



UNIVERSIDAD DE BURGOS

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS
ÁREA DE INGENIERÍA QUÍMICA

**EVALUACIÓN DEL PERFIL DE
COMPUESTOS VOLÁTILES EN BATIDO DE
CHOCOLATE A LO LARGO DE SU VIDA
COMERCIAL**

TESIS DE MÁSTER

Mónica Aguado Urda

Septiembre de 2009



UNIVERSIDAD DE BURGOS

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS
ÁREA DE INGENIERÍA QUÍMICA

DRA. DÑA. MARÍA OLGA RUIZ PÉREZ,
PROFESOR CONTRATADO DOCTOR FIJO DEL ÁREA DE INGENIERÍA QUÍMICA
DE LA UNIVERSIDAD DE BURGOS

Certifica:

Que Dña. Mónica Aguado Urda, ha realizado el *Practicum* en la Empresa “Grupo Leche Pascual” bajo la dirección de Susana Herrera Silla (Grupo Leche Pascual) y de María Olga Ruiz Pérez (Universidad de Burgos) cuyos resultados se muestran en la presente memoria con título «Evaluación del perfil de compuestos volátiles en batido de chocolate a lo largo de su vida comercial». La memoria presentada corresponde al desarrollo de la Tesis de Máster del Máster Europeo en Seguridad y Biotecnología Alimentarias.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Burgos a 25 de septiembre de 2009.

Fdo. María Olga Ruiz Pérez

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. OBJETIVOS | 4 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 4 |
| 3.1. REACTIVOS..... | 4 |
| 3.2. PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES ESTÁNDAR..... | 4 |
| 3.3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS | 4 |
| 3.4. MÉTODO ANALÍTICO: HEADSPACE-PTV-CROMATROGRAFÍA DE GASES- ESPECTROMETRÍA DE MASAS | 4 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 6 |
| 4.1. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO HS-PTV-CG-EM | 6 |
| 4.2. CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN MUESTRAS DE BATIDO DE CHOCOLATE | 10 |
| 4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE RESULTADOS | 16 |
| 5. CONCLUSIONES | 18 |
| 6. AGRADECIMIENTOS..... | 18 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA..... | 19 |

RESUMEN. En el presente trabajo se ha estudiado el perfil de compuestos volátiles responsables del flavor característico del batido de chocolate Pascual, así como las variaciones de dicho perfil en función del tiempo de almacenamiento del producto durante su vida comercial. Como punto de partida se realizó un estudio fundamental de los compuestos volátiles que determinan el flavor característico del producto. Se ha realizado la puesta a punto de un novedoso sistema analítico de cromatografía de gases-espectrometría de masas acoplado al análisis del espacio de cabeza (*Headspace*) y a un inyector PTV. El inyector PTV funcionó a la vez como sistema de trampa y purga. Esta configuración permitió una elevada sensibilidad en la cuantificación de los compuestos volátiles (ppb), un alto grado de automatización y una mínima preparación de la muestra alimentaria. La aplicación del método de análisis ha permitido evaluar la calidad sensorial del batido de chocolate Pascual desde su producción hasta el final de su vida útil. Los resultados demostraron que el perfil de volátiles de dicho producto permanece prácticamente inalterado durante su vida comercial.

Palabras clave: *Compuestos Volátiles, Flavor, Batido de Chocolate, Cromatografía de Gases–Masas, HS-PTV-CG-EM, Vida Comercial.*

1. INTRODUCCIÓN

El flavor es un factor clave en la evaluación sensorial del alimento. Los compuestos volátiles contribuyen significativamente en el flavor de productos alimentarios, incluso aunque suelen estar presentes en baja concentración (ppb) [1]. Las tendencias actuales seleccionan a la cromatografía de gases como la técnica analítica a utilizar en la identificación y cuantificación de estos compuestos volátiles. En concreto, en este estudio se ha seleccionado la cromatografía de gases asociada a espectrometría de masas (CG-EM). Es importante destacar que los productos alimentarios son matrices complejas y en la mayoría de los casos, es necesario someter a la muestra a una preparación, es decir, a un pre-tratamiento de extracción y concentración antes de su inyección en el cromatógrafo de gases [2, 3]. Las técnicas de preparación de la muestra incluyen numerosas variantes de extracción (con disolventes líquidos, con fluidos supercríticos, asistida por microondas, combinada con destilación, extracción Soxhlet) o la técnica del análisis del espacio de cabeza o headspace (HS) estático o dinámico [4, 5, 6]. Una desventaja de los métodos de extracción es que requieren grandes cantidades de muestra y de disolventes y normalmente necesitan un paso de pre-concentración previo, ocasionando en muchos casos, cambios cualitativos y cuantitativos en la muestra, que deberán estar perfectamente corregidos en el método analítico global [7]. El análisis del HS es una técnica sencilla que produce extractos representativos del aroma original del alimento, minimiza la etapa de preparación de la muestra, no introduce disolvente en ningún punto del análisis (el pico del disolvente en el cromatograma normalmente interfiere con los volátiles de interés) y la muestra en sí es gaseosa, por lo que también se minimiza el deterioro de la columna al no tener que trabajar a su temperatura límite. Además, es posible realizar un enriquecimiento de los volátiles presentes en el espacio de cabeza mediante una trampa fría o un soporte inerte, al pasar un flujo continuo de gas portador a través de dicha matriz, sobre todo a bajas concentraciones [8]. Debido a ello, en este trabajo de investigación se ha seleccionado la técnica del análisis de la composición del espacio de cabeza (HS) acoplado a un inyector PTV que contiene una trampa (*liner*) rellena de material adsorbente que resulta ser una novedosa configuración. El enriquecimiento de los compuestos volátiles presentes en el HS se ha realizado por tanto, mediante una variante de la técnica de trampa y purga, en la que se produce la retención de los volátiles en una trampa adsorbente fría que permite el paso del gas portador

purgándolo. Los volátiles retenidos son desorbidos posteriormente mediante el calentamiento de la trampa e inyectados automáticamente en la columna del cromatógrafo. El polímero adsorbente más usado es Tenax (p-2, 6-difenileneóxido). Las trampas de Tenax atrapan y desorben eficientemente compuestos no polares y no retienen agua por su carácter hidrofóbico. Como desventaja hay que relacionar la baja retención de compuestos de bajo peso molecular [1]. En la configuración seleccionada en este trabajo de investigación, la trampa adsorbente de Tenax se encuentra dentro del inyector es decir, que se ha usado un inyector PTV (*Programmable Temperature Vaporizing*) con un *liner* (trampa) relleno con material adsorbente (Tenax). Esta configuración se considera un sistema pre-columna óptimo de enriquecimiento de muestra, lo que permite mejorar el proceso analítico,

Los inyectores PTV se utilizan como inyectores para grandes volúmenes de muestra (hasta 3 ml) y su uso permite el análisis de compuestos volátiles en alimentos sin un paso intermedio de concentración [7]. Un inyector PTV tiene las mismas funciones básicas que un inyector *split/splitless* excepto porque es posible programar su temperatura desde -60° C (si se usa CO₂ como refrigerante) o -160 °C (si se usa N₂ líquido como refrigerante) hasta 450° C a velocidades de hasta 720 °C/ min [9]. El uso de un inyector PTV que se encuentre frío al introducir la muestra y que permita el posterior calentamiento para la evaporación del disolvente y/o la desorción de los analitos, elimina los problemas relacionados con la evaporación parcial de la muestra que presentan los inyectores calientes [2]. Además, la muestra no se lleva a un entorno caliente oxidativo sino a un sistema frío, en esta situación los compuestos volátiles no son susceptibles de oxidación como ocurre al utilizar un inyector caliente del tipo *split/splitless*. El uso de un PTV otorga resultados más precisos y reproducibles que los inyectores clásicos. En general, se puede considerar que el inyector PTV permite concentrar los analitos presentes en la fase gaseosa del espacio de cabeza (HS) gracias a un efecto criogénico, permitiendo inyectar grandes volúmenes de muestra, de esta manera es posible mejorar la sensibilidad del método, manteniendo la simple instrumentación de la técnica HS y se posibilita la automatización del análisis [10, 11].

Los compuestos volátiles de la leche y de otros derivados lácteos han sido extensamente estudiados, particularmente los responsables de sabores indeseados (*off-flavors*) ya que provocan el rechazo del consumidor. Los tratamientos térmicos aplicados a la leche representan una de las causas más frecuentes de aparición de *off-flavors*. El tratamiento térmico UHT (*Ultra High Temperature*) es el método de esterilización más empleado en la leche (T>130°C durante 1-10 s). El UHT destruye las bacterias, otorgando al producto lácteo una vida media más larga, pero causa también cambios químicos que se han asociado con la generación de compuestos volátiles que otorgan a la leche sabores indeseados, descritos con los atributos “*sulfurous, stale y cooked*”, entre los que se pueden destacar: aldehídos, cetonas y compuestos sulfurados. Tres de los odorantes activos más potentes en leche UHT son 2-heptanona, 2-nonanona y nonanal, siendo los dos primeros los principales compuestos contribuyentes al flavor de la leche UHT [12, 13]. En el estudio reciente de Naudé *et al.* [13] se demostró además, que la combinación de 2- heptanona y 2-nonanona produce un efecto sinérgico otorgando un flavor ácido, similar al del queso feta o al del queso azul. El flavor de los productos lácteos está muy influenciado por la presencia de compuestos volátiles sulfurados como el dimetildisulfido (DMDS), pero estos compuestos son difíciles de detectar y analizar debido a su elevada volatilidad, sensibilidad al calor, a la oxidación y a la baja concentración en la que se encuentran en la mayoría de los casos. A pesar de su baja concentración los compuestos sulfurados contribuyen fuertemente al flavor de los productos lácteos [14].

El almacenamiento es otra de las causas comunes de desarrollo de *off-flavors* en los productos lácteos debido a causas variadas como: crecimiento microbiano, acción de enzimas (presentes en la leche de manera natural o enzimas bacterianas) o cambios químicos [1]. Generalmente se han estudiado los *off-flavors* que aparecen al final de la

vida útil del producto [6]. Valero *et al.* [15] monitorizaron los cambios en la composición de volátiles de la leche UHT entera y desnatada durante su almacenamiento a temperatura ambiente durante 4 meses, observando que hasta el día 90 no se producían cambios significativos en el perfil aromático del producto. Durante el cuarto mes de almacenamiento se observó, principalmente, un aumento del nivel de metilcetonas, que resultó más pronunciado en la leche entera. Este aumento en la concentración de metilcetonas se correlacionó con puntuaciones más bajas en el análisis sensorial de la leche almacenada en comparación con la leche fresca.

La leche con chocolate es un derivado lácteo y representa uno de los productos con sabor a chocolate más demandado por los consumidores. A pesar de ello, existen pocos trabajos de investigación que se centren en el estudio del perfil volátil de este producto. Schnermann y Schieberle [16] lograron determinar mediante la técnica AEDA (*Aroma Extract Dilution Analysis*) hasta 51 compuestos volátiles en la leche con chocolate, describiendo el 3-metilbutanal como uno de los odorantes más potentes de este producto. Existen numerosos estudios sobre los compuestos volátiles que contribuyen al flavor característico del chocolate y el cacao. En general, los aldehídos fenilacetaldehído y 3-metilbutanal se han descrito como odorantes importantes en el chocolate y se ha demostrado que la combinación de 3-metilbutanal y DMDS (o compuestos sulfurados en general) produce sabor a chocolate [17]. Counet *et al.* [18] demostraron mediante la técnica AEDA que los aldehídos 2-metilpropanal, 2-metilbutanal y 3-metilbutanal otorgan un fuerte flavor a chocolate, mientras que pirazinas como la trimetilpirazina entre otras, otorgan sabores a cacao/praliné con notas de avellana/café en el chocolate negro. En el estudio reciente de Serra-Bonvehí [19] se concluyó que el benzaldehído, el fenilacetaldehído y la acetofenona entre otros, son componentes odorantes mayoritarios en el cacao en polvo. En el único estudio existente hasta la fecha a cerca de los cambios en la composición volátil de la leche con chocolate durante su almacenamiento se determinó que el producto fresco contenía elevadas cantidades de compuestos furfúlicos mientras que la leche con chocolate almacenada contenía dos 3,5-octadien-2-onas y algunas lactonas [20]. Al contrario que otros sabores naturales como la vainilla (vainillina) o la almendra (benzaldehído), el flavor del chocolate y del cacao reside en su fracción volátil, compuesta por una mezcla compleja de más de 500 compuestos. Por lo tanto, el análisis de la fracción volátil de productos que contienen cacao es esencial para el estudio de su perfil aromático [21].

El batido de chocolate Pascual es un derivado lácteo muy popular. Para su fabricación se produce primeramente el batido de silo que contiene todos los ingredientes (leche semidesnatada Pascual, azúcar, cacao desgrasado y aroma). Este batido de silo es posteriormente sometido a un tratamiento térmico UHT obteniéndose el producto final. Gracias al tratamiento UHT se consigue prolongar la vida útil del producto, que se establece en 6 meses tras la fecha de envasado. Los tratamientos térmicos a menudo otorgan *off-flavors* a los productos lácteos. El batido de chocolate es un producto con un flavor característico influenciado por el tratamiento térmico al que es sometido, y que puede verse modificado durante el almacenamiento en el tiempo de vida útil. Mediante esta investigación se ha pretendido estudiar el perfil característico de compuestos volátiles que determinan el flavor del batido de chocolate Pascual, así como los posibles cambios en dicho perfil durante su almacenamiento a lo largo de su vida útil que pueda alterar la calidad sensorial del producto. Para ello se ha utilizado la técnica HS como medio de extracción de volátiles mediante un HS sampler automático que, acoplado a un inyector PTV equipado con un *liner* empaquetado con Tenax, y seguido de una cromatografía de gases capilar acoplada a espectrometría de masas (HS-PTV-CG-EM), permitió mantener la simple instrumentación del HS y la automatización de los análisis, junto con una elevada sensibilidad y reproducibilidad.

2. OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo de investigación es la evaluación de los compuestos volátiles en el batido de chocolate de Pascual a lo largo de su vida comercial. La finalidad de este estudio es la verificación de la calidad sensorial del batido de chocolate durante su vida útil mediante una metodología sencilla y que permita un elevado grado de automatización.

El desarrollo de este objetivo general se realizó tratando de cubrir los objetivos parciales que se resumen a continuación:

- Estudio de los compuestos volátiles característicos del batido de chocolate y determinación de los compuestos útiles para la valoración de la calidad sensorial.
- Optimización del método de análisis *Headspace*-PTV-Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas.
- Estudio de la evolución del perfil de volátiles en el batido de chocolate Pascual a lo largo de su vida útil.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. REACTIVOS

Los compuestos volátiles de referencia: acetofenona, benzaldehído, DMDS, fenilacetaldehído, 2-heptanona, hexanal, 2-metilbutanal, 3-metilbutanal, 2-metil-3-heptanona (PI: patrón interno), 2-metilpropanal, 2-nonanona, y trimetilpirazina, con una pureza mayor o igual al 90%, fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Sleinheim, Alemania).

3.2. PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES ESTÁNDAR

Para optimizar los parámetros cromatográficos se prepararon soluciones estándar de los 11 compuestos en leche semidesnatada de silo (no sometida a UHT), y que fueron empleadas para obtener las curvas de calibrado así como los límites de cuantificación del método (ppb). Las curvas de calibrado se obtuvieron mediante la técnica de la adición de estándares aplicando un análisis de regresión lineal sobre el ratio de concentración (concentración del compuesto/concentración del patrón interno) y el ratio de área de pico (área del compuesto/ área del patrón interno). Dichas curvas de calibrado fueron usadas para calcular la concentración de los analitos en las muestras de batido de silo y batido de chocolate.

3.3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

La leche semidesnatada de silo (1,6% materia grasa), el batido de silo y el batido de chocolate UHT (leche semidesnatada, azúcar; cacao desgrasado al 1.4%; estabilizadores: E-339, E-466; espesante: E-407; emulgente: E-471 y aroma) fueron obtenidos de la planta del Grupo Leche Pascual de Aranda de Duero (Burgos, España). Las muestras de batido UHT fueron almacenadas a temperatura ambiente tomando muestras y congelándolas a tiempo 0 (mismo día de producción), 1, 2, 3 y 6 meses tras la fecha de producción. Para la cuantificación se añadieron 100 µg/L de patrón interno a cada muestra. Se analizaron tres réplicas de cada muestra mediante el método que se describe a continuación.

3.4. MÉTODO ANALÍTICO: HEADSPACE-PTV (PROGRAMMED TEMPERATURE VAPORIZATION)-CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS

El equipo analítico utilizado es un cromatógrafo de gases acoplado a un HS-dinámico, con un inyector PTV y con un detector de espectrometría de masas (HS-PTV-

CG-EM). Un esquema del dispositivo experimental se muestra en la **Figura 1**. Este diseño permitió un elevado grado de automatización.

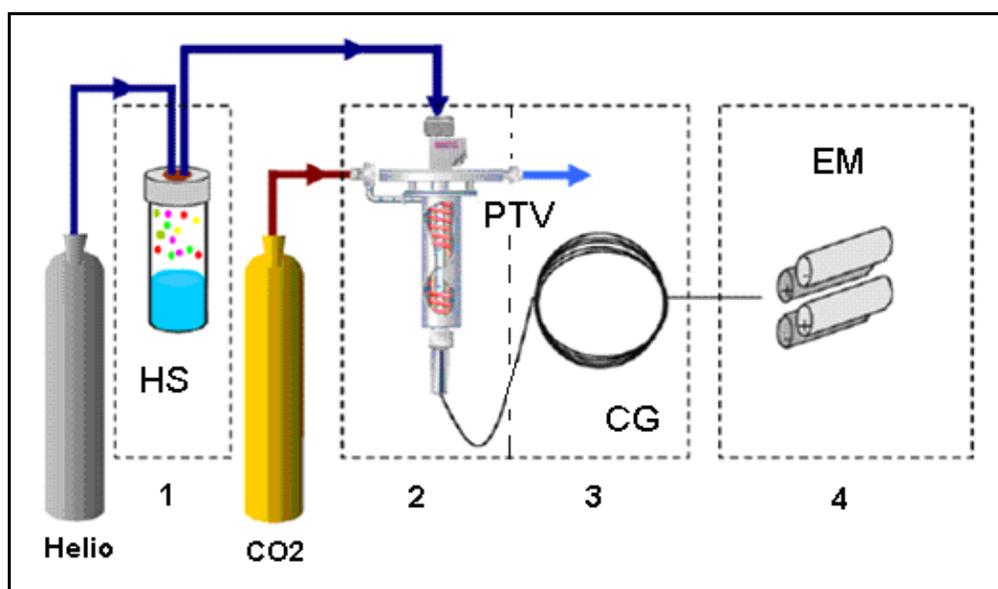


Figura 1. Esquema del aparato usado para los análisis (adaptado de Pérez-Pavón et al. [22])

3.4.1. Headspace

Para cada muestra se introdujeron 5 mL de la misma en un vial de 10 mL que se selló con una tapa equipada con un *septum* de silicona. Las muestras se introdujeron en el Network Headspace Sampler G1888 (Agilent Technologies). Este aparato está equipado con una bandeja para 70 viales de muestra consecutivos y un horno con posiciones para 12 viales. La temperatura del horno para el equilibrio de las muestras se programó a 90° C durante 15 minutos. Las muestras fueron agitadas durante el tiempo de equilibrio. Tras el equilibrio el vial fue purgado con helio hacia el *loop* de níquel de 3 mL, que se mantuvo a 100° C. La línea de transferencia que transportó la muestra hacia el inyector PTV se mantuvo a 125 ° C.

3.4.2. PTV

Para todos los experimentos se usó un inyector PTV (HT PTV Inlet G3506A, Agilent Technologies) equipado con un *liner* empaquetado con Tenax-TA. En todos los casos el PTV funcionó en el modo de inyección *solvent vent*. La refrigeración del PTV se llevó a cabo mediante CO₂. La temperatura inicial del PTV fue de 20° C. El flujo de venteo se ajustó a 50 ml/min y la presión de venteo a 6.7 psi. Tras 1.5 minutos, la válvula de *split* se cerró y el *liner* se calentó rápidamente a una velocidad de 300° C/minuto hasta 250 °C. Los analitos fueron entonces transferidos a la columna. La válvula de *split* se abrió de nuevo al minuto 4 y se mantuvo el *liner* a 250 °C durante 10 minutos.

3.4.3. Cromatografía de gases

Para llevar a cabo la cromatografía de gases se usó el equipo 7890A GC de Agilent Technologies equipado con una columna capilar HP-5 (30m x 0.25mm x 0.25 µm). La temperatura del horno se programó de la siguiente forma: una temperatura inicial de 35° C durante 5 minutos tras lo cual se incrementó a 10° C/ min hasta alcanzar los 230° C y después a 30° C/ min hasta una temperatura final de 250° C, temperatura a la cual se mantuvo durante 5 minutos más. El tiempo total de cromatograma fue de 30.16 min. Las condiciones experimentales se esquematizan en la **Figura 2**.

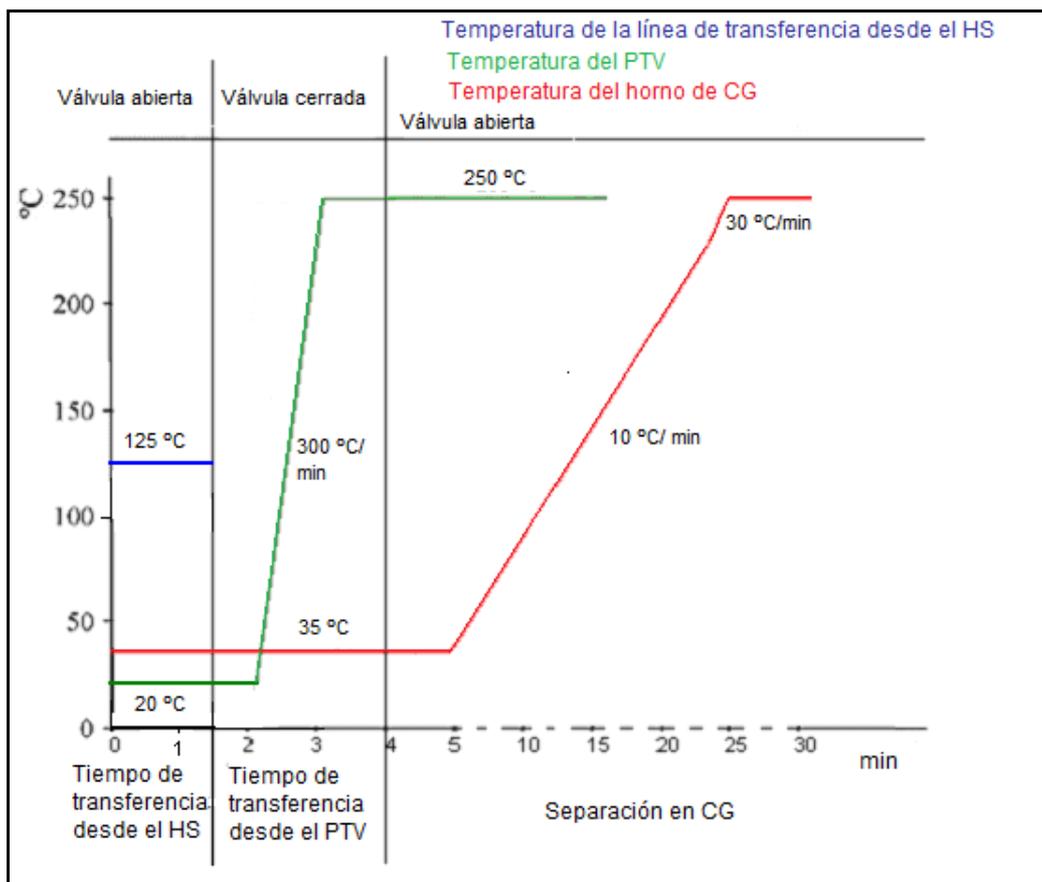


Figura. 2. Esquema del proceso de inyección en modo solvent-vent y cromatografía de gases (adaptado de Pérez-Pavón et al. [23]).

3.4.4. Espectrometría de masas

Como detector se usó un espectrómetro de masas de cuadrupolo (5975C, Agilent Technologies). Este dispositivo funcionó en modo impacto de iones con un voltaje de ionización de 70 eV. La temperatura de la fuente de iones fue de 230° C y la del cuadrupolo de 150° C. El rango m/z escaneado fue 40-300 amu. La identificación de los diferentes compuestos se realizó mediante comparación de los tiempos de retención con los de los estándares inyectados bajo las mismas condiciones así como de los espectros obtenidos experimentalmente con aquellos de la base de datos NIST'05 (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, versión 2.0).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO HS-PTV-CG-EM

4.1.1. Discusión sobre el método analítico

La secuencia de pasos que implicó la inyección de la muestra se esquematiza en la **Figura 2**. Inicialmente, la muestra fue transportada desde el *headspace* del vial a través de la línea de transferencia y posteriormente inyectada en el *liner* del PTV refrigerado. La válvula de *split* se abre permitiendo la eliminación del solvente mientras que los analitos quedan atrapados en el material adsorbente que rellena el *liner*. De esta manera, incluso trabajando con compuestos de bajo punto de ebullición, como es el caso de los volátiles, éstos pueden ser retenidos mediante el uso de *liners* empaquetados con un material adsorbente adecuado como el Tenax TA [22]. En el siguiente paso la válvula se cierra y el inyector PTV se calienta rápidamente (300°C/min) hasta alcanzar una temperatura de 250°C, con este paso se consigue la

desorción de los analitos que son transferidos rápidamente a la columna cromatográfica. Finalmente la válvula *split* se abre de nuevo y pasa una corriente de helio a través del *liner*, limpiándolo y dejándolo preparado para la siguiente inyección. Mientras, la separación cromatográfica se está produciendo en la columna mediante el programa de temperatura descrito en la **Figura 2**. La inyección en modo *solvent-vent* otorga ventajas con respecto a la inyección de tipo *splitless* produciendo una mejora en la forma de los picos obtenidos, que son mucho más afilados. La inyección *splitless* de un elevado volumen de *headspace* es demasiado lenta como para dar picos afilados. Por el contrario, cuando se trabaja en modo *solvent-vent* existe una concentración previa a baja temperatura de los analitos en el *liner* y la transferencia a la columna es mucho más rápida. Se ha demostrado que la mejora en la forma de los picos así como en la respuesta (mayor área de pico) de las medidas realizadas mediante inyección en modo *solvent-vent* en comparación con el modo *splitless*, resultan en ratios señal/ruido mayores y por lo tanto límites de detección más bajos [23]. Por tanto, la principal ventaja de esta metodología es el uso del inyector PTV. La inyección en modo *solvent-vent* acoplada al uso de la técnica del *headspace* para la extracción de la muestra otorga resultados satisfactorios y minimiza el efecto de la matriz en la que se encuentran los volátiles. Una ventaja importante de la metodología usada es que la muestra no requiere tratamiento previo, minimizando la aparición de artefactos analíticos y errores asociados con los pasos previos [10]. Este tipo de configuración automatizada en la que la fijación en frío de los volátiles se acopla a la extracción de la muestra mediante *headspace* ha sido usada en contadas ocasiones existiendo en la bibliografía sólo unos pocos artículos en los que se describe su uso [10, 11, 22, 23, 24].

4.1.2. Selección de los compuestos volátiles que determinan la calidad sensorial del batido de chocolate

La selección de los volátiles de interés se realizó en base a la revisión de la bibliografía consultada sobre *off-flavors* (flavores indeseados) en productos lácteos y volátiles responsables del flavor a chocolate descrita en la introducción. Los compuestos seleccionados para su cuantificación se relacionan en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Compuestos de interés a estudiar en el batido de chocolate.

| Compuesto | Características organolépticas que otorga al batido | Referencias |
|-----------------|--|------------------|
| 2-Metilpropanal | Fuerte sabor a chocolate, compuesto volátil importante en el flavor del chocolate negro junto con 2-metilbutanal y 3-metilbutanal. | [17, 19] |
| 3-Metilbutanal | Fuerte sabor a chocolate, compuesto volátil importante en el flavor del chocolate negro junto con 2-metilbutanal y 2-metilpropanal, presentando la mayor actividad odorante de entre los tres aldehídos. | [16, 17, 19] |
| 2-Metilbutanal | Fuerte sabor a chocolate, compuesto volátil importante en el flavor del chocolate negro junto con 2-metilpropanal y 3-metilbutanal. | [17, 19] |
| DMDS | Otorga el atributo de sabor sulfuroso y tiene gran actividad odorante. La combinación de 3-metilbutanal y DMDS otorga sabor a cacao/chocolate. | [16, 17, 19, 20] |
| Hexanal | Otorga aroma a hierba cortada. Es uno de los aldehídos más importantes causantes de <i>off-flavors</i> en la leche UHT. Y en la leche de soja UHT. | [25] |
| 2-Heptanona | Otorga atributos sensoriales como: jabonoso, afrutado o floral. Es uno de los principales causantes del <i>off-flavor cooked</i> típico de la leche UHT junto con 2-nonanona y DMDS. | [13] |
| Benzaldehído | Otorga el atributo sensorial: almendra amarga. Es uno de los componentes mayoritarios en el aroma del cacao junto con el fenilacetaldéhído y la acetofenona. | [16, 17, 19, 20] |

Tabla 1 (Continuación). Compuestos de interés a estudiar en el batido de chocolate.

| Compuesto | Características organolépticas que otorga al batido | Referencias |
|--------------------------|--|------------------|
| Trimetilpirazina | Otorga notas de flavor a cacao/praliné. También se ha descrito como participante en el aroma de avellana tostada. | [16, 17, 19, 20] |
| Fenilacetaldehído | Otorga atributos sensoriales como: avellana, dulce o miel. Es uno de los componentes mayoritarios en el aroma del cacao junto con el benzaldehído y la acetofenona. | [16, 17, 19, 20] |
| Acetofenona | Otorga atributos sensoriales como: floral, almendra o dulce. Es uno de los componentes mayoritarios en el aroma del cacao junto con el benzaldehído y la acetofenona. | [16, 17, 19, 20] |
| 2-Nonanona | Otorga atributos sensoriales como: afrutado o dulce. Es uno de los principales causantes del <i>off-flavor cooked</i> típico de la leche UHT junto con 2-heptanona y DMDS. | [13] |
| 2-Heptanona + 2-Nonanona | Se ha demostrado que la combinación de estas dos cetonas típicas de la leche UHT tiene un efecto sinérgico otorgando al producto atributos sensoriales como: ácido, queso azul o queso feta. | [13] |

4.1.3. Selección de los parámetros de análisis

Con los compuestos volátiles previamente seleccionados en el apartado 4.1.1. se estudió el proceso de optimización (parámetros de análisis) del método analítico. Los parámetros estudiados fueron: volumen de muestra, programa de temperatura del HS (tiempo de equilibrado del vial y temperatura del horno, del *loop* y de la línea de transferencia), flujo de venteo en el PTV (modo *solvent-vent*) y temperatura del PTV durante el venteo. A modo de ejemplo se muestran en la **Figura 3** los cromatogramas obtenidos para la optimización de los parámetros del PTV: flujo de venteo y temperatura del *liner* (trampa de Tenax) durante el venteo en el PTV. Para la elección de los parámetros se tuvo en cuenta el valor del Factor de Respuesta = Área compuesto/Área Patrón Interno. En las **Tablas 2a (HS)** y **2b (PTV)** se muestran los resultados de los experimentos realizados durante el proceso de selección de los parámetros de análisis. Se seleccionaron aquellos parámetros para los que se obtuvo un valor mayor para el Factor de Respuesta para un mayor número de compuestos en cada caso.

Tabla 2a. Resultados de los parámetros de análisis del *HS-dinámico* en el proceso de selección. (Factor de Respuesta = Área compuesto/Área Patrón Interno)

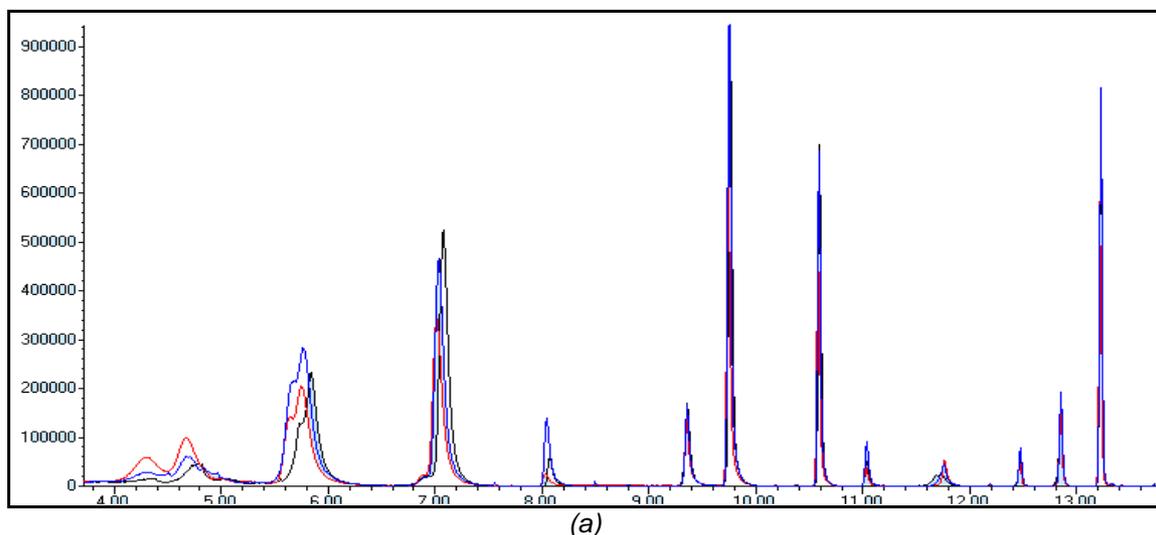
| Compuesto | Volumen de muestra | | | | Programa de Temperatura | | | |
|--------------------------|--------------------|-------|--------|-------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | 2,5 ml | 5 ml | 7,5 ml | 10 ml | T1 ^b 15 min | T1 ^b 30 min | T2 ^a 15 min | T2 ^a 30 min |
| 2-Metilpropanal | 0,409 | 0,232 | 0,454 | 0,391 | 0,409 | 0,273 | 0,127 | 0,086 |
| 2-MB + 3-MB ^a | 1,816 | 1,994 | 2,344 | 2,204 | 1,816 | 1,706 | 0,516 | 0,327 |
| DMDS | 2,220 | 1,927 | 2,332 | 2,372 | 2,220 | 1,891 | 3,767 | 3,799 |
| Hexanal | 0,172 | 0,300 | 0,111 | 0,078 | 0,172 | 0,269 | 0,027 | 0,042 |
| 2-Heptanona | 1,747 | 1,786 | 1,729 | 1,718 | 1,747 | 1,765 | 1,794 | 1,815 |
| Benzaldehído | 0,118 | 0,164 | 0,089 | 0,071 | 0,118 | 0,135 | 0,004 | 0,003 |
| Trimetilpirazina | 0,129 | 0,132 | 0,123 | 0,119 | 0,129 | 0,139 | 0,051 | 0,055 |
| Fenilacetaldehído | 0,089 | 0,109 | 0,073 | 0,064 | 0,089 | 0,080 | 0,002 | 0,006 |
| Acetofenona | 0,260 | 0,286 | 0,249 | 0,255 | 0,259 | 0,262 | 0,187 | 0,193 |
| 2-Nonanona | 0,897 | 0,982 | 0,855 | 0,857 | 0,897 | 0,892 | 0,652 | 0,648 |

^a 2MB + 3MB: Mezcla (1:1) de los compuestos 2-Metilbutanal y 3-Metilbutanal. ^b T1: Horno=90 °C, *loop*= 100 °C, Línea de transferencia= 125 °C. ^c T2: Horno=60 °C, *loop*= 80 °C, Línea de transferencia= 100 °C.

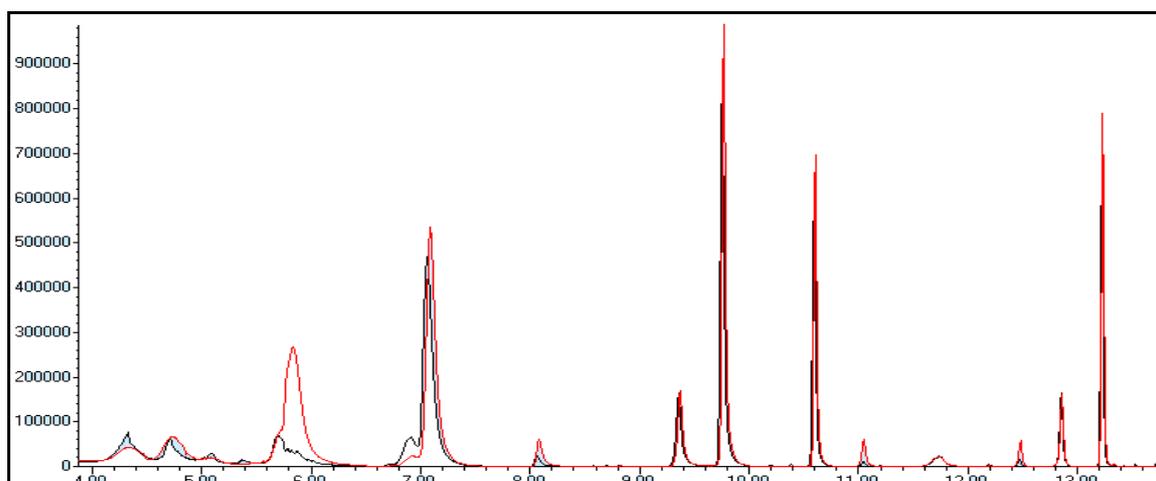
Tabla 2b. Resultados de los parámetros de análisis del PTV en el proceso de selección.
(Factor de Respuesta = Área compuesto/Área Patrón Interno)

| Compuesto | Temperatura del liner (trampa de Tenax) | | Flujo de venteo | | |
|--------------------------|--|-------|-----------------|-----------|-----------|
| | 10 °C | 20 °C | 30 ml/min | 50 ml/min | 80 ml/min |
| 2-Metilpropanal | 0,162 | 0,409 | 0,662 | 0,205 | 0,272 |
| 2-MB + 3-MB ^a | 0,212 | 1,816 | 2,409 | 2,628 | 1,595 |
| DMDS | 1,852 | 2,220 | 2,017 | 1,977 | 2,147 |
| Hexanal | 0,068 | 0,172 | 0,099 | 0,382 | 0,158 |
| 2-Heptanona | 1,741 | 1,747 | 1,537 | 1,751 | 1,762 |
| Benzaldehído | 0,020 | 0,118 | 0,087 | 0,156 | 0,097 |
| Trimetilpirazina | 0,124 | 0,129 | 0,162 | 0,146 | 0,129 |
| Fenilacetaldehído | 0,022 | 0,089 | 0,094 | 0,108 | 0,089 |
| Acetofenona | 0,265 | 0,259 | 0,297 | 0,278 | 0,268 |
| 2-Nonanona | 0,885 | 0,897 | 0,883 | 0,925 | 0,897 |

^a 2MB + 3MB: Mezcla (1:1) de los compuestos 2-Metilbutanal y 3-Metilbutanal.



(a)



(b)

Figura 3. Cromatogramas de optimización de los parámetros de análisis del PTV: (a) flujo de venteo (Rojo: 30 ml/min; Azul: 50 ml/min; Negro: 80 ml/min); (b) temperatura del liner durante el venteo (Negro: 10 °C; Rojo: 20 °C).

Un análisis crítico de los resultados demostró que las condiciones óptimas, y por tanto las fijadas para el método analítico, eran:

- Volumen de muestra: 5 ml.
- Programa de temperatura del *HS-dinámico*: horno= 90 °C, *loop* de 3ml= 100 °C, línea de transferencia= 125 °C.
- Tiempo de equilibrado del vial: 15 min.
- Flujo de venteo hacia el PTV en modo *solvent-vent*: 50 ml/min.
- Temperatura del *liner* (PTV) durante el venteo: 20 °C.

4.1.4. Curvas de calibrado

Para el cálculo de la concentración de cada analito presente en las muestras se usó la técnica de la adición de estándares. Se realizaron curvas de calibrado para los 10 compuestos volátiles seleccionados anteriormente (**Tabla 1**) y característicos del batido de chocolate Pascual. Los resultados de calibrado se muestran en la **Tabla 3** junto con su coeficiente de regresión lineal y el límite de cuantificación calculado como la concentración que para la que la relación señal-ruido tiene un valor de 10. La determinación se realizó por triplicado. Como patrón interno se usó en todos los casos 2-metil-3-heptanona.

Tabla 3. Calibrado para los compuestos volátiles característicos del batido de chocolate realizadas mediante la adición de estándares en leche semidesnatada de silo.

| Compuesto | Ecuación de regresión ^a | R ^b | Límite de cuantificación (µg/l=ppb) |
|------------------|------------------------------------|----------------|-------------------------------------|
| 2-Metilpropanal | y= 0,159x | 0,985 | 59,70 |
| DMDS | y= 1,125x | 0,999 | 4,34 |
| Hexanal | y= 0,808x | 0,997 | 1,37 |
| 2-Heptanona | y= 0,826x | 0,999 | 0,32 |
| Benzaldehído | y= 0,050x | 0,995 | 5,31 |
| Trimetilpirazina | y= 0,056x | 0,988 | 61,73 |
| Fenilacetaldéhid | y= 0,027x | 0,996 | 23,32 |
| Acetofenona | y= 0,144x | 0,997 | 6,00 |
| 2-Nonanona | y= 0,494x | 0,999 | 1,17 |

^ay: Área compuesto/Área patrón interno; x: Concentración compuesto/ Concentración patrón interno. ^bR: coeficiente de regresión lineal.

Fue imposible obtener curvas de calibrado independientes para los compuestos 2-Metilbutanal y 3-Metilbutanal debido a que no se consiguió la separación de ambos compuestos, bajo las condiciones experimentales descritas. Es fundamental seguir la evolución temporal de ambos compuestos debido a que son responsables directos del aroma a chocolate. Finalmente se decidió realizar un calibrado conjunto de estos compuestos volátiles. La curva de calibrado para las mezclas binarias (1:1) de 2-Metilbutanal y 3-Metilbutanal fue: $y = 0,488x$ ($y = \text{Área compuesto}/\text{Área patrón interno}$; $x = \text{Concentración compuesto}/\text{Concentración patrón interno}$), con un coeficiente de regresión lineal de 0.992.

4.2. CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN MUESTRAS DE BATIDO DE CHOCOLATE

El método HS-PTV-CG-EM previamente desarrollado permitió la cuantificación de los principales compuestos volátiles presentes en las muestras de batido de chocolate. En la **Figura 4** y en la **Tabla 4** se muestra el cromatograma típico del batido de chocolate Pascua y la relación de los compuestos volátiles estudiados. Estos compuestos volátiles (**Tabla 4**) se dividen en dos grupos diferenciados: los

responsables del aroma y flavor característico de cacao/chocolate y los volátiles responsables de *off-flavors* derivados del tratamiento térmico UHT. Los primeros constituyen el grupo de los volátiles “deseados”, lo que interesa es que su concentración no sufra variaciones a lo largo de la vida útil del batido de chocolate, para que el flavor característico del mismo no se altere. Una clasificación más detallada de estos indica que 2-metilpropanal, 2-metilbutanal, 3-metilbutanal y DMDS son compuestos odorantes clave del flavor a chocolate y acetofenona, benzaldehído, fenilacetaldehído, trimetilpirazina son a cacao [16, 19, 20]. Por otra parte, el segundo grupo lo constituirían los volátiles “indeseados” que deben mantenerse a niveles bajos para minimizar la aparición de *off-flavors* durante la vida útil del producto (sombreados en gris en la Tabla 4). DMDS, 2-heptanona, 2-nonanona y hexanal han sido extensamente reconocidos como los volátiles más importantes causantes de *off-flavors* en la leche UHT [12, 13, 14, 26].

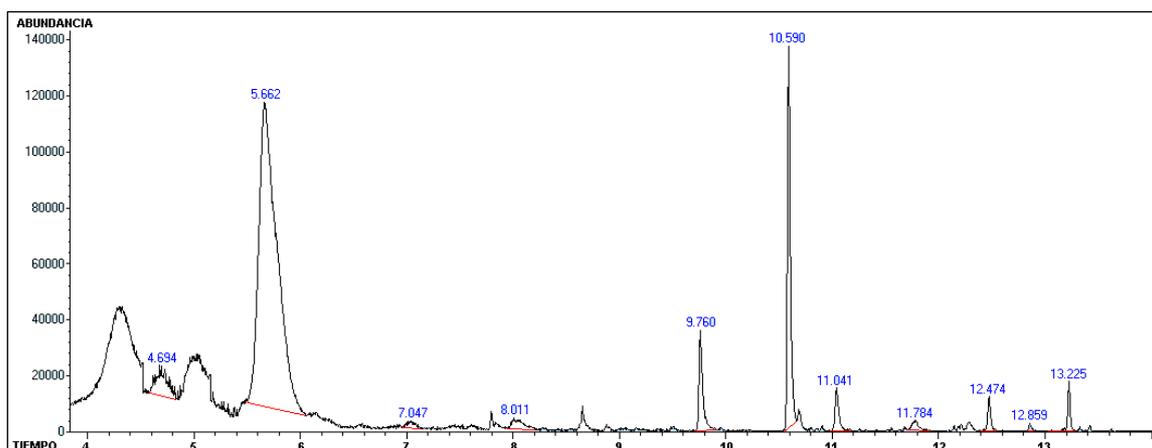


Figura 4. Cromatograma típico del batido de chocolate Pascual obtenido mediante el método HS-PTV-CG EM.

Tabla 4. Compuestos volátiles analizados en el batido de chocolate Pascual.

| Compuesto | Pe (°C) | Tr (min) | Match | Atributo sensorial (flavor) |
|---------------------|---------|----------|-------|-----------------------------|
| 2-Metilpropanal | 63 | 4.66 | 946 | Chocolate |
| 3-Metilbutanal | 91 | 5.77 | 955 | Chocolate |
| 2-Metilbutanal | 91 | 5.77 | 948 | Chocolate |
| DMDS | 110 | 7.04 | 970 | Sulfuroso |
| Hexanal | 130 | 8.04 | 930 | Hierba |
| 2-Heptanona | 151 | 9.75 | 943 | Jabonoso, afrutado, floral |
| 2-Metil-3-heptanona | | 10.59 | | Patrón interno |
| Benzaldehído | 179 | 11.03 | 978 | Almendra amarga |
| Trimetilpirazina | 171 | 11.76 | 945 | Cacao, avellana tostada |
| Fenilacetaldehído | 195 | 12.47 | 969 | Dulce, miel, avellana |
| Acetofenona | 202 | 12.85 | 965 | Floral, almendra, dulce |
| 2-Nonanona | 80 | 13.23 | 954 | Afrutado, dulce |

Pe: punto de ebullición; Tr: tiempo de retención; Match: según la base de datos NIST'05 (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, versión 2.0)

En la **Figura 5** se muestran los cromatogramas obtenidos en el análisis de batido de chocolate Pascual en el silo, recién producido y a los 6 meses. Los resultados experimentales de la evolución temporal (desde el silo hasta los 6 meses) del perfil de volátiles en el batido de chocolate se muestran en la **Tabla 5** (valores medios de concentración) y en la **Figura 6**.

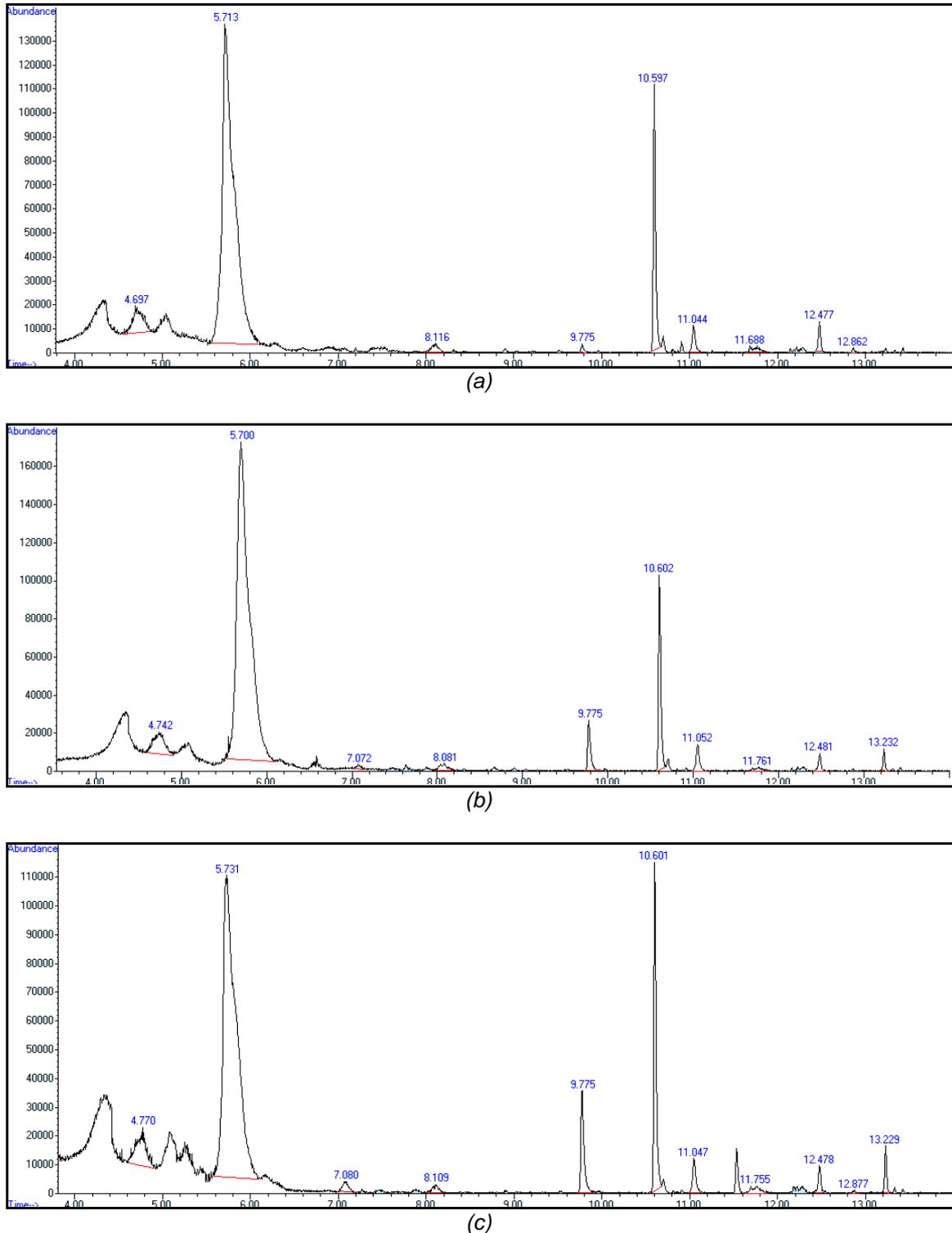


Figura 5. Cromatogramas del batido de chocolate Pascual para muestras de (a) silo; (b) batido recién producido ($t=0$); (c) batido al final de su vida comercial ($t=6$ meses)). Identificación de los picos según *Tabla 4*.

Tabla 5. Concentración ($\mu\text{g/l}=\text{ppb}$) de compuestos volátiles de interés en batido de chocolate Pascual a lo largo de su vida comercial.

| COMPUESTO | MUESTRA | | | | | |
|------------------------------|-------------------|-------------------|-----------|-----------|------------|------------|
| | Silo | t=0 ^b | t=1 mes | t=2 meses | t=3 meses | t=6 meses |
| 2-Metilpropanal | 283± 12 | 358 ± 36 | 296± 45 | 245± 24 | 219± 42 | 261± 19 |
| 2-MB+3-MB^a | 996 ± 96 | 1834± 34 | 1172± 75 | 854± 213 | 906± 146 | 1116 ± 123 |
| DMDS | < LC ^c | 4,2± 0,6 | 4,5± 0,9 | 4,8± 1,2 | 4,5± 0,3 | 7,9± 0,6 |
| Hexanal | 12,1± 0,7 | 14,1± 0,9 | 11± 1 | 9± 1 | 12,35± 0,3 | 8,2± 0,5 |
| 2-Heptanona | 4,1± 0,2 | 40,5± 0,3 | 34,1± 0,4 | 35,9± 0,6 | 39,5± 1,2 | 50,43± 0,3 |
| Benzaldehído | 282± 7 | 391± 14 | 307 ± 7 | 296± 16 | 281± 14 | 307± 12 |
| Trimetilpirazina | 197± 14 | 119± 16 | 95± 7 | 104± 17 | 114,± 7 | 135± 8 |
| Fenilacetaldehído | 463 ± 25 | 405± 9 | 289± 6 | 318± 25 | 319± 27 | 349± 12 |
| Acetofenona | 7 ± 3 | < LC ^c | 6,4± 0,7 | 6,3± 0,7 | 8± 4 | 7± 2 |
| 2-Nonanona | < LC ^c | 19,5± 0,2 | 16,6± 0,6 | 18 ± 1 | 20± 2 | 22,7± 0,3 |

^a 2MB + 3MB = Mezcla (1:1) de los compuestos 2-Metilbutanal y 3-Metilbutanal. ^b t=0: Valores de concentración para batido de chocolate el mismo día de su producción. ^c < LC: Por debajo de los límites de cuantificación del método.

Los resultados muestran que los aldehídos fueron los compuestos volátiles que presentaron concentraciones más elevadas en el batido de chocolate Pascual. Los aldehídos de Strecker (2-metilpropanal, 3-metilbutanal, 2-metilbutanal y fenilacetaldehído) presentes en este batido son compuestos odorantes clave en el flavor del chocolate [19]. Estos aldehídos de Strecker se forman por degradación de aminoácidos (valina, leucina, isoleucina y fenilalanina respectivamente) durante las reacciones de Maillard que se producen en el procesado del cacao [19, 27]. Por otra parte, fenilacetaldehído y benzaldehído se han determinado como dos de los componentes volátiles mayoritarios en el cacao en polvo [20], que es uno de los ingredientes principales de la leche con chocolate Pascual. Además, estos dos últimos aldehídos se han descrito como otorgantes de atributos de flavor como “almendra amarga”, “avellana” [16, 17], “dulce” o “miel” [19, 20] y su presencia en el batido de chocolate Pascual contribuye al flavor característico a cacao con avellanas/almendras de este producto. La acetofenona ha sido determinada como componente odorante clave en el cacao en polvo otorgando atributos como “floral”, “almendra” y “dulce” [20]. Este compuesto se encontró en bajas concentraciones en el batido de chocolate, aún así es importante su contribución al flavor del producto debido a su elevada actividad odorante. Este grupo de compuestos son parte de los responsables del sabor y aroma de este producto contribuyendo a su elevada calidad sensorial y a la elevada

aceptación de la que goza el batido de chocolate Pascual por parte de los consumidores.

La trimetilpirazina (compuesto heterocíclico nitrogenado) se ha descrito como uno de los compuestos volátiles con mayor actividad odorante en el cacao y otorga un flavor típico a cacao/praliné, más suave que el del chocolate negro [19, 20]. Este compuesto al igual que los aldehídos, se forma durante las reacciones de Maillard que ocurren en el procesado del cacao [27]. En el batido de chocolate Pascual, las notas de flavor cacao-praliné de la trimetilpirazina suavizan los atributos otorgados por los volátiles típicos del flavor a chocolate negro del grupo anteriormente descrito contribuyendo también a su calidad sensorial.

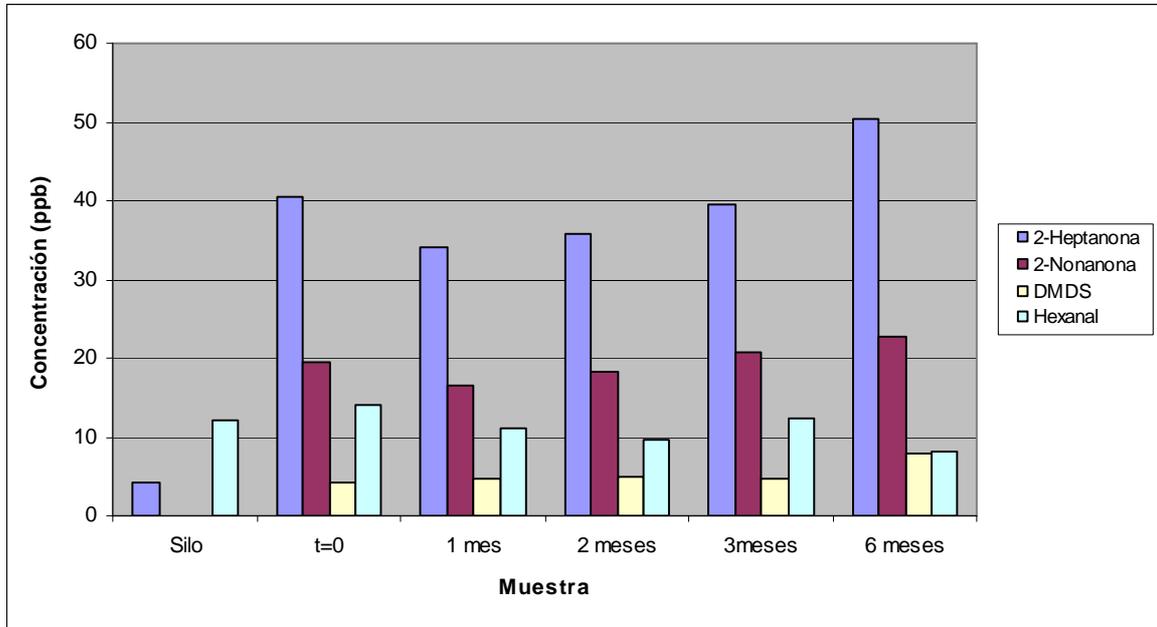
2-Heptanona y 2-nonanona (*off-flavors*) son responsables del flavor característico de la leche UHT. Se ha demostrado que el aumento en metil-cetonas producido por el tratamiento térmico es proporcional a la severidad del mismo [28]. Estos compuestos se forman por β -oxidación de ácidos grasos saturados seguida por una descarboxilación [26] o por descarboxilación de β -cetoácidos presentes naturalmente en la grasa de la leche [12]. En este estudio la 2-nonanona permaneció a concentraciones por debajo de los límites de cuantificación en el silo y la 2-heptanona se detectó en concentración muy baja, viéndose aumentada considerablemente la concentración de ambas cetonas tras el tratamiento UHT. Sus concentraciones en el batido de chocolate UHT son acordes con las descritas previamente en la bibliografía para leche UHT [12, 13]. Por otra parte, acetona y 2-butanona están presentes en la leche cruda y por tanto también en el batido de chocolate. Ambos compuestos fueron detectados en el cromatograma (**Figura 4**), con tiempos de retención de 4 y 5 minutos respectivamente. Ambos compuestos carecen de interés en este estudio y consecuentemente no fueron cuantificados.

Con respecto al DMDS, este compuesto no fue detectado en el silo, detectándose sólo tras el tratamiento térmico UHT. Los tratamientos térmicos fuertes, como el UHT producen la aparición de compuestos sulfurados que se han asociado a *off-flavors* descritos generalmente con el atributo sensorial “cooked” [14]. Estos compuestos sulfurados se producen por la liberación de los mismos a partir de los grupos sulfidrilo expuestos de las proteínas lácteas, principalmente la β -lactoglobulina [12, 26]. Sin embargo, el DMDS también ha sido descrito como uno más de los contribuyentes del flavor típico del chocolate y el cacao [19, 20]. Van Praag *et al.* [17] demostraron ya en 1968 que la combinación de 3-metilbutanal y DMDS, que habían sido extraídos de bayas de cacao, presentaba un olor típico a chocolate. Los valores de concentración obtenidos para el DMDS tras el proceso térmico son similares a los reportados en la bibliografía para leche UHT [13, 15]. Este resultado es justificable ya que existe en muy baja concentración en el cacao, ingrediente esencial del batido de chocolate. Parece ser que la contribución principal de la presencia de DMDS en el batido de chocolate se debe a su formación en el tratamiento UHT, ya que aunque existe DMDS en el silo su concentración está por debajo de los límites de cuantificación del método.

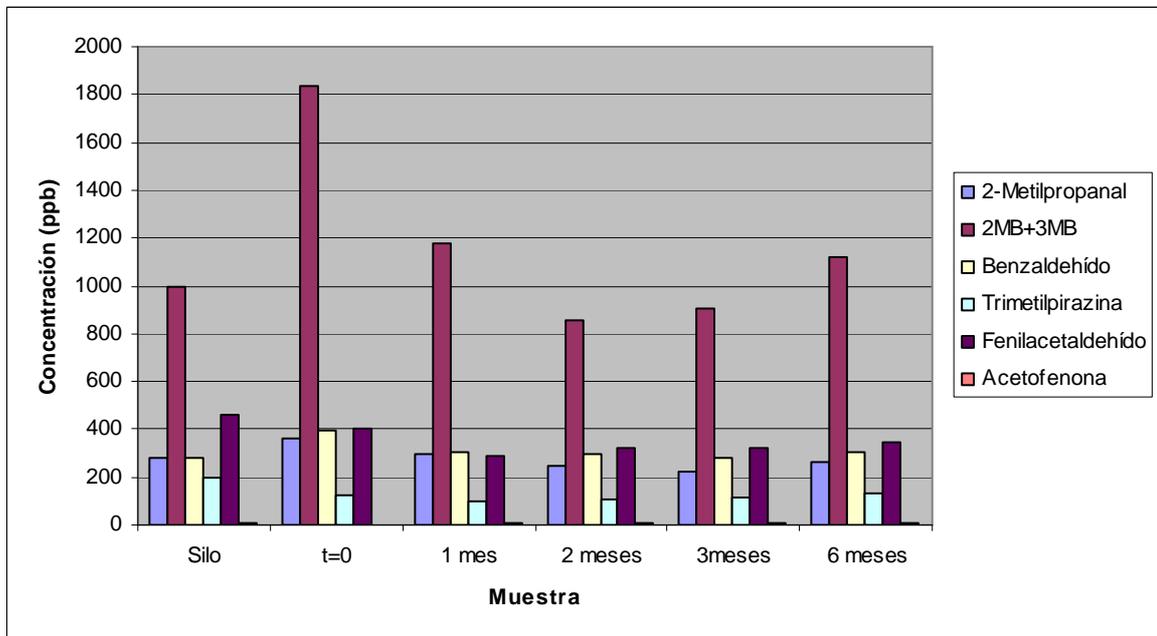
El hexanal es un aldehído presente típicamente en la leche cruda, que aumenta su concentración tras el tratamiento térmico causando *off-flavors*. Se forma debido a que el calor promueve las reacciones de autooxidación de los ácidos grasos insaturados [28]. La concentración en hexanal para el batido UHT coincide con los valores reportados por Vázquez-Landaverde *et al.* [12] para leche entera UHT.

En la **Figura 6 (a)** se representa la evolución temporal de los compuestos volátiles responsables de sabores indeseados. Estos resultados muestran que dichos compuestos se originan o aumentan considerablemente su concentración con el tratamiento térmico, permaneciendo su concentración media prácticamente constante hasta los tres meses de almacenamiento. Se observó un aumento considerable de estos compuestos a los 6 meses, efecto indeseable desde el punto de vista sensorial, pero que coincide con el final de la vida comercial del producto. Los compuestos volátiles que causan sabores deseados en el batido de chocolate también experimentan

un aumento en su concentración tras el tratamiento térmico, excepto trimetilpirazina, acetofenona y fenilacetaldehído, como se observa en la **Figura 6 (b)**. Es importante destacar, desde el punto de vista de la calidad sensorial, que sus concentraciones permanecen prácticamente constantes hasta el final de la vida comercial del producto.



(a)



(b)

Figura 6. Evolución de la concentración de los compuestos volátiles del batido de chocolate Pascual durante su vida comercial. (a) Compuestos volátiles causantes de off-flavors; (b) Compuestos volátiles causantes de sabores deseados.

4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE RESULTADOS

Es necesario un análisis estadístico ANOVA que complemente el estudio de los resultados experimentales, mostrados en el apartado 4.2 (valores medios y desviaciones estándar), y que proporcione la información necesaria para la interpretación de los mismos.

La estimación de las posibles analogías o diferencias significativas en la concentración para cada compuesto volátil a lo largo del tiempo se realizó aplicando un análisis estadístico de la varianza ANOVA con el programa estadístico *STATGRAPHICS Plus 4.0*. Se aplicó ANOVA de una vía en la que la variable dependiente fue la concentración y el factor el tiempo. El intervalo de confianza utilizado en el análisis fue del 95%. Los resultados obtenidos se presentan en las **Tablas 6 y 7**.

Tabla 6. Resultados del análisis estadístico de la varianza ANOVA para la evolución de la concentración de los compuestos responsables de sabores deseados en el batido de chocolate. DS: Diferencias significativas encontradas con respecto al tiempo anterior.

| Compuesto | Silo | t0 ^a | t1 (1mes) | t2 (2 meses) | t3 (3 meses) | t6 (6 meses) |
|------------------------|------|------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|
| 2-Metilpropanal | | DS: aumenta | DS: disminuye | DS: disminuye | t3=t2 | t6=t3=t2 |
| 2-MB+3-MB ^b | | DS: aumenta | DS: disminuye | DS: disminuye | t3=t2 | DS: aumenta |
| Benzaldehído | | DS: aumenta | DS: disminuye | t2=t1 | t3=t2=t1 | DS: aumenta |
| Trimetilpirazina | | t0=t1 | DS: disminuye | t2=t1 | t3=t2=t1 | t6=t3=t2=t1 |
| Fenilacetaldehído | | DS: disminuye | DS: disminuye | t2=t1 | t3=t2=t1 | t6=t3=t2=t1 |
| Acetofenona | | DS: disminuye | DS: aumenta | t2=t1 | t3=t2=t1 | t6=t3=t2=t1 |

^a t0: Batido recién producido. ^b 2MB + 3MB: Mezcla (1:1) de los compuestos 2-Metilbutanal y 3-Metilbutanal.

Tabla 7. Resultados del análisis estadístico de la varianza ANOVA para la evolución de la concentración de los compuestos responsables de *off-flavors* en el batido de chocolate. DS: Diferencias significativas encontradas con respecto al tiempo anterior.

| Compuesto | Silo | t0 ^a | t1 (1mes) | t2 (2 meses) | t3 (3 meses) | t6 (6 meses) |
|-------------|------|-----------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|
| DMDS | | DS: aumenta | t1=t0 | t2=t1=t0 | t3=t2=t1=t0 | DS: aumenta |
| Hexanal | | DS: aumenta | DS: disminuye | DS: disminuye | DS: aumenta | DS: disminuye |
| 2-Heptanona | | DS: aumenta | DS: disminuye | t2=t1 | DS: aumenta | DS: aumenta |
| 2-Nonanona | | DS: aumenta | DS: disminuye | t2=t1 | DS: aumenta | DS: aumenta |

^a t0: Batido recién producido.

El análisis estadístico reveló que existía una tendencia general según la cual se produce una disminución significativa de la concentración de todos los compuestos volátiles analizados en este batido de chocolate (a excepción del DMDS) entre su producción (t=0) y el primer mes de almacenamiento. Esta pérdida general de volátiles del batido se debe a la estabilización del producto.

Respecto a la evolución temporal de los volátiles causantes de *off-flavors*, se observó en primer lugar, que estos compuestos aumentaban significativamente su concentración con el tratamiento térmico UHT. Los tratamientos térmicos fuertes, como el UHT, promueven la formación de *off-flavors* como metil-cetonas, aldehídos y compuestos sulfurados [26], que contribuyen al flavor característico del batido de

chocolate UHT Pascual. Sin embargo, los atributos típicos de la leche UHT causados en por estos compuestos (“cooked”, “sulfurous”) son, en este caso, enmascarados por los compuestos que otorgan los sabores deseados a chocolate, cacao o almendras/avellanas. Además, tras la disminución significativa que se da en el primer mes (estabilización del producto), la concentración de estos compuestos permanece, en general, sin variaciones significativas hasta los tres meses de almacenamiento, tiempo a partir del cual aumentan significativamente su concentración hasta alcanzar valores máximos al final de la vida comercial (t= 6 meses) del producto. El incremento en metilcetonas durante el almacenamiento ha sido descrito en la leche UHT. Valero *et al.* [15] observaron también un aumento significativo de estos compuestos a partir del tercer mes, con valores similares para la 2-heptanona a los obtenidos en este estudio. Contarini *et al.* [28] monitorizaron los cambios en la concentración de compuestos responsables de *off-flavors* en leche UHT a los 90 días de almacenamiento a temperatura ambiente comprobando, al igual que en este estudio, que 2-heptanona y hexanal son dos de los compuestos que experimentan aumentos significativos.

Con respecto al off-flavor DMDS su concentración fue significativamente mayor en el batido UHT que en el silo. El UHT produce la aparición de compuestos sulfurados por liberación de los mismos a partir de los grupos sulfidrilo expuestos de las proteínas lácteas, principalmente la β -lactoglobulina [12, 26] o debido a la oxidación del metanotiol [14]. Sin embargo, durante el almacenamiento del producto, el DMDS no aumentó significativamente su concentración hasta el final de la vida comercial. Este resultado es acorde con estudios previos sobre el almacenamiento de leche UHT en los que no se encontraron variaciones significativas en la concentración de este compuesto durante los tres primeros meses [28], observándose un aumento en el sexto mes [15].

En cuanto al hexanal, detectado en el batido de silo, es un compuesto típico de la leche cruda [28]. Su concentración aumentó significativamente tras el UHT, debido a que el calor promueve su formación por autooxidación de ácidos grasos insaturados [12]. El almacenamiento provoca cambios significativos en la concentración de este compuesto, aumentando y disminuyendo sin un patrón fijo. Un comportamiento similar para el hexanal en leche UHT fue reportado por Jeon *et al.* [29] que mostraron que la concentración de hexanal aumentaba hacia la semana ocho de almacenamiento para después disminuir hasta niveles de trazas. En cualquier caso, la concentración de hexanal a lo largo de la vida útil del producto no es suficiente como para afectar a la calidad sensorial del batido, ya que su actividad odorante es menor a la del resto de los sabores indeseados de este producto.

El análisis de los resultados obtenidos en la evolución temporal de la concentración de los compuestos responsables de sabores deseados en el batido de chocolate Pascual muestra que estos no siguen un patrón común, al contrario de lo que ocurre con los responsables de *off-flavors*. En concreto los aldehídos, a excepción del fenilacetaldéhid, experimentaron un aumento significativo en su concentración tras el UHT. Este resultado está justificado ya que el tratamiento térmico promueve reacciones de Strecker en las que los aminoácidos (isoleucina, leucina, fenilalanina y valina) dan lugar a estos aldehídos de Strecker [30]. Por tanto, el tratamiento UHT contribuye a la formación del flavor característico del batido de chocolate Pascual, aumentando la concentración de los compuestos de flavor “deseados”. La disminución significativa que experimenta el fenilacetaldéhid parece un resultado inesperado ya que el UHT debería promover la formación del mismo a partir del aminoácido fenilalanina. Granvogl *et al.* [30] obtuvieron resultados similares al estudiar estas reacciones en el cacao observando que tras el tratamiento térmico el fenilacetaldéhid era el único aldehído de Strecker que no aumentaba su concentración. Como tendencia general, este grupo de volátiles se mantienen constantes durante el almacenamiento del producto.

No se observaron cambios significativos durante el almacenamiento para los volátiles trimetilpirazina y acetofenona por tanto los matices suaves de flavor que otorgan al batido se mantienen constantes.

De forma general, se puede concluir que la evolución temporal de la concentración de los compuestos volátiles que otorgan sabores deseados al producto se mantienen constantes durante el almacenamiento, lo que contribuye a mantener constante la calidad sensorial del batido de chocolate Pascual durante su vida comercial. Además, los sabores indeseados ocasionados por el proceso UHT no aumentan hasta niveles que comprometen la calidad sensorial del batido hasta los 6 meses, tiempo establecido como final de la vida comercial del producto.

5. CONCLUSIONES

A continuación se relacionan las conclusiones más relevantes obtenidas en este trabajo de investigación:

- Los compuestos volátiles seleccionados como responsables del sabor característico y por tanto de la calidad sensorial del batido de chocolate Pascual son: 2-metilpropanal, 2-metilbutanal, 3-metilbutanal, fenilacetaldehído, acetofenona, benzaldehído, trimetilpirazina, DMDS, 2-heptanona, hexanal y 2-nonanona.
- En la identificación y cuantificación de compuestos volátiles representativos del sabor en batidos de chocolate se ha puesto a punto un método de análisis de cromatografía de gases asociado a espectrometría de masas y acoplado a un extractor de muestra de espacio de cabeza (*HS*) y con un inyector PTV que contiene en su configuración una trampa rellena de Tenax.
- El método de análisis diseñado es un método rápido y automatizado lo que le hace de fácil aplicación a nivel industrial para el seguimiento temporal y control de la calidad sensorial de los batidos de chocolate.
- El tratamiento térmico UHT es un factor clave en la formación de sabor característico del batido ya que por una parte promueve el desarrollo de compuestos volátiles responsables de sabores indeseados y, a su vez, provoca un aumento en la concentración de los compuestos volátiles que producen los sabores deseados y característicos del batido de chocolate.
- La calidad sensorial del batido de chocolate Pascual durante su vida comercial no se ve alterada significativamente debido a que la evolución temporal de la concentración de los compuestos volátiles que otorgan sabores deseados al producto se mantienen constantes durante el almacenamiento, mientras que los sabores indeseados ocasionados por el proceso UHT no aumentan sus niveles de concentración como para comprometer la calidad sensorial del batido hasta el final de la vida útil del producto.

6. AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la empresa Grupo Leche Pascual la oportunidad que me ha brindado de integrarme en su departamento de Innovación donde he podido desarrollar el trabajo asociado a esta Tesis de Master. Quiero agradecer especialmente a mis directoras Susana Herrera Silla en la empresa y María Olga Ruiz Pérez en la Universidad de Burgos, así como al resto del equipo del departamento de Innovación del Grupo Leche Pascual, por su atención y gran ayuda durante el desarrollo de mi Tesis de Máster.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. **Vallejo-Cordoba B. 1992.** Shelf-life prediction and flavour quality assessment of pasteurized milk by multivariate analysis of dynamic headspace gas chromatographic data. Tesis doctoral, The University of British Columbia.
2. **Herraiz M, Reglero G y Herraiz T. 1989.** Evaluation of a PTV injector for quantitative analysis of volatile compounds at low concentrations. *J High Resol Chromatogr* 12: 442-446.
3. **Marsilli R T. 1999.** SPME-MS-MVA as an electronic nose for the study of off-flavors in milk. *J Agric Food Chem* 47: 648-654.
4. **Zhou M, Robards K, Glennie-Holmes M y Helliwell S. 1999.** Analysis of volatile compounds and their contribution to flavor in cereals. *J Agric Food Chem* 47: 3941-3953.
5. **Wilkes J G, Conte E D, Kim Y, Holcomb M, Sutherland J B y Miller D W. 2000.** Sample preparation for the analysis of flavors and off-flavors in foods. *J Chromatogr A* 880: 3-33.
6. **Karatapanis A E, Badeka A V, Riganakos K A, Savvaidis I N y Kontominas M G. 2006.** Changes in flavour volatiles of whole pasteurized milk as affected by packaging material and storage time. *Int Dairy J* 16: 750-761.
7. **Ibáñez E, Tabera J, Ramos E, López-Sebastián S y Reglero G. 1999.** Analysis of volatile components of fruits by HS-PTV-GC. *J Sci Food Agric* 79: 1275-1279.
8. **Povolo M y Contarini G. 2003.** Comparison of solid-phase microextraction and purge-and-trap methods for the analysis of the volatile fraction of butter. *J Chromatogr A* 985: 117-125.
9. **Wylie P L. 1997.** Trace level pesticide analysis by GC/MS using large-volume injection. *Gas chromatography. Agilent Technologies*. September: 1-4.
10. **Pérez Pavón J L, Herrero Martín S, García Pinto C y Moreno Cordero B. 2008.** Headspace – programmed temperature vaporizer – fast gas chromatography – mass spectrometry coupling for the determination of trihalomethanes in water. *J Chromatogr A* 1194: 103-110.
11. **Pérez Pavón J L, del Nogal Sánchez M, Fernández Laespada M E y Moreno Cordero B. 2009.** Determination of filbertone in spiked olive oil samples using headspace-programmed temperature vaporization-gas chromatography–mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 394: 1463-1470.
12. **Vazquez-Landaverde P A, Velazquez G, Torres J A y Qian M C. 2005.** Quantitative determination of thermally derived off-flavor compounds in milk using solid-phase microextraction and gas chromatography. *J Dairy Sci* 88: 3764-3772.

13. **Naudé Y, van Aardt M y Rohwer E R. 2009.** Multi-channel open tubular traps for headspace sampling, gas chromatographic fraction collection and olfactory assesment of milk volatiles. *J Chromatogr* 1216: 2798-2804
14. **Al-Attabi Z, D'Arcy B R y Deeth H C. 2009.** Volatile Sulphur Compounds in UHT milk. *Crit Rev Food Sci Nutr* 49: 28-47.
15. **Valero E, Villamiel M, Miralles B, Sanz J y Martínez-Castro I. 2001.** Changes in flavour and volatile components during storage of whole and skimmed UHT milk. *Food Chem* 72:51-58.
16. **Schenermann P y Schieberle P. 1997.** Evaluation of key odorants in milk chocolate and cocoa mass by aroma extract dilution analyses. *J Agric Food Chem* 45: 867-872.
17. **van Praag M, Stein H S y Tibetts M S. 1968.** Steam volatile aroma constituents of roasted cocoa beans. *J Agric Food Chem* 16: 1005-1008.
18. **Counet C, Callemien D, Ouwerx C y Collin S. 2002.** Use of gas chromatography-olfactometry to identify key odorant compounds in dark chocolate. Comparison of samples before and after conching. *J Agric Food Chem* 50: 2385-2391.
19. **Serra-Bonvehí J. 2005.** Investigation of aromatic compounds in roasted cocoa powder. *Eur Food Res Technol* 221: 19-29.
20. **Ziegleder G y Stojacic E. 1988.** Changes in the flavour of milk chocolate during storage. *Z Lebensm Unters Forsch* 186:134-138.
21. **Ducki S, Miralles-García J, Zumbé A, Tornero A y Storey D M. 2008.** Evaluation of solid-phase micro-extraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry fro the headspace analysis of volatile compounds in cocoa products. *Talanta* 74: 1166-1174.
22. **Pérez Pavón J L, del Nogal Sánchez M, Fernández Laespada M E, García Pinto C, Moreno Cordero B. 2007a.** Analysis of class 1 residual solvents in pharmaceuticals using headspace-programmed temperature vaporization-fast gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1141: 123-130.
23. **Pérez Pavón J L, del Nogal Sánchez M, Fernández Laespada M E, Moreno Cordero B. 2007b.** Simultaneous determination of gasoline oxygenates and benzene, toluene, ethylbenzene and xylene in water samples using headspace-programmed temperature vaporization-fast gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1175: 106-111.
24. **Kolahgar B y Pfannkoch E. 2001.** Benefits of using programmed temperature vaporizers (PTVs) instead of hot split/splitless inlets for measurements of volatiles by liquid, headspace, and solid phase microextraction (SPME) techniques. Technical Note 36, Gerstel, Mülheim/Ruhr.
25. **Lozano P R, Drake M, Benítez D y Cadwallader K R. 2007.** Instrumental and sensory characterization of heated-induced odorants in aseptically packaged soy milk. *J Agric Food Chem* 55: 3018-3026.

26. **Pereda J, Jaramillo D P, Quevedo J M, Ferragut V, Guamis B y Trujillo A J. 2008.** Characterization of volatile compounds in ultra-high pressure homogenized milk. *Int Dairy J* 18: 826-834.
27. **Muresan S, Eillebrecht M A J L, de Rijk T C, de Jonge H G, Leguijt T y Nijhuis H H. 2000.** Aroma profile development of intermediate chocolate products I. Volatile constituents of block milk. *Food Chem* 68: 167-174.
28. **Contarini G, Povolò M, Leardi R y Toppino P M. 1997.** Influence of heat treatment on the volatile compounds of milk. *J Agric Food Chem* 45: 3171-3177.
29. **Jeon I J, Thomas E L y Reineccius G A. 1978.** Production of volatile flavor compounds in ultra-high-temperature processed milk during aseptic storage. *J Agric Food Chem* 26: 1183-1188.
30. **Granvogl M, Bugan S y Schieberle P. 2006.** Formation of amines and aldehydes from parent amino acids during thermal processing of cocoa and model systems: New insights into pathways of the Strecker reaction. *J Agric Food Chem* 54: 1730-1739.