

**Universidad Pública de Navarra**

*Nafarroako Unibertsitate Publikoa*

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR  
DE INGENIEROS AGRÓNOMOS**

*NEKAZARITZAKO INGENIARIEN  
GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKOA*

**EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE POLIOLES Y AROMA PARA EL  
AUMENTO DE LA PERCEPCIÓN DEL DULZOR EN BEBIDAS REFRESCANTES**

**presentado por:**

**Cristina Marín Espadero**

**Junio 2019**

**GRADO EN INGENIERÍA AGROALIMENTARIA Y DEL MEDIO RURAL EN LA  
MENCION EN INDUSTRIAS AGROALIMENTARIAS**



**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR  
DE INGENIEROS AGRÓNOMOS**

**NEKAZARITZAKO INGENIERARIEN  
GOI MAILAKO ESCOLA TEKNIKOA**

UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS

TRABAJO FIN DE GRADO DEL GRADO UNIVERSITARIO EN INGENIERÍA  
AGROALIMENTARIA Y DEL MEDIO RURAL EN LA MENCIÓN INDUSTRIAS  
AGROALIMENTARIAS

**EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE POLIOLES Y AROMA PARA  
EL AUMENTO DE LA PERCEPCIÓN DEL DULZOR EN BEBIDAS  
REFRESCANTES**

Trabajo Fin de Grado presentado por **Cristina Marín Espadero** con el objetivo de optar al título de Graduada Univeritaria en Tecnología y Calidad en Ingeniería Agroalimentaria y del Medio Rural, siendo sus directores la Dra. Carmen Barba González-Albo y el Dr. Juan Ignacio Maté Caballero del Departamento de Agronomía, Biotecnología y Alimentación de la Universidad Pública de Navarra.

La directora del Trabajo

El director del Trabajo

La alumna



Dra. Carmen Barba González-Albo Dr. Juan Ignacio Maté Caballero Cristina Marín Espadero

Pamplona, Mayo de 2019



## RESUMEN

Los refrescos son bebidas preparadas con acidulantes, edulcorantes, colorantes, estabilizantes y aromas disueltos en agua, algunos contienen CO<sub>2</sub>. La concentración de sacarosa habitual es del 10-15 % (w/w), por tanto, son consideradas de alto contenido calórico. Como posibilidades de reducción del nivel de sacarosa encontramos el uso de los nuevos edulcorantes, reformulación o reforzamiento del sabor a través del aroma.

El objetivo principal del trabajo es evaluar el efecto de la presencia de polioles (eritritol, manitol y maltitol) en la concentración de 2-feniletanol en el espacio de cabeza, que permitirá una estimación de la tendencia a la percepción orthonasal o retronsal del aroma durante su ingesta. Además, se realizará un análisis sensorial para evaluar el impacto del 2-feniletanol y otros aromas comerciales en la percepción del dulzor.

Se determina que los polioles ejercen un efecto de "salting out" sobre el 2-feniletanol, siendo mayor y más rápido, a mayor peso molecular del polioliol. Con ello se puede estimar una tendencia a la percepción orthonasal. Únicamente los aromas comerciales de fresa, melocotón y mango, aumentaron la percepción del dulzor en las muestras ensayadas.

**Palabras clave:** bebidas refrescantes, 2-feniletanol, HS-SPME, espacio de cabeza, polioles, dulzor

## ABSTRACT

Soft beverages contain sugar and substances with acidulent, colouring and stabilising properties. Those soft drinks have high caloric value. There are many ways to reduce sugar level like using new sweeteners, reformulation or aromas.

The main objective, is evaluate the effect of polyols (erythritol, mannitol and maltitol) in a 2-phenylethanol concentration on the head-space. It allows the estimation of the tendency to orthonasal or retronsal perception of the aroma. In addition, it will be done a sensory analysis with 2-phenylethanol and other comercial aromas.

The polyols make *salting out* effect on 2-phenylethanol. *Salting out* effect is faster and effective when the polyol has a bigger molecular weight than the others. The strawberry, peach and mango aroma, increase the sweetener perception of the samples.

**Keywords:** Soft beverages, 2-phenylethanol, HS-SPME, head-space, polyols, sweetness.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer la colaboración por parte de las empresas Flavorix y aromas y sabores, por su ayuda y selección de los aromas más oportunos para poder desarrollar este TFG.

En segundo lugar, quisiera agradecer a la Universidad Pública de Navarra, por su confianza en el trabajo y la ayuda económica, gracias a la beca de colaboración otorgada.

También quisiera hacer mención a mis tutores Carmen Barba González Albo y Juan Ignacio Maté Caballero, en especial a Carmen, por su implicación con el TFG y su apoyo incondicional durante todo el proceso.

Por último, agradecer a los compañeros, amigos y familiares, que han confiado y me han acompañado, lo largo de estos 4 años de grado.

Cristina Marín Espadero

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Cristina', with a stylized flourish extending to the right.

## ÍNDICE GENERAL

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	11
1.1 Bebidas refrescantes .....	11
1.1.1. Proceso de elaboración .....	12
1.1.2. Composición de las bebidas refrescantes .....	13
1.2. Endulzantes .....	15
1.2.1. Monosacáridos: D-glucosa, fructosa y galactosa .....	15
1.2.2. Disacáridos: lactosa, maltosa y sacarosa .....	16
1.2.3. Edulcorantes de alta intensidad .....	16
1.2.3.1. Artificiales: Acesulfamo k, aspartamo, neotamo, ciclamato, sacarina y sucralosa	16
1.2.3.2. Naturales: thaumatin, steviol, monogrosido, brazzein y monatin.....	17
1.2.4. Poliols .....	18
1.2.4.1. Eritritol	19
1.2.4.2. Manitol	20
1.2.4.3. Maltitol	20
1.3.            Compuestos volátiles.....	21
1.3.1. Propiedades físicoquímicas de los compuestos volátiles .....	21
1.3.2. Análisis del espacio de cabeza.....	22
1.3.3. 2-feniletanol.....	24
1.4. Microextracción en fase sólida (SPME). .....	25
1.5. Cromatografía de gases.....	26
1.6. Percepción.....	27
1.6.1. Percepción del olor .....	28
1.6.2. Percepción del sabor.....	29
1.6.3. Interacciones olor y sabor.....	30
<b>2. CONTEXTO</b> .....	31
<b>3. OBJETIVO Y PLAN EXPERIMENTAL</b> .....	32
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	35
4.1. Análisis mediante cromatografía .....	35
4.1.1. Muestras .....	35
4.1.2. Preparación de muestras .....	35
4.1.3. Condiciones HS-SPME-CG .....	35
4.2. Análisis sensorial, método 2-AFC .....	36
4.2.1. Materiales .....	37
4.2.2. Procedimiento.....	37
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	39
5.1 Determinación de las condiciones para el análisis mediante HS-SPME.....	39

5.2. Determinación de las cinéticas de adsorción/absorción del 2-feniletanol. ....	40
5.3. Determinación del tiempo mínimo para establecer el equilibrio .....	43
5.4. Determinación de la concentración de 2-feniletanol en el espacio de cabeza ....	43
5.5. Efecto del poliol en la liberación/difusión relativa comparada con agua .....	45
5.6. Efecto de la adición de aroma en la percepción del dulzor en muestras con eritritol .....	46
5.6.1. Pretest .....	46
5.6.2. Análisis sensorial .....	47
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>50</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>51</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Diagrama básico de elaboración de bebidas refrescantes. ....	13
<b>FIGURA 2.</b> Estructura de: a) D-glucosa; b) fructosa; y c) galactosa. ....	16
<b>FIGURA 3.</b> Estructura de: a) lactosa; b) maltosa; y c) sacarosa .....	16
<b>FIGURA 4.</b> Poder endulzante relativo de distintos polioles, en comparación con la sacarosa y la fructosa (solución acuosa al 10%, w/w).....	19
<b>FIGURA 5.</b> Molécula de eritritol.....	19
<b>FIGURA 6.</b> Molécula de manitol .....	20
<b>FIGURA 7.</b> Molécula de maltitol .....	20
<b>FIGURA 8.</b> Vial en el que se representa la fase gaseosa, fase sólida o líquida y el espacio de cabeza .....	23
<b>FIGURA 9.</b> Molécula de 2-feniletanol. ....	25
<b>FIGURA 10.</b> Partes del holder de SPME. Ampliación de detalle. ....	25
<b>FIGURA 11.</b> Esquema general del cromatógrafo de gases. ....	27
<b>FIGURA 12.</b> Sistema olfativo. ....	28
<b>FIGURA 13.</b> Cromatógrafo de gases empleado. ....	36
<b>FIGURA 14.</b> Aromas comerciales empleados: melocotón, mango, fresa, violeta, ajo y 2-feniletanol. ....	37
<b>FIGURA 15.</b> Tarrinas utilizadas en el análisis sensorial, 2-AFC .....	38
<b>FIGURA 16.</b> Dispositivo generado para análisis HS-SPME.....	39
<b>FIGURA 17.</b> Comparación de la respuesta del FID de ambas fibras. ....	40
<b>FIGURA 18.</b> Cinética de adsorción/absorción de 2-feniletanol en agua.....	40
<b>FIGURA 19.</b> Cinética de adsorción/absorción de 2-feniletanol en eritritol/agua .....	41
<b>FIGURA 20.</b> Cinética de adsorción/absorción de 2-feniletanol en manitol/agua .....	41
<b>FIGURA 21.</b> Cinética de adsorción/absorción de 2-feniletanol en maltitol/agua .....	42
<b>FIGURA 22.</b> Calibración GC-FID. ....	44
<b>FIGURA 23.</b> Efecto relativo de los distintos polioles en la fuerza de liberación/difusión del 2-feniletanol. Una vez alcanzado el equilibrio. ....	46
<b>FIGURA 24.</b> Sesión pretest. Aromas testados.....	47



**FIGURA 25.** Resultados del análisis 2-AFC- En línea discontinua el número de respuestas dadas al azar (13) y en línea continua el número mínimo de respuestas necesarias para considerar significativo el aumento de la percepción del dulzor (18) (\*,  $p < 0,05$ )..... 48

## **ÍNDICE DE TABLAS**

<b>TABLA 1.</b> Tipos de bebidas refrescantes. ....	11
<b>TABLA 2.</b> Ingredientes de las bebidas refrescantes .....	14
<b>TABLA 3.</b> Composición nutricional por cada 100 ml de refresco de Coca-Cola original y Coca-Cola zero .....	15
<b>TABLA 4.</b> Resumen de las propiedades del eritritol, maltitol, manitol y 2-feniletanol.	21
<b>TABLA 5.</b> Resumen de las propiedades del 2-feniletanol.....	24
<b>TABLA 6.</b> Condiciones de trabajo con la fibra de SPME. ....	36
<b>TABLA 7.</b> Concentraciones utilizadas para cada muestra de cada aroma.....	37
<b>TABLA 8.</b> Ecuación, ajuste y pendiente de las gráficas de cinética de adsorción/absorción. Peso molecular de cada poliol. ....	43
<b>TABLA 9.</b> Ecuación logarítmica y ajuste, de las gráficas de cinética de adsorción/absorción .....	43
<b>TABLA 10.</b> Concentración del 2-feniletanol en el espacio de cabeza medido a los distintos tiempos, dependiendo de la muestra .....	45

## **Terminología**

En este trabajo el término “**olor**” se refiere a la sensación debida a la percepción de sustancias volátiles por medio de la nariz, vía ortonasal. El término “**aroma**” se refiere a la sensación debida a la percepción de sustancias volátiles a través de la mucosa del paladar una vez que el alimento se ha introducido en la boca, vía retronasal. El término “**sabor**” se refiere al resultado de la combinación de la percepción del aroma, el gusto y otras sensaciones producidas en boca, como serían de frío o calor, sensaciones táctiles y de dolor (sensaciones trigeminales). El término “**gusto**” es el resultado de la percepción de ciertos compuestos químicos a través de las papilas gustativas de la lengua (**Fisher & R. Scott, 1997**).

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Bebidas refrescantes

Los **refrescos** son bebidas que contienen acidulantes, edulcorantes, colorantes, estabilizantes y aromas disueltos en agua. Algunos contienen dióxido de carbono. Tienen una concentración en sacarosa entre el 10-15% (w/w), por lo que son consideradas como de alto contenido calórico.

Según el **Real Decreto 650/2011**, de 9 de mayo, por el que se aprueba la última reglamentación técnico-sanitaria en materia de bebidas refrescantes, existen diversos tipos de bebidas refrescantes resumidos en la Tabla 1.

**TABLA 1.** Tipos de bebidas refrescantes.

Tipo	Características
Agua carbonatada	Formada por agua y dióxido de carbono, es transparente e incolora. Dentro de esta clasificación existen de tipo <i>seltz</i> que sería la carbonatada más básica y el agua de soda, que incluye una dosis de bicarbonato sódico.
Agua aromatizada	Formada por agua, con o sin dióxido de carbono, que contiene aromas.
Gaseosa	Bebida incolora preparada con agua, dióxido de carbono, aromas, azúcares y/o edulcorantes y aditivos autorizados.
Bebidas refrescantes de zumos de frutas	Se caracterizan por contener zumos, purés, disgregados de frutas o sus mezclas.
Bebidas refrescantes de extractos	Se caracterizan por contener extractos de frutas, de otros vegetales o de ambos
Bebidas refrescantes mixtas	Que están constituidas por bebidas refrescantes y otros alimentos, como zumos de frutas o leche.
Bebidas refrescantes para diluir	Formada por los productos sólidos para la preparación de bebidas refrescantes, que una vez reconstituidas cumplan lo establecido en la disposición
Bebidas refrescantes aromatizadas	Pueden contener o no dióxido de carbono, azúcares y/o edulcorantes artificiales, aromas y otros aditivos autorizados, además de contener otros ingredientes alimenticios.

## 1.1.1. Proceso de elaboración

En general, la elaboración de las bebidas refrescantes sigue el siguiente proceso (ANFABRA, 2006; *The Coca-Cola Company*, 2011):

- **Suministro y tratamiento del agua potable.** El agua que se utiliza proviene de la red de abastecimiento público, es decir es potable, aunque en algunos casos se utiliza agua mineral natural o de manantial. Las industrias analizan el agua de entrada a la planta y, frecuentemente, se trata con el fin de adecuar sus características a la fabricación de bebidas. Los principales tratamientos que experimenta el agua al llegar a la fábrica son la filtración (filtros de arena, filtros de carbón y filtros pulidores) y la desaireación. Esta última permite que la posterior carbonatación sea efectiva y evita que el aire ocluido en el agua deteriore la calidad sensorial de los productos por su oxidación. Otros tratamientos que suelen llevarse a cabo son la reducción de alcalinidad y la desinfección.
- **Preparación del jarabe simple con endulzantes.** Este preparado es el responsable del sabor del refresco. En esta etapa el agua previamente tratada se debe mezclar con el azúcar o endulzante, para obtener el jarabe. En caso de que fuese necesario se pasteuriza y filtra, para eliminar cualquier impureza, o incluso se decolora, para cumplir los estándares de elaboración. La disolución del endulzante puede realizarse por lotes o de forma continua, ya sea en caliente como en frío, siendo un proceso automático. La clarificación del jarabe puede ser por carbón activo, siendo el sistema tradicional, el cual consta por un tanque de retención, sistema de dosificación de tierra de diatomeas y carbón. Por otro lado, la clarificación puede ser por intercambio iónico a través del uso de resinas.
- **Elaboración del jarabe terminado.** En esta fase se mezclan los diversos ingredientes que puede contener el refresco tales como zumos de frutas, cafeína, extractos vegetales, vitaminas, etc. Una vez preparado el jarabe su almacenamiento no debe superar las 24 horas, para evitar la proliferación de microorganismos en el medio.
- **Preparación de la bebida terminada.** Para su elaboración es necesario un mezclador, este combina en las proporciones adecuadas el jarabe terminado con el agua tratada, e incluye o no dióxido de carbono. En el caso de las bebidas carbonatadas, el dióxido de carbono es almacenado en tanques en forma líquida, y previamente a su uso se filtra. En algunos casos el agua tratada se carbonata antes de mezclarse con el jarabe terminado. En el caso de las bebidas sin gas estas son sometidas a pasteurización previa a su envasado o posteriormente en túneles de pasteurización.

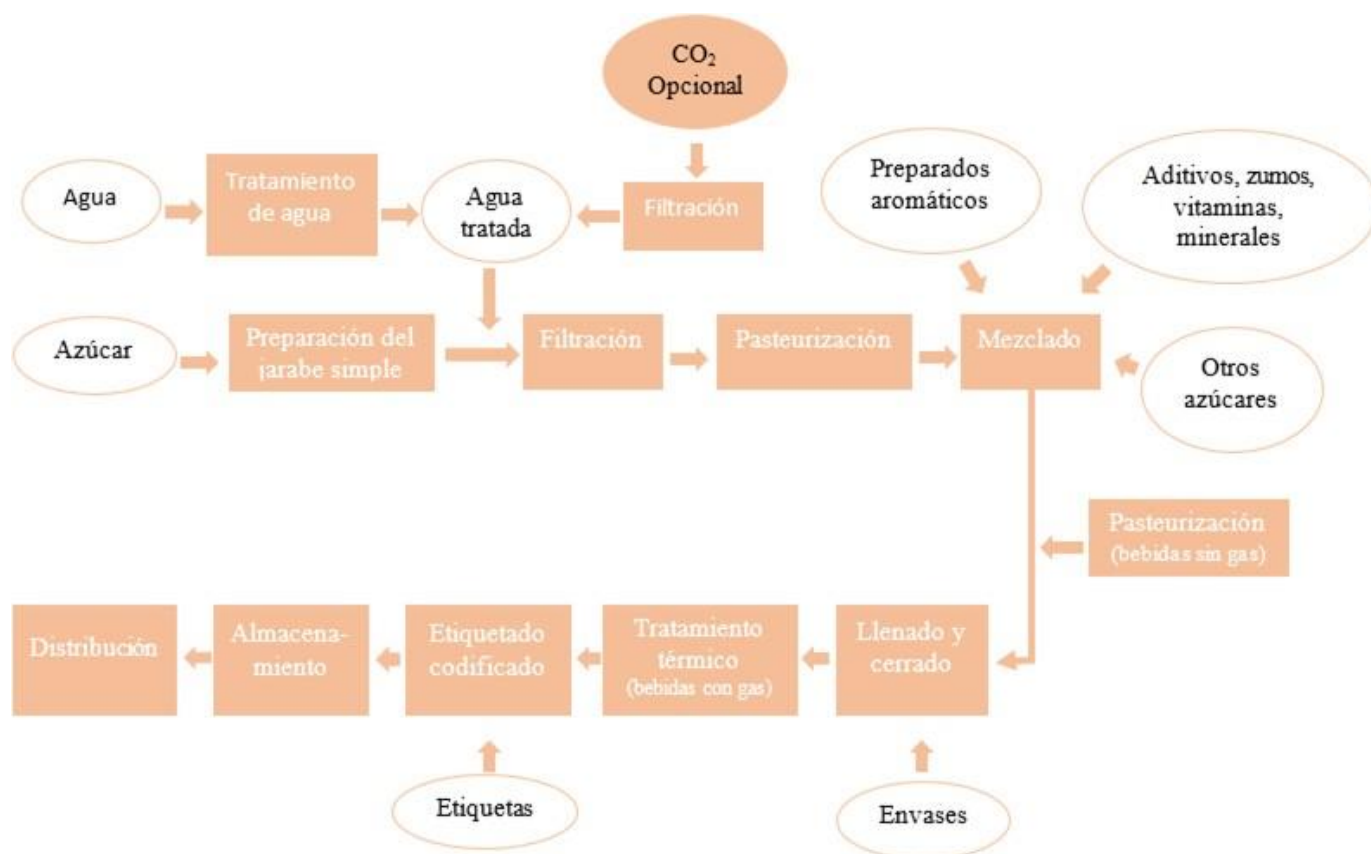


FIGURA 1. Diagrama básico de elaboración de bebidas refrescantes.

En la Figura 1 se muestra el diagrama de flujo de un proceso genérico de elaboración de bebida refrescante.

Tras estas etapas de elaboración, debe ser realizada en la planta de fabricación, la recepción y preparación del envase, codificación, etiquetado y empaquetado de los envases, y por último el almacenamiento, transporte y distribución.

### 1.1.2. Composición de las bebidas refrescantes

Las bebidas refrescantes pueden contener los siguientes ingredientes (**Real Decreto 650/2011**, de 9 de mayo, por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria en materia de bebidas refrescantes):

**TABLA 2.** Ingredientes de las bebidas refrescantes.

<b>Ingrediente</b>	<b>Requerimiento</b>
Agua	Agua potable, agua preparada, agua mineral natural o de manantial. Cumpliendo las reglamentaciones pertinentes que serían: RD 140/2003, RD 1798/2010 y RD 1799/2010. Además debe saberse que esta agua podrá ser sometida a tratamientos autorizados, para adecuarla a las características necesarias para la elaboración de bebidas refrescantes
Dióxido de carbono	Debiendo cumplir las normas de identidad y pureza de los aditivos alimentarios
Azúcares	Azúcares destinados a alimentación humana y aquellos obtenidos de la fruta
Zumos, purés, disgregados de frutas o vegetales o mezclas	No especificado
Jarabes	Compuestos o preparados básicos
Extractos de frutas y/o vegetales	No especificado
Cafeína y quitina	No especificado
Aditivos y aromas autorizados	De conformidad con las normas siguientes: Reglamento (CE) N° 1333/2008, Reglamento (CE) n.º 1334/2008, Real Decreto 2001/1995, Real Decreto 2002/1995, Real Decreto 142/2002, Real Decreto 299/2009 y Real Decreto 299/2009
Vitaminas y minerales	No especificado
Otros ingredientes	Utilizados en alimentación humana o autorizados de conformidad con el Reglamento (CE) n.º 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de enero de 1997, sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios
Coadyuvantes tecnológicos	Numerados en la reglamentación citada, así como los autorizados en otros Estados miembros de la Unión Europea

A modo de ejemplo, se muestra a continuación en la Tabla 3, la composición nutricional de dos refrescos de *Coca-Cola*.

**TABLA 3.** Composición nutricional por cada 100 ml de refresco de Coca-Cola original y Coca-Cola Zero.

Coca-Cola sabor original		Coca-Cola zero azúcar	
Valor energético	42 kcal/180 kJ	Valor energético	0,2 kcal/0,9 kJ
Grasas	0 g	Grasas	0 g
De las cuales saturadas	0 g	De las cuales saturadas	0 g
Hidratos de carbono	10,6 g	Hidratos de carbono	0 g
De los cuales azúcares	10,6 g	De los cuales azúcares	0 g
Proteínas	0 g	Proteínas	0 g
		Sal	0,02 g

## 1.2. Endulzantes

El dulzor es habitualmente asociado a la sacarosa, y éste es el endulzante más consumido en el mundo aunque ha sido criticado durante muchos años por su contribución a la obesidad, la diabetes, las caries y otras enfermedades. En la industria, en ocasiones, se emplean jarabes de glucosa y fructosa para reemplazar la sacarosa, pero esto es en gran medida un ejercicio costoso y no soluciona muchos de los problemas asociados a la sacarosa (**O'Donnell and Kearsley, 2012**).

El término “azúcar” se emplea, de manera general, para describir a aquellos compuestos que aportan dulzor, dentro de ellos los más comunes son: glucosa, fructosa, galactosa, sacarosa, lactosa y maltosa. Estos compuestos se encuentran de forma natural en productos lácteos, frutas y cereales (**Biblioteca nacional de medicina de los EE.UU, 2019**).

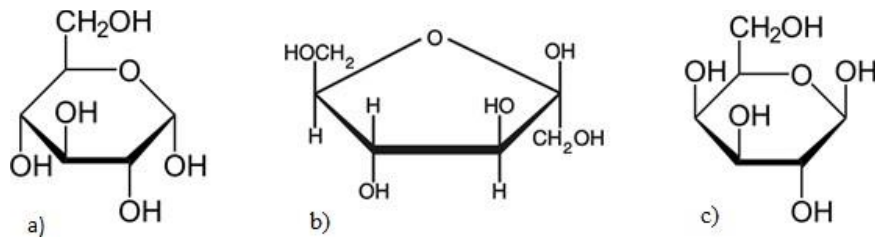
A continuación, se hará una revisión de los endulzantes más comunes empleados en la industria alimentaria (**Plaza-Díaz, Agustín, & Hernández, 2013**).

### 1.2.1. Monosacáridos: D-glucosa, fructosa y galactosa

La **D-glucosa** está presente en la mayoría de las frutas y en muchos vegetales. Es abundante como polímero de reserva en los animales (glucógeno) y en las plantas (almidón). La mayor parte de la glucosa está presente como polímero no digestible (celulosa).

La **fructosa** es el azúcar con mayor poder edulcorante, por encima de la sacarosa. Se absorbe de forma pasiva más lentamente que la D-glucosa. Es abundante en frutas.

La **galactosa** forma parte de los glucolípidos y las glucoproteínas de las membranas de las células, sobre todo en las neuronas. La mayor parte de la galactosa de la dieta proviene de la ingesta de lactosa de la leche. Su poder endulzante es bastante inferior a los anteriores.



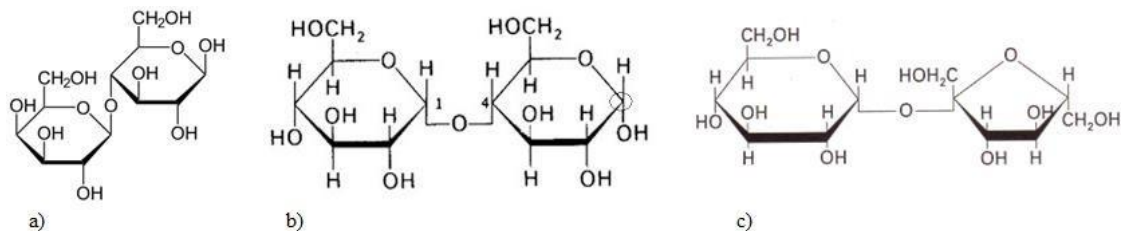
**FIGURA 2.** Estructura de: a) D-glucosa; b) fructosa; y c) galactosa.

### 1.2.2. Disacáridos: lactosa, maltosa y sacarosa

La **lactosa** es el azúcar de la leche y está formado por la unión de dos moléculas de galactosa y glucosa unidas por un enlace glucosídico. Es hidrolizada por la enzima lactasa, cuya actividad desciende a partir de los tres años de edad en humanos, por esta razón, en ocasiones, conduce a intolerancias.

La **maltosa** está constituida por dos moléculas de glucosa unidas por un enlace glucosídico. Es la mitad de dulce que la sacarosa. La maltosa forma parte de las maltodextrinas y de jarabes de glucosa, siendo utilizada como ingrediente en numerosos alimentos como fuente de energía.

La **sacarosa** es el principal endulzante de los alimentos. Está constituido por dos moléculas, una de fructosa y otra de glucosa, unidas por un enlace glucosídico. Es un azúcar reductor, muy soluble en agua y cristaliza fácilmente. Este es el azúcar de referencia, duplicando el poder endulzante de la maltosa, y cuatriplicando el de la lactosa.



**FIGURA 3.** Estructura de: a) lactosa; b) maltosa; y c) sacarosa.

### 1.2.3. Edulcorantes de alta intensidad

Los **edulcorantes de alta intensidad** se clasifican como artificiales si provienen de una ruta sintética o naturales si provienen de una fuente natural o una reacción bioenzimática.

#### 1.2.3.1. Artificiales: Acesulfamo k, aspartamo, neotamo, ciclamato, sacarina y sucralosa

Estos edulcorantes artificiales proporcionan un dulzor entre 30 y 13.000 veces más que la sacarosa. No son metabolizados por las bacterias de la boca, por tanto, no interfieren en la salud dental, ni tienen un efecto en el índice glucémico. Existe una fuerte controversia sobre su seguridad. Estos tienen establecida una ingesta diaria admisible (IDA), que da a pensar sobre ello, aunque por el momento no hay estudios suficientes que demuestren el riesgo para la salud (**Grembecka, 2015; O'Donnell y W. Kearsley, 2012**).



El **acesulfamo K** es una sal potásica del acesulfamo, se caracteriza por un intenso sabor dulce, 200 veces más intenso que la sacarosa. Su sabor dulce se percibe rápidamente, no persiste a lo largo tiempo y no tiene un regusto desagradable. Su intensidad no se ve tan influenciada por la temperatura como en el caso de otros edulcorantes de alta intensidad. Se utiliza en mezclas con aspartamo, ciclamato sódico y sucralosa, para aprovechar su sinergia.

El **aspartamo** se obtiene por la unión de dos aminoácidos, L-fenilalanina (aminoácido esencial) y L-aspartico, por un enlace metiléster. Es 180-200 veces más dulce que la sacarosa. Su intensidad de dulzor es lo suficientemente alta como para ser utilizado solo. Es interesante conocer las sinergias del aspartamo. Por ejemplo, en su combinación con sucralosa no ejercen un efecto sinérgico del dulzor. En combinaciones con sacarosa a pH neutro ejerce una supresión del dulzor, pero al disminuir el pH se transforma en un aumento del dulzor.

El **neotamo** es un derivado del aspartamo. Es 8000 veces más dulce que la sacarosa. Conforme aumenta su concentración adopta un sabor a regaliz, pero en combinación con otros edulcorantes se va perdiendo. Este es capaz de enmascarar sabores desagradables, como aquellos obtenidos en la fortificación de soja, vitaminas y minerales.

La **sacarina** junto con el **ciclamato** dado sus sabores en ciertos casos metálicos, refrescantes, similares al regaliz, se suelen utilizar en mezclas con aspartamo y acesulfamo K.

La **sucralosa** es aproximadamente 750 veces más dulce que la sacarosa en una concentración equivalente a una solución del 2% de sacarosa, pero si se aumenta el porcentaje a un 9%, su dulzor disminuye hasta 500 veces más dulce que la sacarosa. Su sabor dulce depende de la concentración, pH, temperatura o la presencia de otros ingredientes. Su sabor es dulce y persiste más, que el de la sacarosa.

### 1.2.3.2. Naturales: thaumatin, steviol, monogrosido, brazzein y monatin

La **thaumatin**, proviene de proteínas extraídas de una baya de una planta africana conocida como Katemfe. Mayoritariamente son proteínas de taumatina I y II, las cuales son muy similares. Estas proteínas se estabilizan por puentes disulfuro, los cuales le aportan una conformación espacial que es la responsable del dulzor. Si se rompe un enlace la molécula pierde dulzura. Su poder endulzante es 2000 veces superior a la sacarosa.

Los **glucósidos de esteviol**, son los compuestos de naturaleza bioquímica y de sabor dulce, que se extraen de las hojas de la *Stevia rebaudiana bertonii*. Estos glucósidos son de naturaleza diterpénica (terpenos de 20 carbonos, derivados de hidrocarburos), y el mayoritario que se encuentra es el esteviósido, seguido del rebaudiósido A, y otros glucósidos de esteviol. Estos compuestos, comparten una molécula aglicona (no glucídica) conocida como esteviol. Sus propiedades sensoriales se diferencian por el número de hidratos de carbono que contienen y los enlaces de los mismos.

Los **monogósidos IV y V** (el más abundante), son glucósidos triterpénicos (terpenos de 30 carbonos), extraídos de la planta china, *Siraitia grosvenorii*. Es 150 veces más dulce que la sacarosa.

La **brazzein** es una proteína de carácter dulce obtenida de la fruta de una planta del oeste africano, conocida como *Pentadiplandra brazzeana*. Como la thaumatin se estabiliza por los enlaces disulfuro. No hay mucha bibliografía en la que se describa detalladamente sus propiedades sensoriales. Su sabor es dulce, limpio y con un buen retrogusto, similar al de la sacarosa.

El **monatin** es un derivado del indol que se encuentra en la corteza de la raíz de un arbusto originario de Sudáfrica conocido como *Schlerochiton ilicifolius*. De los cuatro isómeros que posee el *R, R*-isómero es el más dulce, siendo 2000 veces más dulce que la sacarosa. De media es aproximadamente 800 veces más dulce que la sacarosa. No hay estudios que detallen sus propiedades sensoriales más allá de su sabor dulce.

#### 1.2.4. Polioles

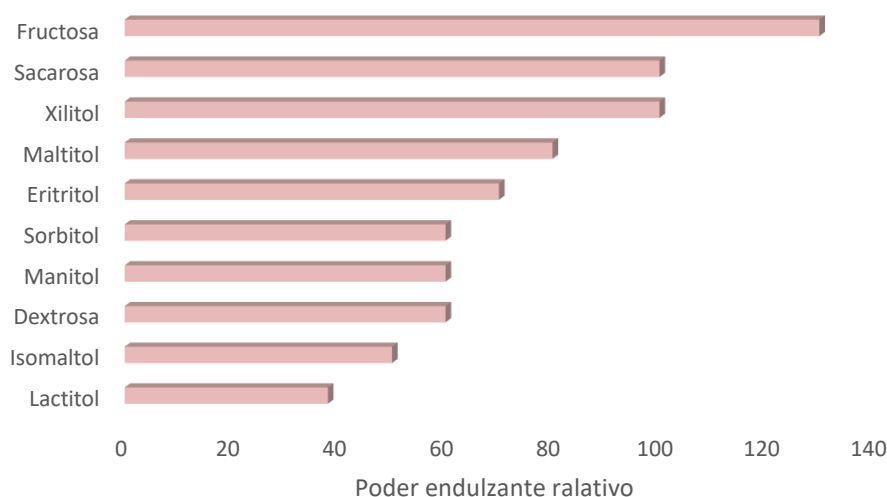
Los **polioles** también son conocidos como alcoholes del azúcar o alcoholes polihidroxilados, son carbohidratos de muy baja digestibilidad. Se obtienen por la sustitución de un grupo aldehído por un hidroxilo (hidrogenación). La mayoría se producen por hidrogenación de sus azúcares aldosas. Están presentes en pequeñas cantidades en las frutas, vegetales y hongos. En general, son reconocidos como aditivos alimentarios seguros, aunque en los últimos años es frecuente la actualización de sus concentraciones y usos en la industria alimentaria. Estos se identifican con un N° E, y se deben indicar en la lista de ingredientes. Estos compuestos no tienen establecida un IDA, lo que los hace seguros. Según el apartado C, grupo 4, del **Reglamento (UE) N° 1129/2011** de la comisión, hay siete polialcoholes aceptados para uso alimentario: sorbitol, manitol, isomaltol, maltitol, lactitol, xilitol y eritritol.

Estos compuestos tienen un **índice glucémico (IG)** bajo (menor a 55), estableciendo como referencia la glucosa con un IG de 100. Estos compuestos no están relacionados con problemas de diabetes, porque no inducen o lo hacen en muy poca medida el aumento de glucosa en sangre y la secreción de insulina. Poseen un bajo valor nutricional debido a la baja e incompleta absorción en el intestino, que resulta un metabolismo indirecto a través de la degradación fermentativa de la flora intestinal. Es por ello que se recomiendan dosis en concentraciones menores al 10%. Su valor calórico con respecto a los azúcares comunes que poseen 4 kcal/g, es muy bajo: el eritritol tiene 0,2 kcal/g, el manitol 1,6 kcal/g y el maltitol 2,1 kcal/g (**O'Donnell y W. Kearsley, 2012**).

Estos compuestos no solo tienen poder edulcorante, sino que también se describen en la bibliografía otras propiedades como: efecto prebiótico (normalizan la función intestinal), propiedades antiaglomerantes, estabilizantes, espesantes, texturizantes y conservantes. Además, ayudan a los alimentos a mantener la humedad, evitando al calentarse las reacciones de Maillard que no se producen al no tener un grupo final reductor y son muy poco higroscópicos. Por otro lado, los polioles no generan caries, ya que no se fermentan o lo hacen muy poco por las bacterias que encontramos en la boca (**Grembecka, 2015**).

Los polioles se utilizan en: chicles, chocolates, helados, galletas, caramelos, productos para diabéticos, refrescos (el eritritol en combinación de otros edulcorantes más intensos), pastelería, palitos de cangrejo (manitol), yogures, productos bajos en grasa.

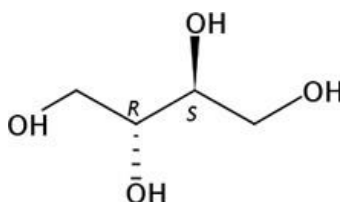
En este trabajo se emplearán tres polioles: eritritol, manitol y maltitol que se describen en los siguientes apartados.



**FIGURA 4.** Poder endulzante relativo de distintos polioles, en comparación con la sacarosa y la fructosa (solución acuosa al 10%, w/w). (O'Donnell and Kearsley, 2012).

#### 1.2.4.1. Eritritol

El **eritritol** también es conocido como: 1,2,3,4-butanotetrol, mesoeritritol y tetrahidroxibutano.



**FIGURA 5.** Molécula de eritritol.

Se conoce que el 90% del eritritol se absorbe por el intestino delgado, y no se metaboliza en el cuerpo. Por esta razón, es un poliol de elevada tolerancia en humanos. Además, presenta propiedades antioxidantes que puede ejercerlas mientras circula por el torrente sanguíneo antes de secretarlo por la orina.

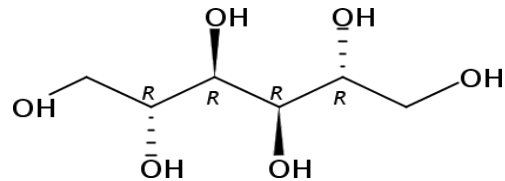
Se obtiene a través de la fermentación de soluciones ricas en dextrosa o sacarosa mediante bacterias como la *Moniliella pollins*. Las impurezas obtenidas se eliminan por filtración. Otro método de obtención es la extracción química, pero es más costoso y complejo. Es un elemento muy estable incluso por encima de 180°C, y no se descompone ni en medios ácidos ni alcalinos. Es muy estable microbiológicamente, y solo podría verse alterado si asciende su actividad de agua. Su viscosidad es muy baja dado a su pequeño tamaño. Su

solubilidad expresada en g/100g de disolución a 25°C es de 37. Su punto de fusión es a 121°C.

En combinación con otros edulcorantes más intensos, cómo sería la sucralosa, se utiliza en bebidas con bajo contenido calórico. Para chicles se utiliza y aporta un efecto refrescante y mentolado. También se utiliza en chocolates, helados, galletas, caramelos, productos para diabéticos.

#### 1.2.4.2. Manitol

El **manitol** también se denomina D-manitol, azúcar de maná o extracto de savia de maná.



**FIGURA 6.** Molécula de manitol.

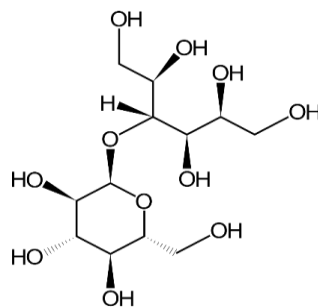
La forma tradicional de su obtención es química, a través de la hidrogenación de la fructosa, obteniendo sorbitol y manitol a partes iguales. Se sabe que, modificando el pH a ligeramente alcalino, es posible obtener mayor cantidad de manitol. En China se extrae de algas marinas, y parece ser económicamente rentable frente a la forma tradicional.

Es un producto no reactivo, y por ello no afecta a colores, enzimas, sabores, etc. Posee una baja viscosidad y su solubilidad expresada en g/100g de disolución a 25°C es de 18.

Se utiliza en chicles, refrescos, bebidas, panadería, pastelería, palitos de cangrejo (surimi), productos para diabéticos y medicamentos.

#### 1.2.4.3. Maltitol

El **maltitol** también es conocido como: D-maltitol, jarabe de maltitol secado, maltosa hidrogenada, jarabe de almidón en polvo o glucopiranosil glucitol.



**FIGURA 7.** Molécula de maltitol.

Se obtiene mediante la hidrogenación catalítica de maltosa o más habitualmente, sirope de maltosa, en el que los grupos aldehídos reductores libres en la maltosa se hacen reaccionar con hidrógeno para dar grupos de alcohol estables. Se necesita alta temperatura, presión y un catalizador.

Es relativamente estable a las altas temperaturas. La hidrogenación bloquea la reactividad con otras enzimas, colores, sabores y vitaminas, alargándole la vida útil. Posee una viscosidad media y su solubilidad expresada en g/100 g de solución es de 64.

Se utiliza tanto en la fabricación de chocolates sin azúcares añadidos, para la elaboración de chicles e incluso caramelos, en combinación de maltitol en sirope. Se utiliza además en helados, en yogures batidos, repostería y productos bajos en grasa (**O'Donnell y W. Kearsley, 2012**).

A continuación, se indican la fórmula química, el peso molecular, el número CAS y número E de los compuestos anteriormente descritos (Tabla 4).

**TABLA 4.** Resumen de las propiedades del eritritol, maltitol, manitol y 2-feniletanol.

Nombre del compuesto	Fórmula química	Peso molecular	Nº CAS	Nº E
Eritritol	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	122,12	149-32-6	E968
Manitol	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	182,17	69-65-8	E421
Maltitol	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>11</sub>	344,31	585-88-6	E965

### 1.3. Compuestos volátiles

El **aroma** de un alimento lo forman compuestos volátiles que tiene un olor. En general, son **compuestos volátiles** de bajo peso molecular (<300 Da) y con frecuencia hidrofóbicos. No tienen cualidades nutricionales, pero desempeñan un papel importante en la aceptabilidad de los productos por parte de los consumidores porque el olor y el sabor son esenciales en la percepción global de un alimento.

Todos estos compuestos no desempeñan el mismo papel a nivel sensorial, algunos son más esenciales que otros para la caracterización aromática del producto. A esto se les denomina compuestos volátiles activos. Dependiendo del caso, el olor típico puede ser dado por un solo compuesto o una mezcla de varios compuestos.

Los aromas están presentes en los alimentos en concentraciones muy pequeñas, pero aparecen en multitud, con diferente composición química: **esteres, alcoholes, ácidos, aldehídos, cetonas**, etc. (**Buettner (Ed.), 2017**).

#### 1.3.1. Propiedades físicoquímicas de los compuestos volátiles

La **volatilidad** de un aroma, es un factor termodinámico y expresa la resistencia de una masa en transferir el compuesto volátil al aire (factor cinético). Está relacionada con su presión de vapor de saturación, es decir, la presión a la que el compuesto de fase gaseosa está en equilibrio con la fase condensada. La volatilidad también depende de la naturaleza del disolvente o matriz en que se disuelve el compuesto (**Buettner (Ed.), 2017**).

El **coeficiente de repartición** ( $K_i$ ) permite describir la distribución de compuestos volátiles entre un producto ( $C_i^S$ ) y la fase gaseosa ( $C_i^G$ ). Se define por la fórmula:

$$K_i = C_i^G / C_i^S \quad (\text{Ec. 1})$$

Siendo la concentración del compuesto volátil en la fase gaseosa sobre el producto y la concentración del compuesto volátil en la matriz alimenticia. Este coeficiente depende de los diferentes constituyentes del alimento, es decir, las interacciones del compuesto con los macro-constituyentes (agua, proteína, grasa).

Los aromas a menudo son **hidrófobos**, esta característica refleja la afinidad de una molécula por un medio acuoso. El  $\log P$  permite conocer el carácter hidrófilo de una molécula, es el log del coeficiente de partición de la molécula entre el octanol y el agua. Cuanto mayor sea el valor  $\log P$ , más hidrófoba será la molécula.

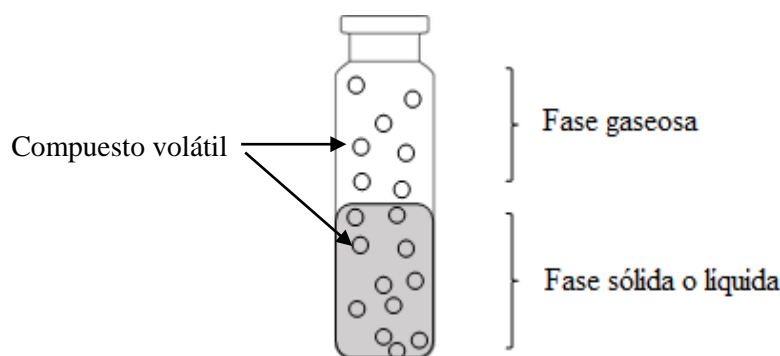
$$\log P = \log \frac{C_{\text{oct}}}{C_{\text{agua}}} \quad (\text{Ec.2})$$

Donde  $C_{\text{oct}}$  es la concentración de la molécula en octanol y  $C_{\text{agua}}$  la concentración en agua.

Otro criterio importante a tener en cuenta es la **polaridad** de la molécula, ya que tiene una influencia durante el análisis físico-químico por cromatografía. La polaridad describe la distribución de cargas dentro de la molécula. Es una función de la electronegatividad de los átomos que forman la molécula. Una molécula se llama polar cuando la distribución de carga no es homogénea debido a la polarización de estos enlaces. Cuando hay una diferencia en la electronegatividad entre dos átomos, la nube de electrones se desplaza a la que es la más electronegativa. Se dice que el enlace está polarizado y se caracteriza por su momento dipolar, vector que representa la dirección de la polarización. La polaridad de la molécula se calcula por la suma de los momentos dipolares (**Buettner (Ed.), 2017**).

### 1.3.2. Análisis del espacio de cabeza

El espacio de cabeza es la distancia vertical entre el nivel de muestra (en estado líquido o sólido) y la superficie interior en un recipiente rígido vertical (ver figura 8). Tradicionalmente, se ha estudiado los compuestos volátiles presentes en el espacio de cabeza para determinar, por ejemplo, la composición o concentración en una muestra de interés. Además, el estudio de la concentración de aroma en el espacio de cabeza permite una estimación de la tendencia a la **percepción ortonasal o retronasal** durante el consumo de una matriz alimentaria (**Guyot et al., 1996; Leksrisonpong et al., 2010; Miettinen et al., 2002**).



**FIGURA 8.** Vial en el que se representa la fase gaseosa, fase sólida o líquida y el espacio de cabeza.

Existen diferentes técnicas de análisis del espacio de cabeza (**Rouseff, L & Cadwallader, 2001**):

- Espacio de cabeza estático
- Espacio de cabeza dinámico purga y trampa
- Nariz electrónica y olfatometría – Espacio de cabeza dinámico
- Microextracción en fase sólida (SPME) – Espacio de cabeza estático

**Espacio de cabeza estático.** Se trata de un procedimiento con un único paso, en el que se termostatiza la muestra cierto tiempo a una temperatura seleccionada y se establece el equilibrio entre la fase de la muestra y la fase gas (espacio de cabeza) del vial. Posteriormente una alícuota del espacio de cabeza (estado gaseoso), tomado con una jeringuilla, es introducido, con un gas portador, al cromatógrafo de gases. El gas portador permite arrastrar los compuestos volátiles a la columna cromatográfica y separarlos de la manera habitual. Con la información obtenida de análisis se puede establecer la naturaleza y concentración de los compuestos volátiles presentes en la muestra.

El equilibrio termodinámico de las dos fases en el vial es caracterizado por el coeficiente de repartición ( $K_i$ ) que representa la relación entre la concentración de analito en las dos fases: en la fase gaseosa ( $C_i^G$ ) y en la fase de la matriz alimentaria (acuosa) ( $C_i^S$ ). Este proporciona información cuantitativa sobre la retención de los compuestos aromáticos en la matriz alimentaria.

$$K_i = C_i^G / C_i^S \quad (\text{Ec.3})$$

$$C_i^S = C_i^G / K_i \quad (\text{Ec. 4})$$

La composición y complejidad de la influencia de la matriz alimentaria sobre el coeficiente de partición es función de la hidrofobicidad, y en menor medida de la entalpía y la vaporización (**E.Guichard, 2015**).

Si una alícuota de gas es analizada en la fase gaseosa, el área del pico obtenido será proporcional a la concentración en el espacio de cabeza:

$$A_i^G \approx C_i^G \quad (\text{Ec. 5})$$

Por otro lado, de acuerdo con la ecuación 5,  $C_i^G$  es proporcional a  $C_i^S$ , por lo que el área de pico también será proporcional a la concentración en la muestra:

$$C_i^S = (const.) A_i^G \quad (\text{Ec. 6})$$

**Espacio de cabeza dinámico purga y trampa.** Se trata de un procedimiento desarrollado para suplir algunas limitaciones del espacio de cabeza como la limitación del tamaño de muestra y de sensibilidad. Se realiza un borboteo sobre la superficie de la muestra y los compuestos volátiles se atrapan en trampas frías, trampas con un disolvente o con un adsorbente sólido, para posteriormente desorberlos y analizarlos mediante cromatografía.

Este procedimiento también tiene algunas limitaciones producidos por el material empleado en la trampa.

**Nariz electrónica.** En ocasiones no se considera como una técnica de espacio de cabeza. Sin embargo, se trata de un proceso de espacio de cabeza dinámico, ya que la manera habitual de trabajar es mediante el paso de los gases del espacio de cabeza a través de un electrodo que analiza los compuestos.

**Microextracción en fase sólida (SPME).** Utiliza una fibra de sílice recubierta de un material absorbente y/o adsorbente que se puede introducir en el espacio de cabeza. Los compuestos volátiles del mismo se extraen y concentran en la misma y posteriormente son desorbidos en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases para su identificación o cuantificación.

Puesto que es la técnica que se emplea en el TFG se le dedica el apartado 1.4 de esta memoria.

### 1.3.3. 2-feniletanol

El **2-feniletanol es un compuesto volátil** también conocido como alcohol 2-feniletílico o alcohol metilbencílico es un líquido incoloro de olor característico a rosas, siendo un producto inflamable, pudiendo producir quemazón y tos tras su inhalación, y enrojecimiento ocular.

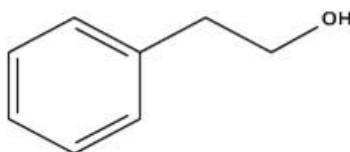
**TABLA 5.** Resumen de las propiedades del 2-feniletanol.

Nombre compuesto	Fórmula química	Peso molecular	Nº CAS	Log P
2-Feniletanol	$C_8H_{10}O$	122,2	CAS 60-12-8	1,36

Este producto es muy apreciado como fragancia en la industria del perfume y en la producción de cosméticos. Dada su estabilidad en medios alcalinos puede ser utilizado como fragancia de jabones. También es utilizado como materia prima en la producción de derivados de él mismo, que son utilizados en pequeñas cantidades como aditivo alimentario para dar sabor y olor. Este producto se encuentra de forma natural en productos que requieren una fermentación: pan, vino, sidra, cerveza, queso, salsa de soja, hojas de té, cacao y café (**Bergadà Miró, 2007**).



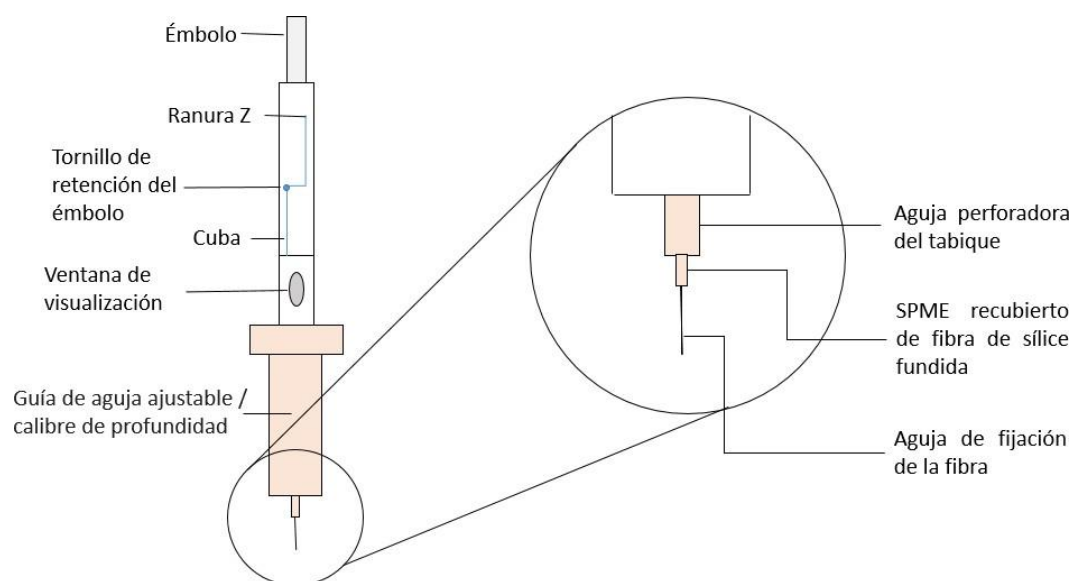
En la base de datos **Volátil Compounds in Food (2019)**, podemos encontrar más de cien alimentos que contienen el 2-feniletanol como, por ejemplo, plátanos, carne, pescados, chirimoyas, ginebras, vino de guayaba, vino de frutas de la pasión, té roiboos, etc., aportándoles un olor característico.



**FIGURA 9.** Molécula de 2-feniletanol.

#### 1.4. Microextracción en fase sólida (SPME).

Esta técnica fue desarrollada por Pawliszyn en los 90. Se basa en la extracción y concentración de compuestos volátiles sobre una fibra de sílice fundida recubierta sobre materiales absorbente y adsorbente como el polidimetilsiloxano (PDMS), divinilbenceno (DVB), carboxen (CAR) y polietilenglicol (PEG). Esta técnica es rápida, barata, limpia y versátil, y puede acoplarse al análisis a través de cromatografía de gases (CG). La fibra es de pequeño tamaño (1-2 cm) y espesores de 7-100  $\mu\text{m}$ . Se incorpora en el interior de una jeringa (*holder*) que la protege hasta su uso (**Zhang, Z. Y.; Pawliszyn, J, 1993**).



**FIGURA 10.** Partes del holder de SPME. Ampliación de detalle.

Existen varios parámetros que afectan al proceso de extracción a través de esta técnica: la naturaleza química del recubrimiento de la fibra, el tiempo de extracción y desorción, el volumen de la muestra, volumen del espacio de cabeza, el pH, la fuerza iónica, la agitación y la dilución de la muestra.

En este trabajo se utilizará la SPME en muestras gaseosas, para analizar los compuestos aromáticos activos del espacio de cabeza. Este método de extracción finaliza cuando la concentración del analito, se ha distribuido entre las fases, alcanzando el equilibrio.

Si sumergimos la fibra en el medio acuoso donde se encuentra el analito, las condiciones de equilibrio quedan recogidas en la ecuación 7, siguiendo la ley de la conservación de la masa.

$$C_0 V_s = C_s^\infty V_s + C_f^\infty V_f \quad (\text{Ec. 7})$$

Donde  $C_0$ , es la concentración inicial del analito en la muestra.  $V_s$ , es el volumen de muestra.  $V_f$  es el volumen del revestimiento de la fibra.  $C_f^\infty$  es la concentración de equilibrio de la fibra.  $C_s^\infty$ , la concentración de equilibrio en la muestra.

Al sumergir la fibra en la matriz acuosa, se determina la constante de distribución del analito, entre la fibra y la solución acuosa (8).

$$K_{fs} = C_f^\infty V_f / C_s^\infty V_s \quad (\text{Ec. 8})$$

Reagrupando y reordenando las ecuaciones 7 y 8, podemos expresar el número de moles extraídos en el equilibrio.

$$n = C_f^\infty V_f = (K_{fs} V_f V_s C_0) / (K_{fs} V_f + V_s) \quad (\text{Ec. 9})$$

Si añadimos al sistema, el espacio de cabeza, aparece  $K_{hs}$  siendo la constante de distribución del analito, entre la fibra y el espacio de cabeza.

$$K_{hs} = C_h^\infty V_h / C_s^\infty V_s \quad (\text{Ec. 10})$$

Donde  $C_h^\infty$ , es la concentración de equilibrio en el espacio de cabeza, y  $V_h$ , el volumen del espacio de cabeza.

Con ello la ecuación del número de moles queda rescrita de la siguiente manera.

$$n = C_f^\infty V_f = (K_{fs} V_f V_s C_0) / (K_{fs} V_f + K_{hs} V_h + V_s) \quad (\text{Ec. 11})$$

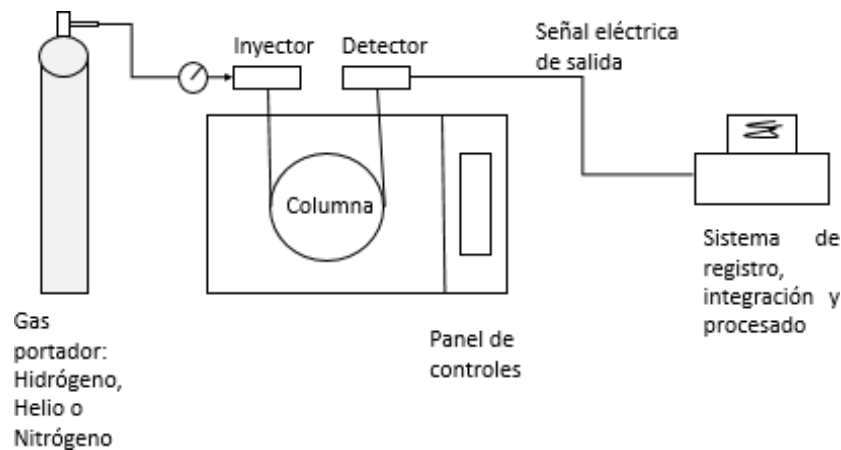
Con ello se observa que independientemente de si se incluya en el sistema el espacio de cabeza o no, el número de moles extraídos depende únicamente de la concentración en el equilibrio de la fibra y del volumen en contacto de la fibra, siempre y cuando el volumen de muestra y de espacio de cabeza se mantenga constante.

### 1.5. Cromatografía de gases

La **cromatografía de gases** está compuesta por todos aquellos métodos cromatográficos en los que la fase móvil es un gas inerte (generalmente He), y la fase estacionaria puede ser líquida o sólida. Esta técnica instrumental se basa en la separación de componentes de una mezcla, que atraviesan la fase estacionaria, localizada en la columna, a distintas velocidades.

El arrastre de los componentes se produce mediante el gas portador de la fase móvil. Esta técnica no solo permite separar compuestos de una mezcla, sino también identificarlos y cuantificarlos.

En la figura 11 se representa un esquema del cromatógrafo de gases.



**FIGURA 11.** Esquema general del cromatógrafo de gases.

Un cromatógrafo de gases presenta los siguientes componentes básicos:

- La columna cromatográfica, en su interior está la fase estacionaria que entrará en contacto con la fase móvil.
- Un sistema de impulsión del gas a través de la columna. Normalmente los rangos de presión son de  $2 \text{ kg/cm}^2$ .
- Un sistema de introducción de las muestras, situado entre el suministro de gas y la columna. Normalmente es un plástico de silicona que pueda ser perforado por una jeringa para permitir la inyección de las muestras.
- El detector equipado con un electrómetro y un sistema de registro. Estos permiten ver y cuantificar la cantidad de sustancia eluida en la columna.
- Horno termostático, permite regular la temperatura del equipo para que la cromatografía se lleve de manera idónea.

La velocidad de los componentes está ligada con la tendencia de cada molécula a interactuar con la fase estacionaria, donde se disolverán o absorberán, o a comportarse como un gas viajando a la velocidad de la fase móvil. Las moléculas menos volátiles, es decir las más pesadas y polares, se disolverán en la fase estacionaria y serán las que viajen a menor velocidad. Para aumentar la velocidad de las moléculas se aumenta la temperatura, siendo el límite la temperatura de descomposición del compuesto más sensible.

### 1.6. Percepción

La percepción de un alimento es el resultado de un complejo proceso sensorial en el que influyen tanto los sentidos del consumidor como la experiencia y estado anímico del consumidor. (Ibáñez Moya, Barcina Angulo, & Herrera Marteache, 2001).

## 1.6.1. Percepción del olor

Para que las moléculas volátiles sean detectadas por la nariz humana deben alcanzar el epitelio olfativo. Hay dos formas de estimular el sistema olfativo: la **vía ortonasal** y la **vía retronasal** (ver Figura 12). Al pasar por la **vía retronasal**, los compuestos aromáticos se liberan en la boca durante el consumo de bebidas o alimentos y luego se conducen a la cavidad nasal durante la espiración, se llama aroma. La **vía ortonasal** es la ruta normal que toma el aire, los compuestos químicos volátiles ingresan al frente de la nariz durante la inspiración, se llama olor. Se ha demostrado que la percepción retronasal tiende a ser menos sensible, esta diferencia puede explicarse por un flujo de aire diferente (cantidad y dirección) pero también por el hecho de que la percepción retronasal está acompañada por otros estímulos (textura y sabor)

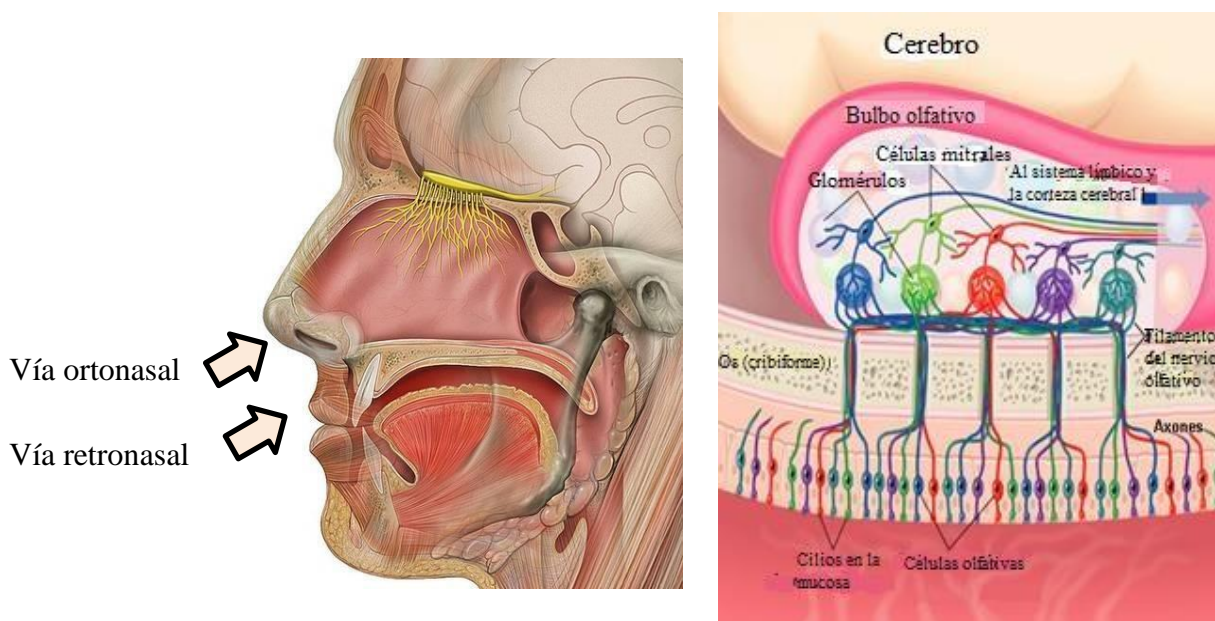


FIGURA 12. Sistema olfativo.

El **epitelio olfativo** se extiende desde la cavidad nasal hasta el bulbo olfativo. Los receptores olfativos (RO) se encuentran en la interfaz con la mucosa nasal (Figura 12). El transporte de moléculas odorantes desde el aire a los receptores a través de la mucosa se realiza mediante un proceso de transferencia, que permite su liberación de la matriz. Este método depende de las propiedades físico-químicas de las moléculas y también puede ser proporcionado por OBP (Proteínas de Unión de Odorantes) que son solubles en la mucosa y se unen a compuestos hidrófobos, no solubles en la mucosa. Por lo tanto, el transporte de los compuestos hidrófobos depende de su afinidad con estas proteínas.

Los RO se acoplan a las proteínas G, de modo que cuando una molécula de olor se une a la RO, esto causa una cascada de eventos que transforman la señal química en una señal bioquímica y luego eléctrica a través de esta proteína. La neurona olfativa luego se activa y envía una señal a los glomérulos y células mitrales ubicadas en el bulbo olfativo. Cada glomérulo está conectado a un tipo específico de RO, formando así un mapa espacial específico para cada olor, descubriendo que cada neurona olfativa solo expresa a un tipo de receptor.

El bulbo olfativo está contra la superficie inferior del lóbulo frontal y desempeña un papel importante en las capacidades olfativas. La señal se proyecta luego a regiones más altas del cerebro donde se lleva a cabo la integración del mensaje sensorial. En particular, se conoce que hay una unión directa con la amígdala, estructuras importantes en el "sistema límbico", una parte evolutiva del cerebro fuertemente involucrada en las emociones humanas. Actualmente se cree que la amígdala ayuda en la percepción de la intensidad de olores y sabores (**Barham et al., 2010**).

Ha sido posible identificar en humanos cerca de 340 RO que permiten percibir y discriminar los olores. Un odorante puede actuar sobre varios tipos de receptores y en diferentes grados. Del mismo modo, un receptor puede interactuar con varios olores. Por lo tanto, cada olor tiene su propio patrón de activación RO y se puede obtener un gran número de combinaciones. Es por ello que ligeros cambios en la concentración o en la molécula volátil (enantiómeros) pueden conducir a la percepción de distintos olores (**Le Bon et al., 2008; Thomas-Danguin et al., 2014; Barba, Beno, Guichard, & Thomas-Danguin, 2018**).

#### 1.6.2. Percepción del sabor

Los sabores básicos son: dulce, salado, amargo, ácido y el umami. Éste último se ha añadido recientemente y asociado con el glutamato monosódico de algunos alimentos que potencia su sabor. Cada papila gustativa consta de 50 a 100 células sensoriales especializadas que son estimuladas por moléculas sápidas. Cuando se estimula una célula sensorial, se envía una señal a través de diferentes nervios craneales a las regiones del gusto en el tronco cerebral. La información luego se transfiere al tálamo y en una región específica de la corteza cerebral, lo que nos permite estar conscientes de la percepción de uno o más sabores.

Actualmente se conocen proteínas específicas receptoras del amargo, dulce y umami. Todos estos receptores son una subclase de la familia de receptores acoplados a la proteína G y se han clasificado como T1R1, T1R2, T1R3 y T2R. Siendo los heterodímeros T1R2 y T1R3 los encargados de la detección del dulce; y T1R1 y T1R3 del umami. Por otro lado, se ha demostrado que gran cantidad de TR2 son receptores del amargo. Los receptores para sabores agrios y salados son esencialmente canales iónicos, pero todavía permanecen en investigación, aunque los receptores agrios se han limitado de tipo TRP, es decir de potencial de receptor transitorio (**Barham et al., 2010**).

La percepción del gusto está estrechamente relacionada con otros sentidos, como el olfato, y también con las sensaciones trigeminales, cuyos receptores se encuentran en las cavidades nasales y orales. Los últimos permiten dar lugar a muchas sensaciones como el picante, astringente, frío, caliente, etc.

En última instancia, todas las sensaciones trigeminales, sabores y olores están integrados por el sistema nervioso central para formar la percepción global del sabor de los alimentos. Esta integración también permite interacciones multimodales, como las interacciones entre olor y sabor.

### 1.6.3. Interacciones olor y sabor

Tanto el olor como el sabor responden frente a estímulos químicos. Estos sentidos se encuentran fuertemente ligados entre sí, influyendo sobre la sensación y percepción de los alimentos. Gracias al olfato, prevenimos al gusto de la señal que va a recibir, y de esta forma ya se predispone el organismo a rechazar o aceptar el alimento.

Una de las vías de percepción de los olores que influye mucho sobre el gusto, es la vía retronasal. Cuando los olores se perciben por esta vía, se conocen como aromas, refiriéndose a la sensación debida a la percepción de sustancias volátiles a través de la mucosa del paladar una vez que el alimento se ha introducido en la boca. Esta olfacción se produce al exhalar y nos capacita para recibir las cualidades de los productos que acabamos de ingerir, influyendo como se ha dicho sobre el gusto, y originando el sabor **(Fisher & R. Scott, 1997; Buettner, A. (Ed.), 2017, Barba, Beno, Guichard, & Thomas-Danguin, 2018).**

## 2. CONTEXTO

El trabajo fin de grado se enmarca dentro de las normativas Europeas, orientadas en ayudar a los consumidores a mejorar su salud disminuyendo el consumo de azúcar, sal y grasa (**Reglamento (CE) 1924/2006**).

La sacarosa se añade frecuentemente a los alimentos y bebidas para aportarles dulzor y textura. Sin embargo, estudios realizados relacionan el consumo de azúcar, especialmente el azúcar libre (sacarosa) con la diabetes, la obesidad y las caries. Por esta razón, son reiterativas, por parte de organizaciones como la Comisión Europea y la Organización Mundial de la Salud, las medidas para la mejora de la composición de estos productos.

En la actualidad es frecuente la sustitución de azúcares por polioles y edulcorantes de bajo contenido calórico. Los polioles, de forma muy similar a los azúcares, proporcionan sabor y textura, pero además influyen en la liberación de los compuestos volátiles presentes en la matriz alimentaria. La modificación del perfil volátil, conduce a una modificación de la percepción sensorial, y con ello a un impacto en la aceptabilidad de un determinado producto alimentario. Los factores que influyen sobre la liberación de un aroma son dos: la termodinámica determinada por la volatilidad del aroma y la cinética relacionada con la resistencia a la transferencia de masa desde la matriz alimentaria al aire.

La **interacción de compuestos volátiles con diferentes matrices alimentarias** con diversos tipos y concentraciones de proteínas, carbohidratos y lípidos ha abordado en la bibliografía. Sin embargo, es mucho menos frecuente el estudio de la interacción de compuestos volátiles con polioles. Este hecho probablemente se debe a la novedad de sustituir la glucosa por polioles en la industria alimentaria. Además, el estudio del efecto de la adición de aromas en muestras con polioles para ensalzar su efecto sobre la percepción del dulzor, no ha sido abordada hasta el momento en la bibliografía. Por esta razón, se proponen los objetivos detallados en el siguiente apartado.

### 3. OBJETIVO Y PLAN EXPERIMENTAL

El **objetivo general** del trabajo fin de grado es el estudio de la disminución del consumo de sacarosa en bebidas refrescantes mediante la sustitución con polioles e intensificación de la percepción del dulzor con aromas.

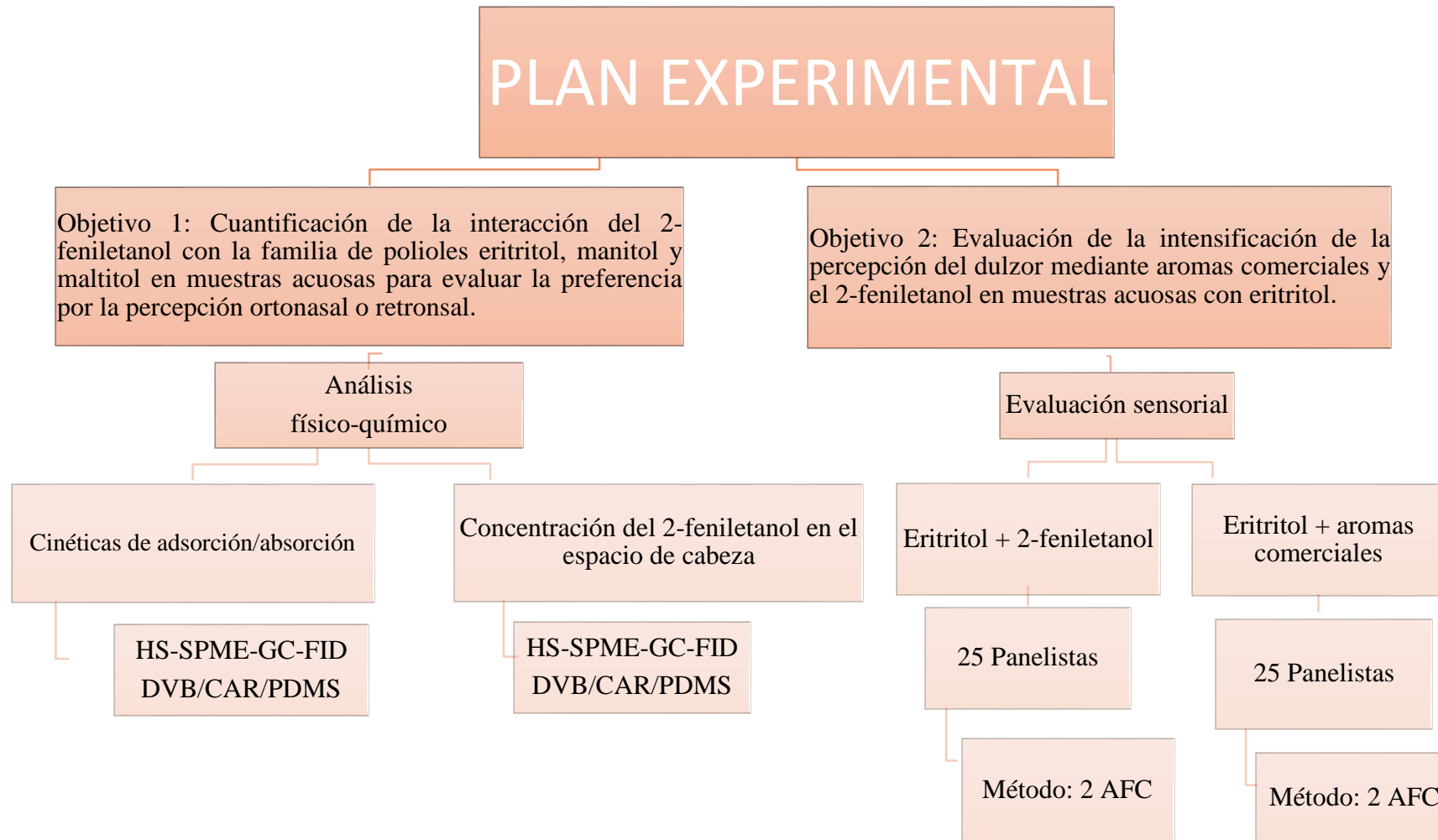
Los objetivos específicos del presente trabajo son:

**Objetivo 1:** Cuantificación de la interacción del 2-feniletanol con la familia de polioles eritritol, manitol y maltitol en muestras acuosas para evaluar la preferencia por la percepción orthonasal o retronsal.

**Objetivo 2:** Evaluación de la intensificación de la percepción del dulzor mediante aromas comerciales y el 2-feniletanol en muestras acuosas con eritritol.



## OBJETIVO Y PLAN EXPERIMENTAL



## OBJETIVO Y PLAN EXPERIMENTAL

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Análisis mediante cromatografía

#### 4.1.1. Muestras

**Poliolios.** Se emplearon tres poliolios: eritritol ( $C_4H_{10}O_4$ ,  $P_m=122$ ), manitol ( $C_6H_{14}O_6$ ,  $P_m=182,172$  g/mol) y maltitol ( $C_{12}H_{24}O_{11}$ ,  $P_m=344,31$  g/mol) suministrados por Cargill. Estos poliolios fueron elegidos porque pertenecen a la misma familia química de poliolios. Además, todos ellos se emplean en la industria alimentaria: eritritol (E968), manitol (E421) y maltitol (E965).

**Compuesto volátil.** El 2-feniletanol es un compuesto volátil aromático y activo con notas a fruta, miel, lila, rosa y vino (**Volatile Flavour Compound Database**). El 2-feniletanol está presente de manera natural en muchos alimentos y bebidas y también se comercializa en grado alimentario.

#### 4.1.2. Preparación de muestras

**Preparación de muestra:** El 2-feniletanol se solubilizó en agua desionizada con el polioli correspondiente (10%, w/w) para obtener una concentración de 100 ppm, se mantuvo durante 30 minutos en el baño de ultrasonidos, con el fin de favorecer su solubilización.

**Preparación del blanco:** Se solubilizó el 2-feniletanol en agua desionizada hasta una concentración de 100 ppm, se mantuvo durante 30 minutos en el baño de ultrasonidos.

#### 4.1.3. Condiciones HS-SPME-CG

Para establecer la metodología de análisis, se toman como referencia los ensayos desarrollados por (**Fabre, Aubry, & Guichard, 2002; Ebeler & Jung, 2003**). Es por ello que, siguiendo dichas referencias, se establece el siguiente procedimiento.

Se empleó un holder manual de SPME con una fibra de SPME Stableflex 2 cm-50/30 DVB/CAR/PDMS suministrada por Supelco Co. (Bellefonte, PA). La fibra fue acondicionada a 250°C durante 2h en el inyector del GC. Antes de cada inyección se reacondiciona la fibra a 250°C durante 30 min, se comprobó entre análisis que la fibra estaba limpia.

Se añadió 3 mL de muestra (2-feniletanol a la concentración de 100 ppm, en una dilución al 10% (w/w) del polioli), en un vial de 10 mL, el cual fue inmediatamente cerrado con parafilm. Se termostatiza a 25°C durante una hora en el baño. Para el análisis del blanco, se realizó el mismo procedimiento utilizado en la muestra.

Para la extracción del 2-feniletanol, se colocó la fibra sobre el espacio de cabeza, de ahí las siglas HS, que provienen del inglés *headspace*, en los siguientes tiempos de extracción: 1, 5, 30, 60, 80, 120, 140 y 180 min.

Para el análisis se utilizó un cromatógrafo de gases HP 5890 Series II con detector FID (Flame Ionization Detector), ver figura 13.



**FIGURA 13.** Cromatógrafo de gases empleado.

Se realizan los análisis en una columna de 30 m de longitud x 0,53 mm de diámetro interno recubierta con un espesor de película de 1,0  $\mu\text{m}$  100 % polietilenglicol con fase entrecruzada y químicamente ligada (SupraWax-280, Technokrom). El programa de temperaturas del horno comienza a 40°C y aumenta a 5°C/min hasta 220°C, el tiempo total de este programa es de 36 min. La temperatura del inyector y detector fueron 250°C y 300°C, respectivamente. Para la desorción del 2-feniletanol dentro del cromatógrafo de gases, se deja inyectada la fibra durante 5 min.

En la tabla 6 se determinan las condiciones de trabajo utilizadas en los análisis.

**TABLA 6.** Condiciones de trabajo con la fibra de SPME.

Característica	Condición
Temperatura de estabilización	25°C
Tiempo de estabilización	60 min
Tiempo de desorción	5 min
Volumen de la muestra	3 ml
Tipo de fibra	DVB/CAR/PDMS

#### 4.2. Análisis sensorial, método 2-AFC.

El objetivo de este análisis consiste en evaluar la influencia del aroma sobre la percepción dulce, a través del test sensorial de comparación por parejas, el cual es un test de elección entre dos alternativas (“*two alternatives forced choice*”, 2-AFC). Para ello una de las muestras contiene un aroma y la otra no.

En este análisis sensorial se utilizará solamente el poliol eritritol y el 2-feniletanol, así como aromas comerciales (melocotón, fresa, mango y violeta) asociados al dulzor y otro no asociado, como elemento control (ajo).

#### 4.2.1. Materiales

**Preparación muestra de referencia:** se solubilizó el eritritol en agua mineral (10%, w/w).

**Preparación muestra de 2-feniletanol:** El 2-feniletanol se solubilizó en agua mineral (La majuela, Eroski) con el eritritol (10%, w/w) para obtener una concentración de 100 ppm, se mantuvo durante 30 minutos en el baño de ultrasonidos, para favorecer su solubilización.

**Aromas comerciales:** melocotón, mango, fresa, ajo y violeta. Ver figura 14.



**FIGURA 14.** Aromas comerciales empleados: melocotón, mango, fresa, violeta, ajo y 2-feniletanol.

**Preparación muestras comerciales y muestra control:** cada aroma comercial se solubilizó en agua mineral (La majuela, Eroski) con el eritritol (10%, w/w). La tabla 7 refleja las concentraciones de los aromas.

**TABLA 7.** Concentraciones utilizadas para cada muestra de cada aroma.

Aroma	Concentración (ppm)
Fresa	1000
Mango	1000
Melocotón	1000
Violeta	5000
2-feniletanol	100
Ajo	500

#### 4.2.2. Procedimiento

Se estableció un panel de cata de 25 panelistas no entrenados. A estos sujetos se les presentaron una serie de muestras por parejas, y se les realizó la siguiente pregunta: bajo una percepción global ¿Cuál de las dos muestras te parece más dulce?

Para no interferir en sus criterios de decisión las muestras fueron codificadas, con un dígito de tres cifras aleatorio.

El volumen de muestra fue de 10 ml, que se presentó en unas tarrinas de plástico cubiertas con una tapa de plástico. El formato de presentación puede verse en la figura 15.



**FIGURA 15.** Tarrinas utilizadas en el análisis sensorial, 2-AFC.

Si el sujeto no percibió la diferencia o no tuvo clara la elección, se le obligó a elegir una de las dos muestras, dejando el resultado al azar.

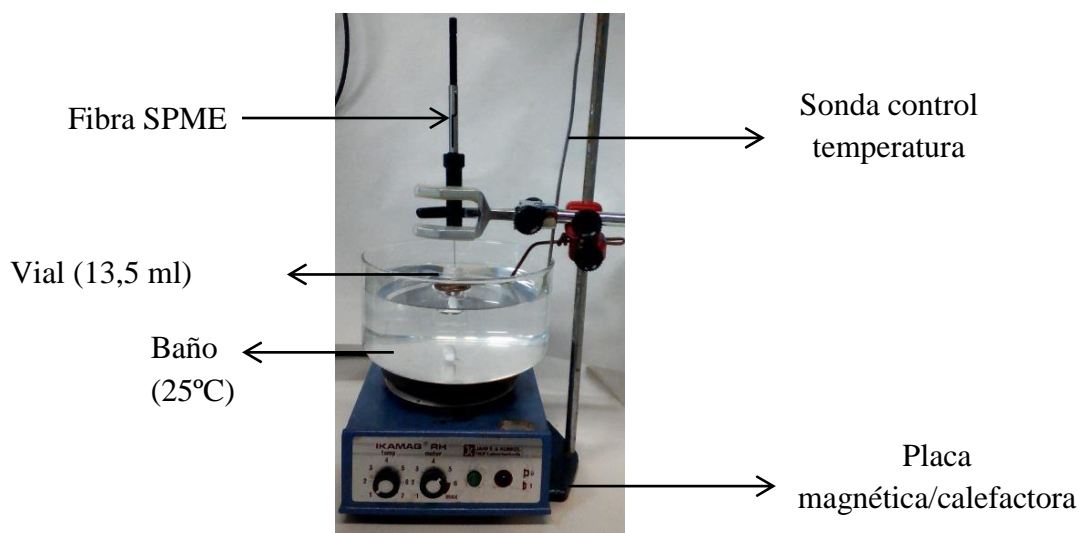
A los panelistas se les presentaron una serie de 6 parejas de muestras, y por cada pareja debieron elegir la muestra que consideraron más dulce, bajo una percepción global. Se estableció una muestra control con aroma a ajo, con el fin de analizar la sensibilidad de los panelistas.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Determinación de las condiciones para el análisis mediante HS-SPME

Para elaborar el protocolo de análisis mediante cromatografía de gases, se tuvo que analizar el comportamiento de tres variables: volumen de la muestra, fibra a utilizar y concentración de la muestra, para así optimizar el método.

La primera variable a optimizar fue el volumen de la muestra. Ya que los viales que se utilizaron tenían una capacidad de 13,5 ml, se optó por añadir en ellos un volumen de muestra de 5ml. Esta decisión fue desestimada, ya que al insertar la fibra en el espacio de cabeza, con ayuda del equipo que se ideó (ver figura 16) la fibra entraba en contacto con el medio acuoso, alterando la medición deseada. Por este motivo se decidió probar con un menor volumen, 3 ml. De esta forma la fibra se quedaba situada en el centro del espacio de cabeza.

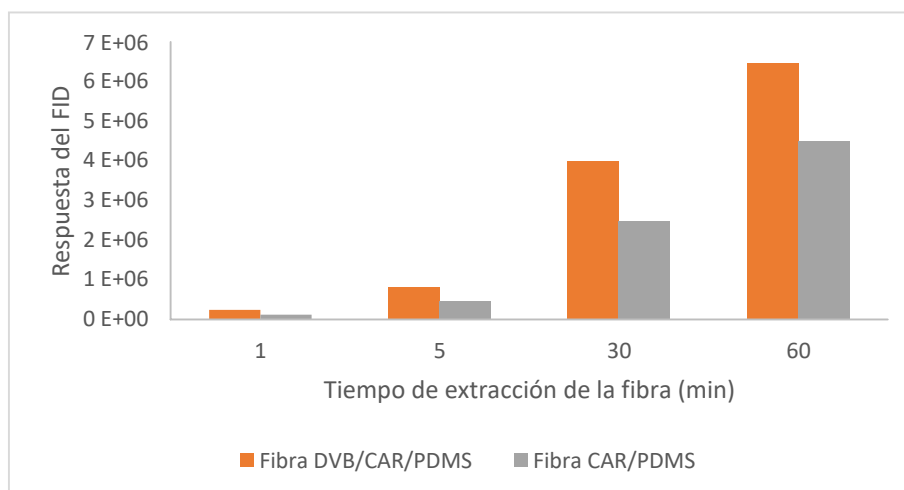


**FIGURA 16.** Dispositivo generado para análisis HS-SPME.

Otro parámetro a tener en cuenta, fue la concentración del 2-feniletanol en la matriz acuosa. En un primer momento se optó por 1000 ppm. Al analizar la respuesta del FID (área del pico), con un tiempo de extracción de la fibra de 1 minuto, esta era muy elevada, saturando por completo la fibra. Es por ello que se desestimó la idea de trabajar a esta concentración y probar a 100 ppm. En este caso la respuesta del FID era acorde a la concentración añadida y se veía una progresión lineal de la misma, conforme iban aumentando los tiempos de retención.

Por último, se decidió con que fibra trabajar, teniendo las siguientes opciones: CAR/PDMS y DVB/CAR/PDMS. En un primer lugar se probó la fibra CAR/PDMS, y se observó su comportamiento, es decir la respuesta del FID. Se pudo determinar que su capacidad de concentrar el 2-feniletanol era muy baja, y que por tanto su afinidad al aroma y su sensibilidad eran muy bajas. Es por ello que se probó con la fibra DVB/CAR/PDMS, y se pudo observar que esta era mucho más afín al aroma y que permitía una mejor concentración.

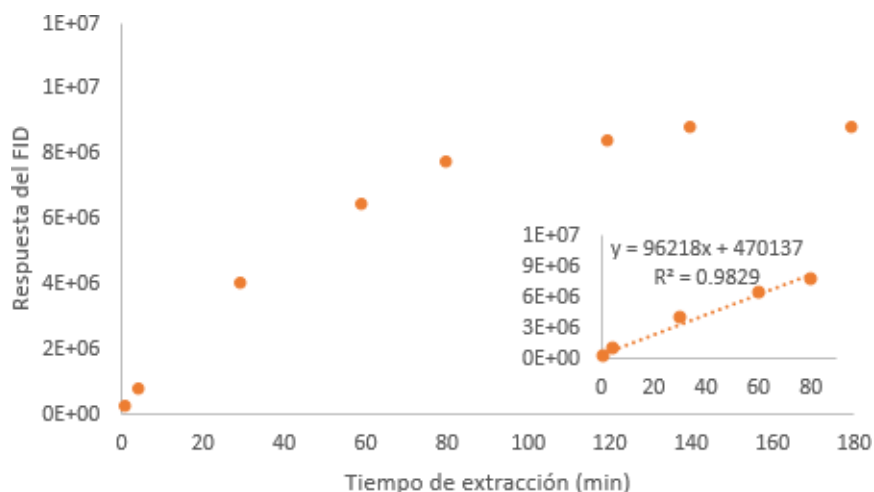
Esto se observa en la figura 17.



**FIGURA 17.** Comparación de la respuesta del FID de ambas fibras.

### 5.2. Determinación de las cinéticas de adsorción/absorción del 2-feniletanol.

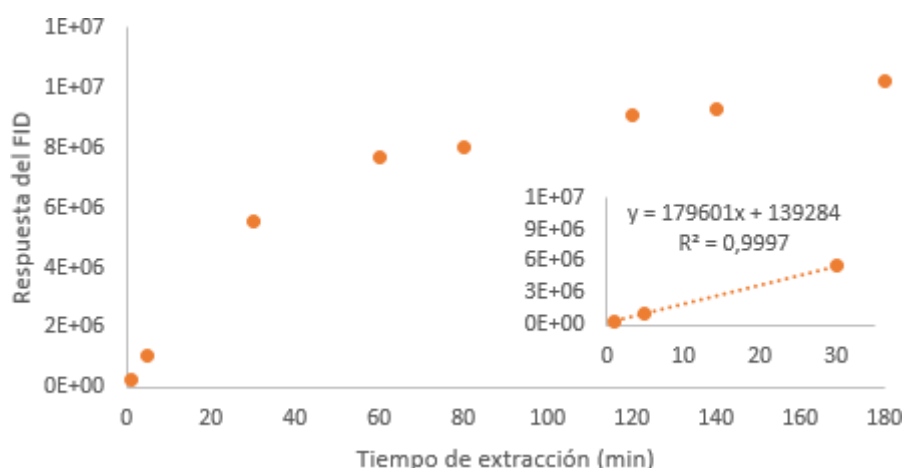
En la figura 18 se observa la cinética que presenta el 2-feniletanol en solución con agua desionizada. La gráfica tiene una primera parte hasta los 80 minutos, con un aumento lineal. A partir de los 60 minutos no se observa un aumento apreciable del área de la respuesta del FID (RSD<5,93%).



**FIGURA 18.** Cinética de adsorción/absorción de 2-feniletanol en agua.

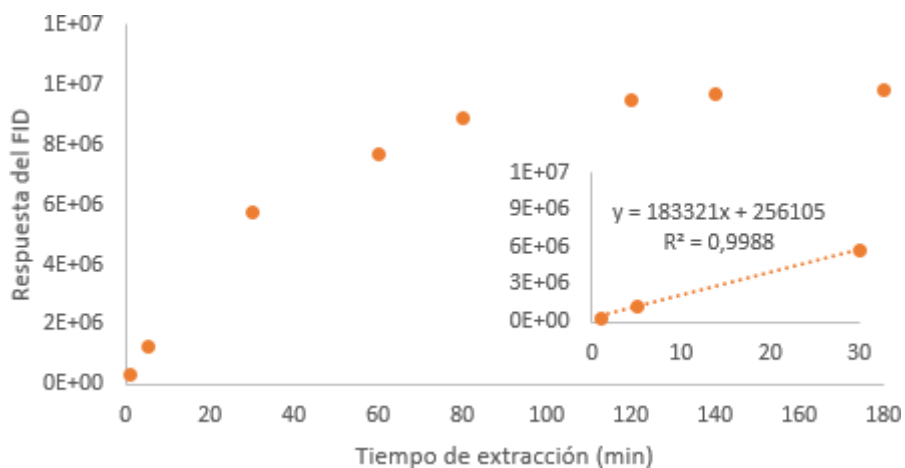
En la figura 19, se analiza la cinética que presenta el 2-feniletanol, en solución de eritritol/agua. La parte lineal en comparación con la figura 17, se extiende hasta los 30 minutos y la pendiente aumenta. El aumento de la pendiente y la disminución del tramo lineal, indican que la velocidad de liberación del aroma al espacio de cabeza es mayor y la influencia del eritritol en la solución. A partir de los 60 minutos no se observa un aumento apreciable del área de la respuesta del FID (RSD<9,52%).





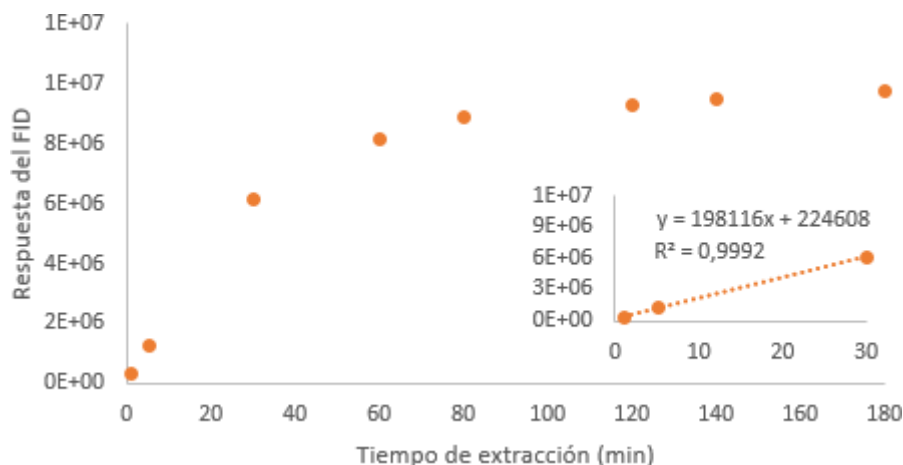
**FIGURA 19.** Cinética de adsorción/absorción de 2-feniletanol en eritritol/agua.

En la figura 20 se representa la cinética del 2-feniletanol en solución en agua, en presencia de manitol. Si la comparamos con la figura 17, se determina que el tramo lineal de la gráfica se reduce 50 minutos, quedándose acotado a los 30 minutos. Además, la pendiente de la recta es mayor, indicando que la liberación del aroma al espacio de cabeza es más rápida. A partir de los 60 minutos no se observa un aumento del área de la respuesta del FID (RSD<8,49%).



**FIGURA 20.** Cinética de adsorción/absorción de 2-feniletanol en manitol/agua.

Por último, en la figura 21, se refleja la cinética del 2-feniletanol en disolución de maltitol/agua. El primer tramo lineal tiene una pendiente mucho mayor que en el caso de la cinética reflejada en la figura 17. Además, este tramo se extiende hasta los 30 minutos. A partir de los 60 minutos no se observa un aumento del área de la respuesta del FID (RSD<6,04%).



**FIGURA 21.** Cinética de adsorción/absorción de 2-feniletanol en maltitol/agua.

Si la solución contiene un poliol, la cinética muestra que su pendiente es más elevada y que la liberación del 2-feniletanol al espacio de cabeza es más rápida. Además, se identifica que se requiere menos tiempo para observar aumentos del área de respuesta del FID no significativos. Es decir, que el tramo lineal es más corto, siendo para las cinéticas de las soluciones con polioles un tiempo de 60 minutos, y para el caso de la solución sin poliol 80 minutos.

En la tabla 8 se muestra un resumen de las ecuaciones obtenidas en el tramo lineal de la gráfica. Es necesario establecer estas condiciones de linealidad para lograr una determinación cuantitativa del 2-feniletanol, que se realizará en el apartado 5.4, de esta memoria. **(Roberts, Pollien, & Milo, 2000).**

En resumen, se determina que la pendiente correspondiente al tramo de crecimiento lineal, va aumentando conforme aumenta el tamaño de la molécula. Con ello se determina que la velocidad de liberación del aroma al espacio de cabeza, es mayor conforme aumenta el peso molecular

**TABLA 8.** Ecuación, ajuste y pendiente de las gráficas de cinética de adsorción/absorción. Peso molecular de cada poliol.

Muestra	Ecuación	R <sup>2</sup>	Pendiente	Peso molecular del poliol
Agua/2-feniletanol	$y = 96218x + 470137$	0,9829	96218	n.a
Eritritol/agua/2-feniletanol	$y = 179601x + 139284$	0,9997	179601	122,12
Manitol/agua/2-feniletanol	$y = 183321x + 256105$	0,9988	183321	182,17
Maltitol/agua/2-feniletanol	$y = 198116x + 224608$	0,9992	198116	344,31

Además las cinéticas de adsorción/absorción, se pueden ajustar a ecuaciones logarítmicas de primer grado. Estas ecuaciones gráficamente, contienen una asíntota, es decir se acercan infinitamente a un punto concreto, que en nuestro caso sería el equilibrio entre las fases. Los resultados de este ajuste logarítmico quedan reflejados en la tabla 9.

**TABLA 9.** Ecuación logarítmica y ajuste, de las gráficas de cinética de adsorción/absorción

Muestra	Ecuación	R2
Agua/2-feniletanol	$y = 2E+06\ln(x) - 984952$	0,9355
Eritritol/agua/2-feniletanol	$y = 2E+06\ln(x) - 817851$	0,9636
Manitol/agua/2-feniletanol	$y = 2E+06\ln(x) - 678383$	0,964
Maltitol/agua/2-feniletanol	$y = 2E+06\ln(x) - 550864$	0,9664

El error de la muestra de agua/2-feniletanol es mayor en referencia al resto. Esto se debe a que la gráfica posee una parte lineal inicial más larga que el resto, ver figura 18.

### 5.3. Determinación del tiempo mínimo para establecer el equilibrio

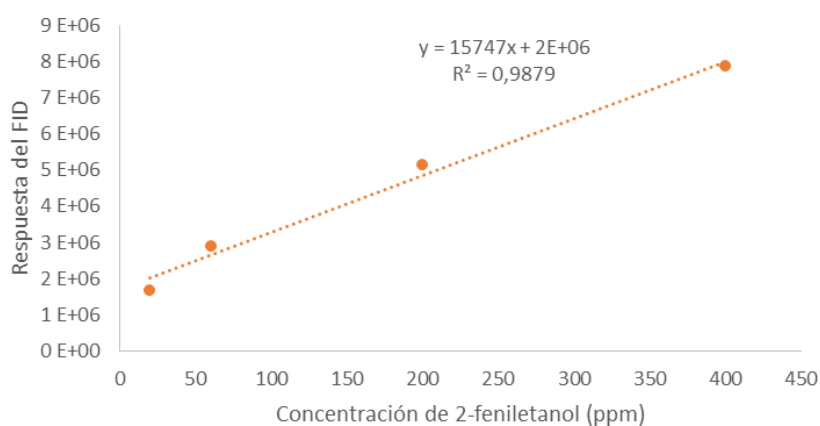
Las cinéticas permiten determinar el tiempo mínimo de equilibrio entre las tres fases (fase gaseosa, fase acuosa y la fibra).

El tiempo mínimo de equilibrio para la disolución de 2-feniletanol en agua, se establece en 80 minutos. Por otro lado, el tiempo mínimo de equilibrio para las disoluciones acuosas de 2-feniletanol, con cada poliol: eritritol, manitol y maltitol, se establece en 60 minutos.

Según la bibliografía (Roberts, Pollien, & Milo, 2000; Fabre, Aubry, & Guichard, 2002), los tiempos de equilibrio son de 60 minutos generalmente. Es por ello que nuestros resultados encajan dentro de esta premisa.

### 5.4. Determinación de la concentración de 2-feniletanol en el espacio de cabeza

Se realizó previamente una recta de calibrado, de concentraciones conocidas de 2-feniletanol en metanol (10, 20, 60, 200, 400 ppm). En la figura 22 se representa la recta de calibrado con la ecuación correspondiente, que permite el cálculo de la concentración en el espacio de cabeza.



**FIGURA 22.** Calibración GC-FID.

El empleo de HS-SPME no es un método habitual para determinar la concentración en el espacio de cabeza, pero actualmente se está utilizando por su versatilidad, limpieza y comodidad, además dada la coherencia de sus resultados (**Zhang, Z. Y.; Pawliszyn, J, 1993**).

Es posible determinar la concentración del espacio de cabeza, una vez que se ha equilibrado la muestra acuosa con el medio, si se utilizan tiempos de extracción de la fibra cortos (1 minuto). De esta forma se reduce la posibilidad de que la fibra se sobrecargue, y empiece a concentrar el compuesto volátil estudiado. Se conoce que los tiempos de extracción cortos, dan resultados de concentración del espacio de cabeza muy similares a los obtenidos por técnicas convencionales, aunque la sensibilidad de la fibra es mucho menor que si la comparamos con extracciones en las que se alcanza el tiempo de equilibrio. Las concentraciones en las que se alcanza el equilibrio entre las tres fases, reflejan la concentración del compuesto volátil, en la matriz alimentaria. (**Roberts, Pollien, & Milo, 2000**).

En el presente TFG, la determinación de la concentración del espacio de cabeza se establece a los 20 y 13 minutos, para el blanco y las muestras, respectivamente. Se seleccionan estos tiempos ya que se encuentran dentro de la parte lineal de la cinética, y son los menores tiempos cuantificables, dadas las características de la fibra. Además de esta forma la fibra únicamente extrae el 2-feniletanol del espacio de cabeza, y no comienza a concentrarlo. Las concentraciones obtenidas del 2-feniletanol en el espacio de cabeza quedan recogidas en la tabla 10.

La concentración del 2-feniletanol en el espacio de cabeza, refleja la interacción del compuesto con la matriz alimentaria y la propiedad de ser percibido por vía retronasal o ortonasal. A mayor concentración del aroma en el espacio de cabeza, se percibirá principalmente por vía ortonasal durante la ingesta.

**TABLA 10.** Concentración del 2-feniletanol en el espacio de cabeza medido a los distintos tiempos, dependiendo de la muestra.

Poliol que contiene la muestra	Tiempo	ppm 2-feniletanol (HS)
n.a	20	25,1
Eritritol	13	30,1
Manitol	13	40,6
Maltitol	13	50,8

Se observa que la concentración en el espacio de cabeza aumenta, conforme aumenta el peso molecular del poliol. En el caso del blanco, el tiempo requerido para la cuantificación es mucho mayor, ya que la liberación del aroma al espacio de cabeza es más lenta.

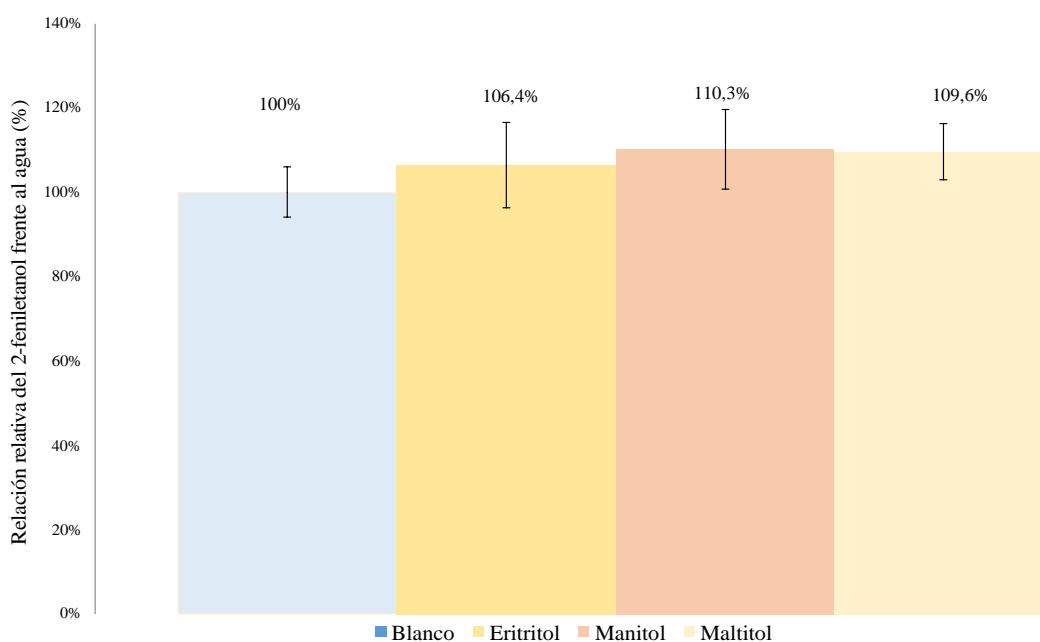
### 5.5. Efecto del poliol en la liberación/difusión relativa comparada con agua

Se determina el comportamiento del eritritol, manitol y maltitol, frente al 2-feniletanol, es decir la fuerza con la que libera/difunde cada poliol al aroma. Para ello los datos de área obtenidos una vez alcanzado el equilibrio entre las tres fases, se establecen en porcentajes relativos en referencia al blanco, considerado el 100%. Lo que se realiza es un promedio de las áreas obtenidas de todos los tiempos una vez que se ha alcanzado el tiempo mínimo de equilibrio.

Para determinar el efecto relativo se utiliza la ecuación 12 (Fabre, Aubry, & Guichard, 2002):

$$\text{Relación \%} = \frac{\bar{X} \text{ picos de área de la muestra, una vez alcanzado el equilibrio}}{\bar{X} \text{ pico de área del blanco, una vez alcanzado el equilibrio}} \cdot 100 \text{ (Ec.12)}$$

Los resultados obtenidos quedan recogidos en la figura 23.



**FIGURA 23.** Efecto relativo de los distintos polioles en la fuerza de liberación/difusión del 2-feniletanol. Una vez alcanzado el equilibrio.

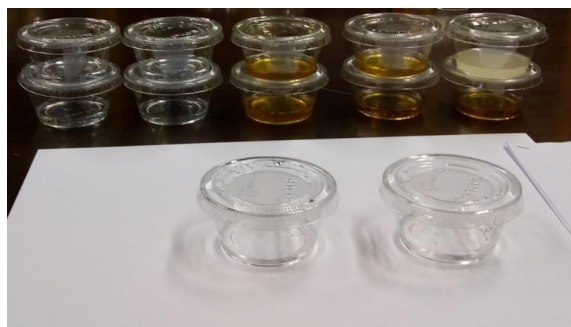
Estos datos indican el efecto producido por el eritritol, manitol y maltitol, sobre el 2-feniletanol, conocido como “salting out”. Esto indica que en solución los distintos polioles modifican la concentración final del espacio de cabeza, favoreciendo el aumento de concentración en la misma. Este fenómeno de aumento de la concentración de 2-feniletanol en el espacio de cabeza, posibilita que durante el consumo de la solución, se favorezca la percepción del 2-feniletanol por vía orthonasal respecto a la retronsal.

## 5.6. Efecto de la adición de aroma en la percepción del dulzor en muestras con eritritol.

### 5.6.1. Pretest

Se realizó un pretest con 3 panelistas especializados para realizar la selección de los aromas a utilizar en el análisis sensorial, en disolución con eritritol (10%, W/W), ver figura 24. Se eligió trabajar con eritritol, ya que según el **Reglamento (UE) 2015/1832**, es el único permitido legalmente en su uso como potenciador del sabor en bebidas refrescantes de valor energético reducido o sin azúcares añadidos.

Se prepararon disoluciones de los siguientes aromas comerciales: mora, melón, fresa, melocotón, mango, trufa, rosas, lavanda, violeta, vainilla y ajo. Se valoró la calidad y la intensidad (concentración) de cada uno de ellos.



**FIGURA 24.** Sesión pretest. Aromas testados.

Los aromas de mora, melón, fresa, melocotón y mango se probaron a concentraciones de 1 ml/l. Se seleccionaron entre ellos fresa, melocotón y mango, dado a su asociación con el dulzor, persistencia moderada e intensidad.

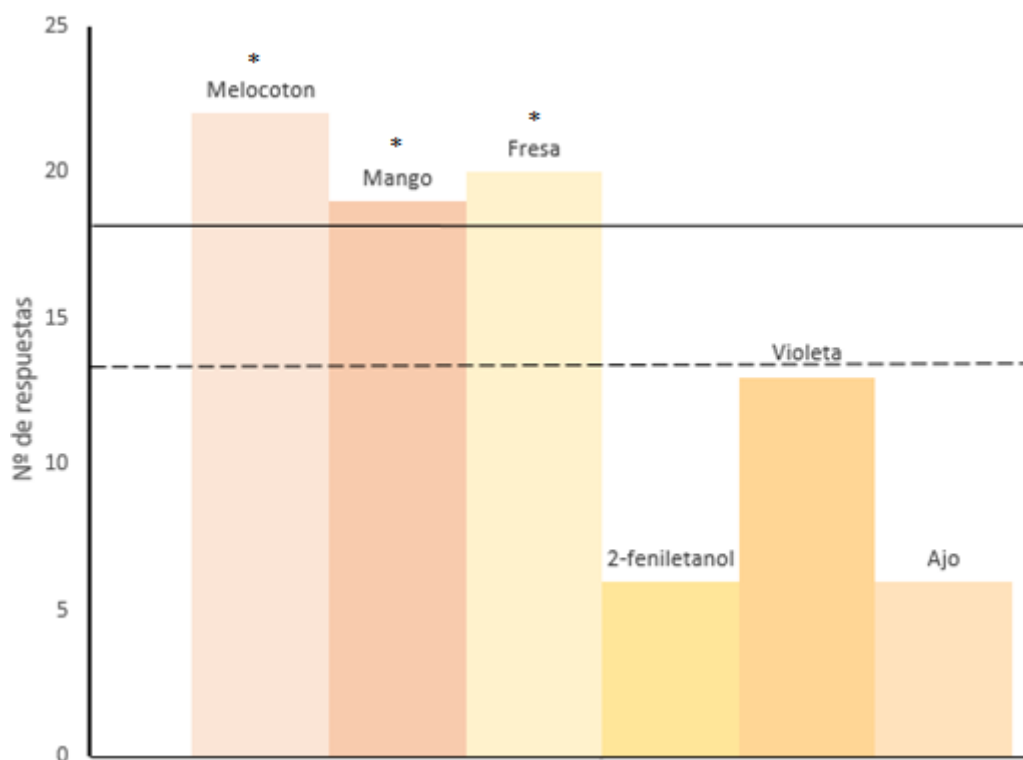
Los aromas de trufa, rosas, lavanda, violeta, vainilla y ajo, se probaron a una concentración del 5%. Entre ellos se eligió violeta, por su semejanza floral al 2-feniletanol estudiado en el TFG, y el ajo, como aroma control. La concentración se redujo al 0,5% en el caso del aroma a violeta y a un 0,05%, para el ajo. Por último, el 2-feniletanol se preparó a 100 ppm, como se realizó en los análisis por HS-SPME-CG.

#### 5.6.2. Análisis sensorial

Este fue realizado por 25 panelistas no entrenados, entre 20-60 años. Se les solicitó que no consumieran bebidas ni comida, ni fumaran 1 hora antes de la cata.

La proporción de panelistas que seleccionaron la muestra que contenía el aroma, con respecto a la muestra de referencia, que no contenía el aroma, fue analizada utilizando un test binomial unilateral, así como realizando una aproximación a través de una distribución normal. Es por ello que, considerando los 25 panelistas, se puede determinar que 13 de los resultados se deben al azar. Para considerar los resultados estadísticamente significantes (nivel de significancia  $p=0,05$ ), es necesario que como mínimo 18 panelistas, escojan la muestra que contiene el aroma (**Bi, 2015**).

En la figura 25, se observa que los aromas de melocotón, mango y fresa aumentan la percepción del dulzor, ya que estadísticamente los resultados son significativos. Además, el aroma a melocotón lo hace con mayor intensidad que el de fresa y el de mango, respectivamente. Por el contrario, el aroma de violeta y 2-feniletanol, que en un principio también eran aromas asociados al dulzor, no presentaron los mismos resultados. El aroma de ajo empleado como control permitió evaluar que la mayoría de los panelistas no lo asociaban al dulzor, por lo que no siempre que los panelistas percibían un aroma inmediatamente lo seleccionaban como dulce.



**FIGURA 25.** Resultados del análisis 2-AFC- En línea discontinua el número de respuestas dadas al azar (13) y en línea continua el número mínimo de respuestas necesarias para considerar significativo el aumento de la percepción del dulzor (18) (\*,  $p < 0,05$ ).

Esto puede deberse a que los aromas frutales se relacionan con el dulzor y permiten un incremento de la percepción, mientras que los aromas florales no se asocian con el dulzor, sino que se asocian generalmente a productos como fragancias y perfumes, o la falta de hábito del consumo de dulces, con sabores y aromas florales. Esto se explica gracias a los conceptos de experiencia previa, memoria y congruencia.

Se conoce que la percepción del sabor es multisensorial, es decir influyen tanto el aroma, el gusto y las sensaciones trigeminales. Es por ello que, a la hora de consumir un alimento, con el conjunto de información que recibimos establecemos una idea, que nos permite identificar una sustancia como un alimento. Estudios de neuroimagen determinan que los aromas (olores percibidos vía retronasal), activan áreas del cerebro donde se procesa la información de contacto oral, como el gusto o el picante. Mientras que los mismos olores por vía orthonasal, no activan estas áreas del cerebro. Es por ello que se pueden asociar aromas a sabores, ya que se activan zonas del cerebro comunes.

Para poder asociar un olor dulce a un gusto dulce, previamente debemos haber consumido un alimento que contenga ambas cualidades. De esta forma gracias a la experiencia previa y repetitiva, nuestro cerebro asocia ese aroma dulce con el gusto dulce, y lo almacena en la memoria. Es por ello que, si hueles dulce, te evoca al sabor dulce con el que lo tienes asociado. Por esta razón, se da la posibilidad de reducir los endulzantes de los alimentos, con el uso de aromas.

Además, la experiencia previa es necesaria para establecer que un olor y un gusto, son congruentes, y que por tanto comparten una propiedad sensorial, como la dulzura. Esta



idea de congruencia puede explicar la no asociación de los aromas florales, con la dulzura en bebidas, ya que generalmente estos olores están asociados a perfumes, flores o plantas (Prescott, 2015).

Además se comprobó la veracidad de los resultados analizándolos a través de una distribución normal:  $Z = \frac{x-n \cdot p_0 - 0,5}{\sqrt{n \cdot p_0(1-p_0)}}$ ; estableciendo como valores críticos 1,65, con  $\alpha=0,05$ . Siendo la X el número de respuestas dadas a la muestra que contiene el aroma, n el número de panelistas y  $p_0$  la probabilidad de error (0,5).

Melocotón  $Z = 3,6 > 1,65$

Fresa  $Z = 2,8 > 1,65$

Mango  $Z = 2,4 > 1,65$

Por lo tanto, los aromas comerciales que contienen más de un compuesto volátil, dada su complejidad, permiten una interacción mayor con el eritritol y producen un aumento de la percepción del dulzor más intensa. Por contra el 2-feniletanol, que únicamente contiene un compuesto volátil, no se comporta de igual forma, y no se puede determinar que favorezca el aumento de la percepción del dulzor.

## 6. CONCLUSIONES

- Se ha optimizado una metodología de HS-SPME-CG, para evaluar la interacción del 2-feniletanol con los polioles: eritritol, manitol y maltitol.
- Las cinéticas de adsorción/absorción permiten establecer el tiempo mínimo necesario para alcanzar el equilibrio entre las tres fases (fibra, espacio de cabeza y solución acuosa) y la velocidad de difusión del 2-feniletanol dependiendo del poliol en la muestra.
- La concentración de 2-feniletanol en el espacio de cabeza es de 30,1, 40,6 y 50,8 ppm, para el eritritol, manitol, maltitol a los 13 minutos de extracción, respectivamente.
- El eritritol, manitol y maltitol ejercen un efecto de “salting out” sobre el 2-feniletanol”. Esto significa que el poliol impulsa al 2-feniletanol, a liberarse al espacio de cabeza, por lo que favorece la percepción por vía orthonasal frente a la percepción retronasal.
- Tanto en las cinéticas de adsorción/absorción, como en la concentración en el espacio cabeza, se observa que conforme aumenta el peso molecular del eritritol, manitol y maltitol ( $P_m=122,12$ ,  $182,17$  y  $344,31$ , respectivamente) la liberación al espacio de cabeza es mayor y más rápida.
- En los ensayos de 2-AFC los aromas de tipo frutal: fresa, melocotón y mango contribuyen significativamente (\*,  $p<0.05$ ) al aumento de la percepción del dulzor del dulzor. Sin embargo, los florales, no contribuyeron al aumento de la percepción del dulzor.
- La combinación de aromas frutales junto con el poliol eritritol podrían contribuir a una disminución del uso de endulzantes en bebidas refrescantes comerciales.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Reglamento (UE) N° 1129/2011 de la comisión, de 11 de noviembre de 2011, por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) N° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo para establecer una lista de aditivos alimentarios de la Unión, Texto pertinente a efectos del EEE. Diario Oficial de la Unión Europea. DO L 295 de 12.11.2011, p. 1-177.

REGLAMENTO (UE) 2015/1832 DE LA COMISIÓN de 12 de octubre de 2015 por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) no 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a la utilización del eritritol (E 968) como potenciador del sabor en bebidas aromatizadas de valor energético reducido o sin azúcares añadidos. Diario Oficial de la Unión Europea. núm. 266, 13.10.2015, p. 27-28.

REGLAMENTO (CE) N° 1924/2006 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 20 de diciembre de 2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos. Diario Oficial de la Unión Europea. OJ L 404, 30.12.2006, p. 9–25.

European Commission. (2006). Regulation (EC) No 1924/2006 of the european parliament and of the council of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods. In <http://data.europa.eu/eli/reg/2006/1924/2012-11-29> (Ed.): 1924/EU.

Real Decreto 650/2011, de 9 de mayo, por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria en materia de bebidas refrescantes. Boletín Oficial del Estado. Madrid, el 9 de mayo de 2011, núm 119, pp 50089 a 50093.

ANFABRA. (2006). El Libro Blanco de las Bebidas Refrescantes. Madrid.

Barba, C., Beno, N., Guichard, E., & Thomas-Danguin, T. (2018). Selecting odorant compounds to enhance sweet flavor perception by gas chromatography/olfactometry-associated taste (GC/O-AT). *Food Chemistry*, 257(October 2017), 172–181.

Bergadà Miró, O. (2007). Diseño de catalizadores para una obtención limpia de 2-feniletanol. Universitat Rovira I Virgili.

Bi, J. (2015). Sensory Discrimination Tests and Measurements. In *Sensory Discrimination Tests and Measurements*.

Biblioteca nacional de medicina de los EE.UU. (2019). Edulcorantes y azúcares. Consultada el 21 de enero de 2019, en <https://medlineplus.gov/spanish/>.

Buettner, A. (Ed.). (2017). *Hanbook of odor*. Freising: Springer.

- E. Guichard. (2015). Interaction of aroma compounds with food matrices. In *Flavour Development, Analysis and Perception in Food and Beverages*, Woodhead Publishing Series in Food science, thechnology and nutrition (pp. 273–295).
- Ebeler, S. E., & Jung, D.-M. (2003). Headspace Solid-Phase Microextraction Method for the Study of the Volatility of Selected Flavor Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 200–205.
- European Commission. (2006). Regulation (EC) No 1924/2006 of the european parliament and of the council of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods.
- Fabre, M., Aubry, V., & Guichard, E. (2002). Comparison of different methods: Static and dynamic headspace and solid-phase microextraction for the measurement of interactions between milk proteins and flavor compounds with an application to emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(6), 1497–1501.
- Fisher, C., & R. Scott, T. (1997). *Food flavours. Biology and Chemistry* (Vol. 91). Newark DE 19716, USA: The Royal Society of chemistry.
- Grembecka, M. (2015). Sugar alcohols—their role in the modern world of sweeteners: a review. *European Food Research and Technology*, 241(1), 1–14.
- Hansch, C. and A. Leo. (1987) *The Log P Database*. Claremont, CA: Pomona College.
- Ibáñez Moya, F. C., Barcina Angulo, Y., & Herrera Marteache, A. (2001). *Análisis sensorial de alimentos: métodos y aplicaciones*. (Barcelona).
- Le Bon, A.M., Tromelin, A., Thomas-Danguin, T., & Briand, L. (2008). Les récepteurs olfactifs et le codage des odeurs. *Cahiers de Nutrition et de Dietetique*, 43(6), 282-288.
- Ministerio de Sanidad, S. S. e I. (2018). *Plan De Colaboración Para La Mejora De La Composición De Los Alimentos Y Bebidas Y Otras Medidas 2017-2020*. Ministerio de Sanidad, Consumo Y Bienestar Social, 83.
- O'Donnell and Kearsley (Ed.). (2012). *Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology*. Wiley- Blackwell.

- Peter Barham, Leif H. Skibsted, Wender L. P. Bredie, Michael Bom Frøst, Per Møller, Jens Risbo, Pia Snitkjær, and Louise Mørch Mortensen (2010). Molecular Gastronomy: A New Emerging Scientific Discipline. *Chem. Rev* (2010) 110, 2313–2365.
- Plaza-Díaz, J., Agustín, O. M., & Hernández, Á. G. (2013). Los alimentos como fuente de mono y disacáridos: Aspectos bioquímicos y metabólicos. *Nutricion Hospitalaria*, 28(SUPPL.4), 5–16.
- Prescott, J. (2015). Multisensory processes in flavour perception and their influence on food choice. *Current Opinion in Food Science*, 3, 47–52.
- Roberts, D. D., Pollien, P., & Milo, C. (2000). Solid-phase microextraction method development for headspace analysis of volatile flavor compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2430–2437.
- Rouseff, L. R. L., & Cadwallader, K. R. (Eds.). (2001). *Headspace Analysis of Foods and Flavors. Theory and Practice*.
- The Coca-Cola Company. (2011). ¿Qué hay dentro de una Coca-Cola?. Documento informativo sobre nuestros ingredientes, 1, 30.
- Thomas-Danguin, T., Sinding, C., Romagny, S., El Mountassir, F., Atanasova, B., Le Berre, E., Le Bon, A.M., & Coureaud G. (2014). The perception of odor objects in everyday life: a review on the processing of odor mixtures. *Frontiers in Psychology*, 5(5).
- Triskelion. Research for better living.. (2019). Volatil Compounds in Food: 2-Phenylethanol. Recuperado de <http://www.vcf-online.nl/VcfCompoundDetails.cfm?volatkey=0208650300>.
- Zhang, Z. Y.; Pawliszyn, J, (1993). Headspace solid-phase microextraction. *Analytical Chemistry*, 65 (14), 1843-1852.