaño como para que el empaquetamiento no dificultase el paso del nitrógeno, y a la vez, del mínimo tamaño posible para maximizar el contacto entre la muestra y el nitrógeno. Este formato permitió un contacto eficaz del nitrógeno con la muestra y fue el seleccionado para la preparación de los extractos.

5.2 OPTIMIZACIÓN DEL TIEMPO DE EXTRACCIÓN

La optimización del tiempo de extracción estaba limitada por dos factores: la oxidación del aroma de la muestra y la superación del volumen de ruptura de los compuestos del aroma del mango al ser retenidos en la resina. Estos factores fueron estudiados, como se explica a continuación:

- **Oxidación del aroma de la muestra:** La utilización de fruta natural tiene el inconveniente de que se puede oxidar con facilidad una vez que la pulpa de la fruta entra en contacto con el oxígeno ambiental, pudiendo producirse una degradación de los componentes que forman parte del aroma a fruta. Es por ello que este factor debe tenerse en cuenta aunque el gas de arrastre fuera nitrógeno. Para llevar a cabo este estudio se comprobó la evolución del aroma del mango cada 60 minutos, una vez colocado en dados dentro del dispositivo de extracción (HS-SPE). Se observó que el olor inicial del mango no se

alteraba y que su intensidad se mantenía. La ventaja de que la muestra no se oxide en este dispositivo permite realizar tiempos de extracción largos sin deterioro de la muestra.

- *Volumen de ruptura:* Cada compuesto volátil posee un volumen de ruptura en la resina contenida en el cartucho, a partir del cual la resina no es ya capaz de retener cuantitativamente dicho analito. Por lo tanto, para obtener unas cantidades relativas de sustancias volátiles representativas sería necesario no rebasar mucho el volumen de ruptura del componente aromático peor retenido de la muestra, ya que de hacerlo el extracto ya no contendría todos los componentes en la proporción real. No obstante, se precisa conseguir un extracto suficientemente concentrado en volátiles, lo que favorece tiempos de extracción largos. Por estas razones es preciso optimizar el tiempo de extracción para llegar a una solución de compromiso que proporcione una representatividad adecuada con una concentración del extracto suficiente. Este parámetro se estudió mediante la olfacción del gas saliente del dispositivo de extracción (tras el cartucho) cada media hora. A las 4h 30 minutos se detectó que el gas que abandonaba el cartucho tras pasar por la resina presentaba un olor frutal significativo. Esto significó que había compuestos volátiles que ya habían sobrepasado el volumen de ruptura. A partir de este momento el extracto perdía representatividad, por lo cual se decidió parar el flujo de N₂ poco después.

5.3 OPTIMIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO

El extracto inicialmente obtenido poseía un volumen de 3,2 mL. Se procedió a la realización de pruebas olfatométricas para confirmar si la concentración de volátiles en dicho extracto era suficiente para llevar a cabo el estudio del perfil aromático con suficiente sensibilidad. Mantener el volumen de 3,2 mL permitiría realizar más olfatometrías y análisis por espectrometría de masas, lo que haría posible identificar un mayor número de compuestos con aroma. Sin embargo, las primeras pruebas olfatométricas (inyección de 1 µL en el cromatógrafo de gases TRACE) indicaron que era preciso concentrar el extracto inicial de 3,2 mL ya que la concentración de los compuestos era demasiado baja como para ser detectados por los panelistas. Por ello se concentró el extracto para obtener suficiente sensibilidad en las olfatometrías buscando conservar a la vez un volumen suficiente para los ensayos. El volumen final hasta el que se concentró fue 200 µL.

5.4 IDENTIFICACIÓN DEFINITIVA Y DESCRIPCIÓN DEL AROMA

Los resultados del análisis GC-O realizados sobre los dos mangos seleccionados se encuentran en la tabla 3. Dicha tabla incluye el índice de retención en la columna DB-WAX y DB-5, los descriptores de aroma asociados a cada zona de olor, la identidad del compuesto odorante, las frecuencias modificadas en cada mango, así como el valor de probabilidad para el factor mango obtenido en el estudio ANOVA. Aquellos compuestos identificados por la cromatografía multidimensional también fueron incluidos en la tabla.

Tabla 3. Tabla definitiva de identificación y descripción de aromas en ambos extractos

IR DB-WAX	IR DB-5	DESCRIPTORES	COMPUESTO	FM verde	FM maduro	P
948		desagradable, comida perro	n.i.948	32		0,02
1020	943	mango, tropical, verde, cítrico	α-Pineno ₁	48	50	0,82
1041	804	fresa, chuchería, tropical, manzana	Butirato de etilo ₁	38	78	0,01
1059	853	lácteo, fresa, dulce, chuchería	2-Metilbutirato de etilo ₁	14	60	0,00
1150	1017	verde, césped, manzana verde	β-Pineno ₁		73	0,00
1171	1032	verde, vegetal, césped, geranio	3-Careno ₁	19	57	0,04
1327		plátano, frutal, hoja, tomate, verde	n.i.1327	10	35	0,17
1396		verde ,frutal	n.i.1396		33	0,02
1399		licoroso ,fruta madura, vainilla, dulce	n.i.1399	19	31	0,51
1460		cítrico, plástico, geranio, suavizante	n.i.1460		41	0,02
1513	1093	plástico, cartón, papel, polvo	Z-2-Nonenal ₃	67	55	0,36
1545		rancio, café, tostado, cartón	n.i.1545	19	38	0,36
1640		tierra, pimiento verde, esparrago	n.i.1640	17	41	0,21
1826		amentolado, cloro, TCA	2,4,6-tricloroanisol ₂	82	33	0,01
1905		frutal, frutal verde, pomelo	n.i.1905		41	0,01
2051		especiado, canela, caramelo	n.i.2051	8	39	0,12
2098		estiércol, purín, cuero, vómito	n.i.2098	41	43	0,83
2371		iglesia, madera, flores	n.i.2371		33	0,07

¹ identificado por olor, índices de retención en columnas DB-WAX y DB-5 y espectrometría de masas. ² identificado por olor, índices de retención en columnas DB-WAX y DB-5 y disolución patrón. ³ identificado por olor e índices de retención en columnas DB-WAX y DB-5. Los compuestos no identificados aparecen como n.i. junto a su índice de retención en columna DB-WAX

Como se ha comentado anteriormente, el número de zonas de olor encontradas se redujo a 18. Un total de 17 zonas de olor (%FM ≥ 30) se encontraron en el mango Kent maduro, mientras que solo 6 zonas de olor fueron destacables en el mango verde.

Entre las zonas de olor presentes en el mango maduro, α-pineno, butirato de etilo, 2-metilbutirato de etilo, β-pineno, 3-careno y Z-2-nonenal se consideraron los compuestos más importantes desde el punto de vista aromático (altos %FM). El mango verde posee otros compuestos relevantes entre los que destacan α-pineno, butirato de etilo, Z-2-nonenal y 2,4,6-tricloroanisol (TCA). Además de los anteriores, se han encontrado otras zonas de olor que no han podido ser identificadas: n.i.948 con notas desagradables, n.i.1327 y n.i.1396 con descriptores verdes y frutales, n.i.1399 con descriptores dulces y frutales, n.i.1460 con descriptores florales, n.i.1545 con descriptores desagradables como rancio o cartón, n.i.1640 con descriptores terrosos, n.i.1905 con notas frutales, n.i.2051 con descriptores dulces y especiados, n.i.2098 con descriptores desagradables como vómito o estiércol y n.i.2371 con olor a madera vieja. Estos compuestos no se identificaron por falta de tiempo y por considerarse que son menos importantes desde el punto de vista aromático.

El butirato de etilo, con descriptores como fresa o chuchería, parece estar relacionado con el intenso dulzor del aroma del mango maduro. El aroma dulce de este compuesto podría verse reforzado por el 2-metilbutirato de etilo (también con descriptores dulces como fresa o bayas rojas), con una frecuencia modificada considerable ($FM = 60$). Tanto el butirato de etilo como el 2-metilbutirato de etilo están presentes también en el mango verde, pero sus frecuencias modificadas son mucho menores en este extracto ($FM = 38$ y $FM = 14$ respectivamente). La gran diferencia entre ambos extractos se refleja en los valores de P (0,01 para el butirato de etilo y 0,00 para el 2-metilbutirato de etilo). La aparición de estos dos compuestos con aroma dulce parece estar ligada al proceso de maduración. Se observa que hay un aumento en la frecuencia modificada de dichos compuestos al pasar del estado inmaduro o verde al estado maduro. Es por ello que se cree que su evolución es responsable de las notas dulces del aroma de la fruta madura. La presencia de estos compuestos en el mango ya ha sido encontrada con anterioridad en otras variedades. Munafo³ ya destacó la relevancia del butirato de etilo en el aroma de la variedad de mango Haden. Dicho autor también anotó la presencia del 2-metilbutirato de etilo, aunque con una importancia aromática inferior al butirato de etilo, tal como se ha observado en este trabajo.

Otros compuestos como el β -pineno, con descriptores como verde o césped, y 3-careno, con notas verdes y vegetales, pueden aportar las notas a fruta fresca del aroma del mango maduro. Se observa como el β -pineno está ausente en el mango inmaduro mientras que su frecuencia modificada es elevada en el mango maduro ($FM = 73$). De igual forma, la frecuencia modificada del 3-careno sufre un aumento conforme la fruta madura. Es posible que otras zonas de olor que también poseen estos descriptores verdes (n.i.1327 o n.i.1396, por ejemplo) también aporten estas notas frescas al mango. No obstante sus frecuencias modificadas se encuentran próximas al mínimo considerado ($FM = 30$) por lo que no llegan a tener una importancia aromática tan elevada como es el caso del β -pineno y del 3-careno.

El α -pineno tiene unas frecuencias modificadas similares en ambos extractos ($FM = 50$ en el mango maduro y $FM = 48$ en el mango verde). Este compuesto parece ser el responsable del característico aroma tropical del mango. Sus descriptores a mango, tropical, verde y cítrico parecen aportar estas notas independientemente del estado de maduración del mango. Existe otra zona de olor, n.i.2098, cuya frecuencia modificada permanece prácticamente constante durante la maduración del mango ($FM = 41$ en el mango verde y $FM = 43$ en el mango maduro). Su invariabilidad se refleja en el valor de significatividad ($P = 0,83$). El compuesto responsable de dicha zona de olor no pudo ser identificado. A pesar de que esta zona de olor tiene descriptores con un tono hedónico negativo (vomito, purín o estiércol), la concentración de este compuesto (n.i.2098) no es suficiente como para transmitirle sus descriptores desagradables al aroma del mango.

Respecto al aroma provocado por el Z-2-nonenal, su frecuencia modificada es relativamente alta y parecida en ambos extractos ($FM = 67$ en el mango verde y $FM = 55$ en el mango maduro). Sin embargo, sus descriptores, principalmente desagradables (plástico, cartón, papel, polvo) no parecen apreciarse en el aroma de la fruta madura o verde, por lo que no puede asegurarse que el Z-2-nonenal sea característico del aroma base del mango. De hecho, este es el primer trabajo que identifica el Z-2-nonenal entre los compuestos con importancia aromática en el mango Kent. Otros autores, como Pino² o Pandit¹, identificaron su isómero, E-2-nonenal, como uno de los compuestos relevantes en el aroma del mango Kent. Asimismo, Munafo³ también encontró el E-2-nonenal como un compuesto

sensorialmente activo en otras variedades de mango como “Haden”, “Praya Sowoy” y “White Alphonso”. Sin embargo, tanto los descriptores aportados por los jueces como los índices de retención parecen asegurar que es el Z-2-nonenal.

El TCA parece ser el compuesto dominante en el perfil aromático del mango verde (FM = 82). Este compuesto es mucho menos abundante en el mango maduro, tal como indica su frecuencia modificada en este extracto (FM= 33) y el valor de P (0,01). El papel del TCA no se limita a contribuir al aroma del mango. Takeuchi¹⁰ demostró que este compuesto es un potente supresor olfativo, por lo que tiene un efecto antagonista en la percepción olfativa del resto de aromas. Por ello parece ser que el TCA es el causante de anular en gran parte las notas frutales y dulces del mango verde. En el mango maduro su efecto es similar pero mucho menos importante dada su menor frecuencia modificada.

Estas observaciones del estudio de los perfiles aromáticos sugieren importantes cambios en la composición química del mango durante el proceso de maduración de la fruta.

6 CONCLUSIONES

En este trabajo se ha abordado por primera vez el estudio del perfil aromático del mango Kent mediante las técnicas HS-SPE dinámica para la preparación de los extractos y Cromatografía gas – Olfatometría en el análisis sensorial de los mismos.

Mediante la técnica HS-SPE se lograron extractos aromáticos representativos del mango fresco y por GC-O se describieron y jerarquizaron por importancia los aromas detectados en los extractos de mango maduro y mango verde.

Se han conseguido identificar de manera inequívoca los compuestos aromáticos con mayor responsabilidad en el aroma característico del mango maduro. Por orden de importancia potencial estos son el butirato de etilo, β -pineno, 2-metilbutirato de etilo, 3-careno, Z-2-nonenal (en este la identificación no es inequívoca, sino probable) y α -pineno.

Asimismo, se ha demostrado que el perfil aromático del mango Kent depende críticamente del estado de maduración de la fruta. De hecho, de los 6 componentes más importantes del aroma del mango maduro, tan solo dos de ellos (α -pineno y Z-2-nonenal) se detectaron con intensidades similares o superiores en el mango verde. Los otros cuatro se detectaron con intensidades inferiores a la mitad, o incluso ni se llegaron a detectar (caso del β -pineno). De manera remarcable, el perfil olfactométrico del mango verde es completamente diferente, ya que resulta dominado de manera casi completa por el 2,4,6-tricloroanisol (TCA) (identificación probable) y por el Z-2-nonenal, seguido por el α -pineno, cuya intensidad no varió durante la maduración.

7 BIBLIOGRAFIA

1. S. S. Pandit, Food Chem. 2009, 114 (1), 363-372
2. J. A. Pino, Flavour Fragrance J. 2006, 21 (2), 207-213
3. J. P. Munafo, J. Agric. Food Chem. 2014, 62 (20), 4544-4551
4. V. Ferreira, J. Chromatogr. Sci. 2000, 38 (11), 469 - 476
5. V. Ferreira, J. Chromatogr. A. 2004, 1025 (2), 147 - 156
6. M. Lebrun, Postharvest Biol. Technol. 2008, 48 (1), 122-131
7. M. B. Egea, Food Chem. 2014, 164, 272-277
8. F. San-Juan, Food Chem. 2010, 123 (1), 188 - 195
9. A. Dravnieks en Atlas of odor character profiles, Vol.61, ASTM, Philadelphia, 1985, pp.1-354
10. H. Takeuchi, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2013, 110 (40), 16235–16240