

DEPARTAMENTO DE MEDICINA PREVENTIVA, SALUD  
PÚBLICA, BROMATOLOGÍA, TOXICOLOGÍA Y MEDICINA  
LEGAL

INTERACCIÓN ENTRE COMPUESTOS AROMÁTICOS DEL  
JAMÓN CURADO Y COMPUESTOS PROTEICOS  
MUSCULARES SOLUBLES

MARÍA PÍA GIANELLI BARRA

UNIVERSITAT DE VALENCIA  
Servei de Publicacions  
2004

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 26 d' Abril de 2004 davant un tribunal format per:

- D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> Ángeles Lluch Rodríguez
- D. José Antonio García Regueiro
- D. Jorge Ruiz Carrascal
- D. José Luis Navarro Fabra
- D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> Jesús Lagarda Blanch

Va ser dirigida per:

D. Fidel Toldrà Vilardell

D<sup>a</sup>. Mónica Flores Llovera

©Copyright: Servei de Publicacions  
María Pía Gianelli Barra

---

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-5971-2

Edita: Universitat de València  
Servei de Publicacions  
C/ Artes Gráficas, 13 bajo  
46010 València  
Spain  
Telèfon: 963864115

INTERACCIÓN ENTRE COMPUESTOS AROMÁTICOS DEL JAMÓN  
CURADO Y COMPUESTOS PROTEICOS  
MUSCULARES SOLUBLES

Trabajo realizado por María Pía Gianelli Barra en el Departamento de Ciencia de Alimentos, del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) para optar al grado de Doctor por la Universidad de Valencia.

Valencia, 2004





FIDEL TOLDRÁ VILARDELL, DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS Y PROFESOR DE INVESTIGACION Y MÓNICA FLORES LLOVERA, DOCTORA EN FARMACIA Y CIENTIFICO TITULAR, AMBOS DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS EN EL INSTITUTO DE AGROQUÍMICA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

HACEN CONSTAR: Que el trabajo de Investigación, titulado: “Interacción entre compuestos aromáticos del jamón curado y compuestos proteicos musculares solubles”, realizado por la Licenciada **D. MARÍA PÍA GIANELLI BARRA**, ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Ciencia de Alimentos de este instituto, reuniendo las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor.

En Paterna, a 8 de Enero de 2004

Dr. Fidel Toldrá Vilardell

Dra. Mónica Flores Llovera



*A Miguel  
y a mi hijo*



## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a mis directores de tesis, el Doctor Fidel Toldrá y la Doctora Mónica Flores, por su amistad, confianza, excelente dirección y en su valiosa ayuda en mi formación profesional e investigadora.

Al Doctor José Flores, por darme su amistad y constante apoyo durante mi estadía en el Instituto.

A los compañeros del Laboratorio de Ciencia de la Carne por la amistad y compañía durante la realización de esta tesis, y todas las personas del IATA con quienes compartí durante la realización de esta tesis.

A la Universidad del Bío-Bío y, en forma especial, a la Sra. Nora Plaza por su ayuda constante y preocupación en la finalización de esta tesis.

Al Ministerio de Planificación y Cooperación por la concesión de la Beca Presidente de la República.

Finalmente agradecer al Ministerio de Ciencia y Tecnología la financiación recibida (AGL2001-1141) para la realización de este trabajo.

Y por último, y no por ello en menor grado, a mi familia.

Muchas gracias.



# ÍNDICE

<b>ÍNDICE GENERAL</b>	ix
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	xv
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	xvii
<b>ABREVIATURAS</b>	xix
<b>I.- INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II.- ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS</b>	5
<b>II.1.- Interacción entre compuestos volátiles y proteínas</b>	5
II.1.1.- Importancia de la interacción en la percepción del aroma	6
II.1.2.- Tipos de interacción	8
II.1.3.- Medida de la interacción	9
II.1.4.- Factores que influyen en la interacción	16
II.1.4.1.-Proteínas	16
II.1.4.1.1.- Efecto de la estructura	16
II.1.4.1.2.- Efecto de la proporción entre compuesto volátil y proteína	20
II.1.4.2.- Compuestos volátiles	22
II.1.4.2.1.- Efecto de la longitud de cadena	22
II.1.4.2.2.- Efecto del grupo funcional	23
II.1.4.3.- Efecto del pH	24
II.1.4.4.- Efecto de la fuerza iónica	25
II.1.4.5.- Efecto de la temperatura	26
<b>II.2.- La matriz proteica de la carne</b>	28
II.2.1.- Proteínas miofibrilares	29
II.2.2.- Proteínas sarcoplásmicas	29
II.2.2.1 Mioglobina	29
II.2.3.- Péptidos	31
II.2.3.1.- Carnosina y anserina	31
<b>II.3.- Jamón curado</b>	32
II.3.1.- Tipos	32
II 3.2.- Características sensoriales	33

II.3.3.- Generación del aroma a lo largo del proceso de curado	37
II.3.3.1.- Reacciones químicas responsables del aroma	38
II.3.3.1.1.- Degradación vía Strecker de aminoácidos	39
II.3.3.1.2.- Reacción de Maillard	39
II.3.3.1.3.- Reacción de oxidación de los lípidos	40
II.3.3.1.4.- Degradación de la tiamina	41
II.3.3.2.- Extracción e identificación de los compuestos volátiles responsables del aroma	42
II.3.3.2.1.- Técnicas de extracción	42
II.3.3.2.1.1.- Extracción con disolventes	42
II.3.3.2.1.2.- Destilación simultanea con arrastre de vapor	44
II.3.3.2.1.3.- Extracción con fluidos supercríticos	44
II.3.3.2.1.4.- Extracción del espacio de cabeza	45
II.3.3.3.- Compuestos volátiles aislados en los distintos tipo de jamón curado	48
<b>II.4.- La microextracción en fase sólida (SPME) para el análisis de los compuestos volátiles</b>	<b>65</b>
II.4.1.- Aspectos teóricos de la adsorción de los compuestos volátiles por la fibra de SPME	67
II.4.2.- Optimización de las condiciones de operación	75
II.4.3.- Selección de la fibra de SPME	77
II.4.4.- Factores que afectan a la adsorción de compuestos volátiles por la fibra de SPME	80
II.4.4.1.- Efecto de la fuerza iónica	81
II.4.4.2.- Efecto de la temperatura	82
II.4.4.3.- Efecto de la agitación	83
II.4.5.- Uso de la técnica de SPME en carne y productos cárnicos	83
II.4.6.- Uso de la técnica SPME para el estudio de la interacción entre los compuestos volátiles y las proteínas	84
<b>III.- OBJETIVOS</b>	<b>87</b>
<b>IV.- PLAN DE TRABAJO</b>	<b>89</b>

<b>V.- MATERIALES Y MÉTODOS</b>	91
<b>V.1.- Puesta a punto de la técnica de microextracción en fase sólida (SPME) para el análisis de los compuestos volátiles</b>	91
V.1.1.- Compuesto volátil	91
V.1.2.- Fibra de SPME	91
V.1.3.- Extracción de los compuestos volátiles con la fibra de SPME	92
V.1.4.- Cromatografía de gases	92
V.1.5.- Concentración de compuesto volátil adsorbido por la fibra	93
V.1.6.- Concentración de compuesto volátil en el espacio de cabeza	93
V.1.7.- Posición de la fibra de SPME en el puerto de inyección	94
V.1.8.- Tiempo de desorción de la fibra de SPME	94
<b>V.2.- Optimización de la técnica de microextracción en fase sólida (SPME) para el análisis de los compuestos volátiles presentes en el espacio de cabeza del jamón curado</b>	95
V.2.1.- Preparación de la muestra	95
V.2.2.- Fibra de SPME	95
V.2.3.- Procedimiento	96
V.2.4.- Identificación de los compuestos volátiles	96
V.2.5.- Cuantificación de los compuestos volátiles	97
<b>V.3.- Estudio de la interacción entre los compuestos volátiles y los compuestos proteicos solubles presentes en jamón curado mediante microextracción en fase sólida (SPME)</b>	98
V.3.1.- Optimización de la técnica de SPME para el estudio de la interacción	98
V.3.1.1.- Preparación de la disolución de compuesto volátil	98
V.3.1.2.- Cuantificación de los compuestos volátiles	99
V.3.1.3.- SPME	99
V.3.1.4.- Afinidad de las diferentes fibras	100
V.3.1.5.- Tiempo de equilibrio	100

V.3.1.6.- Linealidad de detección	100
V.3.1.7.- Efecto del pH en la adsorción de la fibra de SPME	101
V.3.1.8.- Efecto de la concentración de cloruro de sodio en la adsorción de la fibra de SPME	102
V.3.1.9.- Coeficiente de partición	102
V.3.1.9.1.- Coeficiente de partición fibra / aire ( $K_1$ )	102
V.3.1.9.1.1.- Cálculo del volumen de la fibra	103
V.3.1.9.2.- Coeficiente de partición aire / agua ( $K_2$ )	104
V.3.2.- Interacción entre compuestos volátiles y proteicos	105
V.3.2.1.- Preparación de las muestras	105
V.3.2.1.1. Disolución de los compuestos proteicos	105
V.3.2.1.1.1.- Análisis de mioglobina	106
V.3.2.1.2.- Disolución de compuesto volátil	107
V.3.2.2.- Efecto del pH	108
V.3.2.3.- Parámetros de interacción	108
V.3.2.3.1.- Preparación de la muestra	108
V.3.2.3.2.- Cálculo de los parámetros de interacción	109
V.3.2.4.- Análisis estadístico	115
<b>V.4.- Estudio del efecto de los agentes de curado en la interacción entre compuestos volátiles y proteicos solubles presentes en el jamón curado</b>	115
V.4.1.- Selección de la concentración de los compuestos volátiles en la disolución	115
V.4.2.- Determinación de los parámetros de operación	116
V.4.2.1.- Disolución de compuesto volátil	116
V.4.2.2.- Fibra de SPME	117
V.4.2.3.- Tiempo de contacto	117
V.4.2.4.- Linealidad de detección de la fibra de SPME	118
V.4.2.5.- Análisis de los compuestos volátiles por cromatografía de gases y cuantificación	118
V.4.3.- Efecto de los agentes de curado en la interacción entre compuestos volátiles y proteicos	119
V.4.3.1.- Preparación de las muestras	119
V.4.3.2.- Interacción entre compuestos volátiles y proteicos en presencia de los agentes de curado	120
V.4.3.3.- Interacción entre compuestos volátiles y proteicos en presencia de mezclas de agentes de curado	120

<b>VI.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	123
<b>VI.1.- Puesta a punto de la técnica de microextracción en fase sólida (SPME) para el análisis de los compuestos volátiles</b>	123
VI.1.1.- Compuesto volátil adsorbido por la fibra	123
VI.1.2.- Compuesto volátil en el espacio de cabeza	124
VI.1.3.- Condiciones de operación	125
<b>VI.2.- Optimización de la técnica de microextracción en fase sólida (SPME) para el análisis de compuestos volátiles presentes en el espacio de cabeza del jamón curado</b>	127
VI.2.1.- Selección de la fibra de SPME	127
VI.2.2.- Identificación y cuantificación de compuestos volátiles	132
<b>VI.3.- Optimización de la técnica de microextracción en fase sólida (SPME) para el estudio de la interacción entre compuestos volátiles y proteicos solubles presentes en jamón curado</b>	141
VI.3.1.- Selección de la fibra de SPME	142
VI.3.2.- Selección del tiempo de contacto de las fibras de SPME	143
VI.3.3.- Determinación del intervalo lineal de detección	147
VI.3.4.- Determinación de los coeficientes de partición	148
<b>VI.4.- Estudio de factores que afectan la adsorción de los compuestos volátiles</b>	152
VI.4.1.- Efecto del pH	152
VI.4.2.- Efecto de la concentración de cloruro sódico	153
<b>VI.5.- Estudio de interacción entre compuestos volátiles y proteicos</b>	155
VI.5.1.- Efecto del pH	155
VI.5.1.1- Efecto del pH en la proporción de mioglobina	158

VI.5.2.- Determinación de los parámetros de interacción	159
<b>VI.6.- Optimización de la técnica de microextracción en fase sólida (SPME) para el estudio del efecto de los agentes de curado en la interacción entre compuestos volátiles y proteicos solubles presentes en jamón</b>	165
VI.6.1.- Selección de la concentración de los compuestos volátiles	165
VI.6.2.- Linealidad de detección	166
<b>VI.7.- Estudio del efecto de los agentes de curado en la interacción entre compuestos volátiles y proteicos</b>	168
VI.7.1.- Estudio del efecto de los agentes de curado en la interacción entre compuestos volátiles y carnosina	168
VI.7.2.- Estudio del efecto de los agentes de curado en la interacción entre compuestos volátiles y la anserina	173
VI.7.3.- Estudio del efecto de los agentes de curado en la interacción entre compuestos volátiles y la mioglobina	177
VI.7.3.1.- Efecto de los agentes de curado sobre los estados de oxidación de la mioglobina	180
<b>VI.8.- Estudio de la interacción entre los compuestos volátiles y proteico en presencia de mezcla de agentes de curado</b>	184
<b>VII.- CONCLUSIONES</b>	189
<b>VIII.- BIBLIOGRAFÍA</b>	191

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura II.1	Número de moles de ligando unidos por mol de proteína en función de la concentración de compuesto volátil libre	11
Figura II.2	Grafica de Scatchard	14
Figura II.3	Grafica de Klotz o de dobles recíprocos	14
Figura II.4	Diagrama de los factores incluidos en la percepción oral de los alimentos	35
Figura II.5	Diagrama de la unidad de SPME	66
Figura II.6	Extracción de compuestos volátiles por la fibra de SPME vía absorción y adsorción	79
Figura VI.1	Efecto de la posición del soporte de SPME en el puerto de inyección sobre el área del compuesto adsorbido	126
Figura VI.2	Cromatogramas obtenidos por CG/MS después de mantener las fibras de SPME (PDMS y PA) durante 5 horas a 30 °C en el espacio de cabeza de jamón curado	128
Figura VI.3	Cromatograma obtenido por CG/MS después de mantener la fibra de SPME (Car/ PDMS) durante 5 horas a 30 °C en el espacio de cabeza de jamón curado	130
Figura VI.4	Cromatograma obtenido por CG/MS después de mantener la fibra de SPME (DBV/ Car/PDMS) durante 5 horas a 30 °C en el espacio de cabeza de jamón curado	131
Figura VI.5	Perfil de adsorción total de los compuestos volátiles con diferentes fibras de SPME (DBV/Car/PDMS y Car/PDMS)	136
Figura VI.6	Perfil de adsorción de varios grupos de compuestos volátiles con diferentes fibras de SPME	137
Figura VI.7	Afinidad de las diferentes fibras	143
Figura VI.8	Efecto del tiempo de contacto en la adsorción del compuesto volátil por la fibra de SPME	144
Figura VI.9	Intervalo lineal de detección	147
Figura VI.10	Efecto del pH en la adsorción de cada compuesto volátil	152
Figura VI.11	Efecto de la concentración de NaCl en la adsorción de cada compuesto volátil	154

Figura VI.12	Efecto del pH en la interacción entre el compuesto volátil y el compuesto proteico	156
Figura VI.13	Número de moles de ligando unido por mol de proteína en función de la concentración molar de ligando libre	160
Figura VI.14	Gráfica de Scatchard	161
Figura VI.15	Intervalo lineal de detección de los compuestos volátiles con la fibra de Car/PDMS	167
Figura VI.16	Efecto de la concentración de NaCl y glucosa sobre el porcentaje de compuesto volátil en presencia de carnosina	169
Figura VI.17	Efecto de la concentración de nitrato, nitrito y ácido ascórbico sobre el porcentaje de compuesto volátil libre en presencia de carnosina	171
Figura VI.18	Efecto de la concentración de NaCl y glucosa sobre el porcentaje de compuesto volátil en presencia de anserina	174
Figura VI.19	Efecto de la concentración de nitrato, nitrito y ácido ascórbico sobre el porcentaje de compuesto volátil libre en presencia de anserina	175
Figura VI.20	Efecto de la concentración de sal y glucosa sobre el porcentaje de compuesto volátil en presencia de mioglobina	178
Figura VI.21	Efecto de la concentración de nitrato, nitrito y ácido ascórbico sobre el porcentaje de compuesto volátil libre en presencia de mioglobina	179
Figura VI.22	Efecto combinado de los agentes de curado sobre los porcentajes de compuesto volátil libre	185

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla II.1	Interacción de proteínas presentes en los alimentos con diversos compuestos volátiles	7
Tabla II.2	Parámetros de interacción reversible entre proteínas y compuestos volátiles	12
Tabla II.3	Condiciones típicas de la fabricación del jamón curado	34
Tabla II.4	Compuestos volátiles identificados en regiones aromáticas activas	36
Tabla II.5	Técnicas empleadas en la extracción de compuestos volátiles en el jamón curado	43
Tabla II.6	Compuestos volátiles detectados en el jamón curado	49
Tabla II.7	Análisis de compuestos volátiles desde el espacio de cabeza de los alimentos utilizando la técnica de SPME	68
Tabla V.1	Condiciones de operación seleccionadas para cada compuesto volátil	101
Tabla V.2	Radio de las fases selectivas de la fibra de SPME	104
Tabla V.3	Condiciones de pH seleccionado para el estudio de interacción entre los compuestos proteicos solubles y los compuestos volátiles.	109
Tabla V.4	Concentración de las disoluciones stock y finales de compuestos volátiles para el estudio del efecto de los agentes de curado	117
Tabla V.5	Combinación de los agentes de curado y pH correspondientes a las distintas etapas de la fabricación de jamón curado	121
Tabla VI.1	Valores de la pendiente que relaciona la cantidad de compuesto volátil (ng) y el área de respuesta del cromatógrafo, y sus respectivos coeficientes de regresión lineal	123
Tabla VI.2	Valores de la pendiente que relaciona el volumen de espacio de cabeza ( $\mu\text{L}$ ) y el área de respuesta del cromatógrafo, y sus respectivos coeficientes de regresión lineal	124
Tabla VI.3	Variación de la desorción de la fibra de SPME con el tiempo de desorción	126

Tabla VI.4	Compuestos volátiles extraídos por las fibras SPME (DVB/Car/PDMS y Car/PDMS) en el espacio de cabeza de jamón curado durante 5 h a 30 °C.	133
Tabla VI.5	Condiciones de operación seleccionadas para cada compuesto volátil	145
Tabla VI.6	Porcentaje del compuesto volátil extraído por la fibra respecto de la cantidad total presente en el vial	146
Tabla VI.7	Coefficiente de partición para cada compuesto volátil	149
Tabla VI.8	Efecto del pH sobre el porcentaje de los tres estados de oxidación de la mioglobina	159
Tabla VI.9	Parámetros de interacción reversible obtenidos a partir de la gráfica de Scatchard	162
Tabla VI.10	Concentración seleccionada de cada compuesto volátil	166
Tabla VI.11	Efecto de los agentes de curado sobre los porcentajes de los tres estados de oxidación de la mioglobina, a pH 6,0	181
Tabla VI.12	Efecto de la mezcla de los agentes de curado sobre los porcentajes de los tres estados de oxidación de la mioglobina, a pH 6,0	184

## ABREVIATURAS

$\ell$	Longitud de la fibra de SPME
$\mu^0_{(T)}$	Potencial químico del compuesto volátil a la presión estándar $P^0$ (usualmente $P^0 = 1 \text{ atm}$ ) y temperatura $T$ ( $^{\circ}\text{K}$ )
$\mu_1$	Potencial químico del compuesto volátil en la fibra
$\mu_2$	Potencial químico del compuesto volátil en la solución acuosa
$\mu_3$	Potencial químico del compuesto volátil en el espacio de cabeza
$\Delta G$	Incremento de energía libre de Gibbs
$\Delta H$	Incremento de entalpía
$\Delta S$	Incremento de entropía
[Met]	Fracción relativa de metamioglobina
[Mio]	Fracción relativa de mioglobina
[Ox]	Fracción relativa de oximioglobina
$A_{AC}$	Área de respuesta mediante SPME de la solución de volátil en presencia de agentes de curado
$A_{AC+P}$	Área de respuesta mediante SPME de la solución de volátil en presencia de agentes de curado y proteínas
$A_D$	Área de respuesta de la disolución inyectada
$A_F$	Área de respuesta obtenida al inyectar la fibra con el compuesto volátil extraído desde el espacio de cabeza
$A_{F50}$	Área de respuesta de la fibra al adsorber el compuesto volátil desde el espacio de cabeza

	cuando la solución contiene 50 ppm
$A_{FX}$	Área de respuesta de la fibra al adsorber el compuesto volátil desde el espacio de cabeza, cuando la solución contiene x ppm
$A_G$	Área de respuesta de la inyección directa de compuesto volátil de un volumen de espacio de cabeza
$A_{G50}$	Área de respuesta de la inyección directa de compuesto volátil de un volumen de espacio de cabeza, cuando la solución contiene 50 ppm de compuesto volátil
$A_T$	Área de respuesta total
$A_{T2}$	Área de respuesta del volumen total de la solución acuosa
$A_{T3}$	Área de respuesta del volumen total del espacio de cabeza
BCH	Hidrocarburo ramificado
BSA	Albúmina de suero bovino
$C$	Concentración de compuesto volátil en el espacio de cabeza de la solución libre de proteína ( $\text{mol L}^{-1}$ )
$C_0$	Concentración de volátil inicial en la solución acuosa
$C_1^\infty$	Concentración en equilibrio de compuesto volátil en la fibra
$C_2^\infty$	Concentración en equilibrio de compuesto volátil en la solución acuosa
$C_3^\infty$	Concentración en equilibrio de volátil en el espacio de cabeza

Car/PDMS	Carboxen /polidimetilsiloxano
CG	Cromatógrafo de gases
$C_{Met}$	Concentración de metamioglobina ( $\text{mmol L}^{-1}$ )
$C_{Mio}$	Concentración de mioglobina ( $\text{mmol L}^{-1}$ )
$C_{Ox}$	Concentración de oximioglobina ( $\text{mmol L}^{-1}$ )
$C_P$	Concentración molar de proteína ( $\text{mol L}^{-1}$ )
$C_T$	Concentración total de mioglobina ( $\text{mmol L}^{-1}$ )
Cw/PDMS	Carbowax/ polidimetilsiloxano
DVB/Car/PDMS	Divinilbenzeno/carboxen en PDMS
FID	Detector de ionización de llama
h	Coefficiente de Hill
I	Porcentaje de interacción
K	Constante intrínseca de unión ( $M^{-1}$ )
$K_1$	Coefficiente de partición entre la fibra de SPME y el aire
$K_2$	Coefficiente de partición entre el aire y la solución acuosa
$K_F$	Constante de Henry del compuesto volátil en la fibra
$K_{\text{fibra-agua}}$	Coefficiente de partición entre la fibra y la solución acuosa
$K_H$	Constante de Henry del compuesto volátil en la solución acuosa
KI	Índice de Kovats
L	Concentración de ligando (compuesto volátil) libre en la solución acuosa (M)
$M_1$	Cantidad de compuesto volátil adsorbida por la fibra

$M_3$	Cantidad total de compuesto volátil presente en el espacio de cabeza
$m_C$	Pendiente de la recta que relaciona la cantidad de compuesto volátil con el área de respuesta
MS	Detector selectivo de espectrometría de masas
$m_V$	Pendiente de la recta que relaciona el volumen del espacio de cabeza del compuesto volátil con el área de respuesta
$n$	Número total de sitios de unión
$N_V$	Número de moles de compuesto volátil en el espacio de cabeza
O	Concentración inicial de compuesto volátil adicionada en la solución ( $\text{mol L}^{-1}$ )
P	Concentración de compuesto volátil en el espacio de cabeza de la solución tampón que contiene proteína ( $\text{mol L}^{-1}$ )
$P^0$	Presión estándar ( $P^0 = 1 \text{ atm}$ )
PA	Poliacrilato
$P_D$	Peso del compuesto volátil en la disolución inyectada
PDMS	Polidimetilsiloxano
PDMS/DVB	Polidimetilsiloxano/divinilbenzeno
PTFE	Politetrafluoretileno (teflón)
$P^V_1$	Presión de vapor del compuesto volátil que está en equilibrio con el compuesto volátil en la fibra
$P^V_2$	Presión de vapor del compuesto volátil que está en equilibrio con el compuesto volátil en la solución acuosa

$P_3^v$	Presión de vapor del compuesto volátil en la fase vapor
R	Constante universal de los gases (J/mol °K)
$r_1$	Radio de la fibra de sílice
$r_2$	Radio de la fase selectiva
RI	Fiabilidad de la Identificación
SPME	Microextracción en fase sólida ( <b>S</b> olid <b>P</b> hase <b>M</b> icro- <b>E</b> xtraction)
T	Temperatura absoluta (°K)
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TIC	Corriente total de iones
$\nu$	Número de moles de ligando (compuesto volátil) unido por mol de proteína
$V_1$	Volumen de la fibra
$V_2$	Volumen de la solución acuosa
$V_3$	Volumen del espacio de cabeza
$V_G$	Volumen del espacio de cabeza inyectado
WOF	“Aroma a recocado”o ( <b>W</b> armed- <b>O</b> ver <b>F</b> lavor)



El desarrollo del aroma en los productos cárnicos es muy complejo, debido al gran número de reacciones involucradas. En general, los compuestos responsables del aroma son el resultado de reacciones químicas y enzimáticas. De hecho, la proteólisis y la lipólisis constituyen las principales reacciones en la generación de compuestos precursores del aroma. Existen además otros factores que influyen en las características del aroma de la carne procesada como las propiedades de la carne propiamente, los aditivos, y las condiciones de procesamiento.

En los productos cárnicos curados se desarrolla una intensa proteólisis y lipólisis que contribuye al desarrollo de la textura, el aroma y el sabor (Toldrá, 1998; Toldrá, 2002). Debido a la necesidad de mejorar la calidad en los productos cárnicos curados, se han realizado gran variedad de estudios sobre la actividad enzimática y su influencia en la generación de los compuestos relacionados con el aroma, el sabor y la textura (Toldrá et al., 1997; Toldrá y Flores, 1998). En este contexto, también resulta de gran importancia conocer los compuestos responsables de las características sensoriales de los productos cárnicos (Flores et al., 1997a; 1997b).

Las proteínas influyen directamente en la textura de forma que una mayor rotura enzimática se corresponde con una mayor ternura, pero también influyen en la percepción del aroma y sabor. Esto último se debe a dos tipos de interacción entre las proteínas y los componentes responsables del aroma: 1.- adsorción física reversible por enlaces de Van der Waals y 2.- reacciones químicas por enlace covalente y/o electrostático (Fischer y Widder, 1997; Leland 1997).

Por tanto, los cambios experimentados por las proteínas durante el proceso de industrialización de la carne y productos cárnicos tienen una gran influencia no solo en la textura sino también en las interacciones con los componentes del aroma y sabor resultando en distintas percepciones sensoriales de los mismos. El conocimiento de los factores que afectan la

interacción entre proteínas y compuestos responsables del aroma es importante para modular dicho aroma y así mejorar las propiedades sensoriales de los productos cárnicos.

La correcta percepción del aroma y sabor de un alimento implica necesariamente la liberación de los compuestos responsables del aroma desde la matriz del alimento durante la ingestión. En este sentido, resulta de gran importancia conocer la interacción entre los compuestos volátiles y las proteínas. Para que una proteína funcione como un buen transportador del aroma debe fijar fuertemente estos compuestos volátiles, retenerlos durante el procesado o durante su generación y liberarlos durante la masticación del alimento en la boca (Lubbers et al., 1998). El perfil de volátiles en cada fase es, en gran parte, dependiente del coeficiente de partición. Por tanto, en la percepción del aroma es fundamental la interacción entre las proteínas presentes en la matriz del alimento y los compuestos volátiles responsables del aroma.

Las técnicas de extracción de los compuestos volátiles desde el espacio de cabeza de los alimentos y su posterior análisis por cromatografía de gases son de gran interés para conocer qué compuestos son los responsables del aroma característico del alimento. Diversas técnicas tales como espacio de cabeza estático, dinámico y, últimamente, la microextracción en fase sólida (SPME), han sido empleadas en el estudio de la composición de los compuestos volátiles.

Las principales ventajas de la microextracción en fase sólida son la ausencia de solvente, su rapidez y menor coste de análisis. Además, permite la concentración de los compuestos volátiles del espacio de cabeza en la fibra, permitiendo su análisis, a pesar de que se encuentren a muy baja concentración en el alimento.

Es importante destacar que en la actualidad apenas existen estudios sobre la interacción entre la matriz proteica de la carne y los compuestos

responsables del aroma. Por ello, resulta de gran interés estudiar la interacción entre la matriz proteica de jamón curado y los componentes responsables del aroma, mediante el empleo de la técnica de microextracción en fase sólida, con el fin de estudiar los factores que afectan la percepción del aroma del jamón curado.



## **I.1.- INTERACCIÓN ENTRE COMPUESTOS VOLÁTILES Y PROTEÍNAS**

Las proteínas presentan una estructura tridimensional que se encuentra estabilizada por enlaces covalentes y no covalentes. Los aminoácidos hidrofóbicos están localizados en el interior de la molécula (Fischer y Widder, 1997), mientras que diversos aminoácidos polares se encuentran en la superficie de la misma. Esta estructura hidrofílica e hidrofóbica determina las características físicas y funcionales de las proteínas. La estructura de la proteína no es rígida y la intensidad de la unión depende de la naturaleza de la proteína, condiciones del medio, pH, fuerza iónica y temperatura. Por tanto, los cambios experimentados por las proteínas durante el proceso de industrialización tienen una gran influencia no solo en la textura sino también en las interacciones con los componentes del aroma y sabor dando como resultado una percepción sensorial característica (Lubbers et al., 1998).

La región interna, más bien hidrofóbica, puede constituir el principal sitio de unión de los ligandos apolares. En los alimentos con un elevado contenido de agua, los mecanismos de fijación de compuestos volátiles implican, principalmente, la interacción de compuestos volátiles apolares con zonas o cavidades hidrofóbicas de la superficie de las moléculas de la proteína (Fennema, 2000). Además, la interacción hidrofóbica de estos compuestos, que tienen en sus extremos grupos polares, tales como grupos hidroxilo y carboxilo, puede fijar las proteínas vía formación de puentes de hidrógeno o por interacciones electrostáticas. Por ejemplo, los compuestos volátiles como los aldehídos y cetonas pueden difundir al interior hidrofóbico de la molécula de proteína tras su fijación a las regiones hidrófobas de la superficie (Fennema, 2000).

### **II.1.1.- Importancia de la interacción en la percepción del aroma**

Las proteínas pueden fijar los compuestos responsables del aroma, afectando así a las propiedades sensoriales de los alimentos (Taylor, 1996). La correcta percepción del aroma y sabor de un alimento implica la necesaria liberación de los compuestos responsables desde la matriz del alimento durante la ingestión y, en este aspecto, juega una gran importancia las interacciones entre los compuestos volátiles y las proteínas. La fijación de estos compuestos volátiles por las proteínas resulta a veces deseable, ya que permite utilizar las proteínas como transportadores de aromas o modificadores del aroma y sabor de los alimentos. Para que una proteína funcione como un buen transportador del aroma y sabor debe fijar estos compuestos fuertemente, retenerlos durante el procesado y liberarlos durante el proceso de masticación del alimento en la boca (Lubbers et al., 1998). Sin embargo, en algunos casos las proteínas arrastran consigo algunos compuestos volátiles responsables de aromas indeseables, que limitan la utilización de concentrados proteicos en productos alimenticios. Estos compuestos son fundamentalmente aldehídos, cetonas y alcoholes generados durante la oxidación de ácidos grasos insaturados (Kinsella, 1978; Damodaran y Kinsella 1980).

Los estudios de interacción entre proteínas y compuestos volátiles se muestran en la tabla II.1. La mayoría de estos estudios se han realizado con proteínas como la caseína (Le Thanh et al., 1992; Landy et al., 1995) y la  $\beta$ -lactoglobulina, debido a su importancia en la industria láctea (O'Neil y Kinsella, 1987; Dufour y Haertlé, 1990; Pelletier et al., 1998; Guichard y Langourieux, 2000; Fabre et al., 2002). Otros estudios incluyen la proteína de soja debido a su extendido uso como ingrediente funcional en los alimentos (Damodaran y Kinsella, 1981a; 1981b; O'Keefe et al., 1991a); sin

**Tabla II.1.-** Interacción de proteínas presentes en los alimentos con diversos compuestos volátiles.

Proteína	Compuesto volátil	Referencia
Gelatina	acetona 2-butanona 2-pentanona 2-heptanona	Nowar (1971)
$\alpha$ -lactoalbúmina Albumina de suero bovino	hexanal octanal 2-hexanona 2-heptanona 2-octanona	Franzen y Kinsella (1974)
Fracciones de proteína de soja	2-nonanona	Damodaran y Kinsella (1981b)
$\beta$ -lactoglobulina	2- heptanona 2-octanona 2-nonanona	O’Niel y Kinsella (1987) Andriot et al. (2000)
$\beta$ -lactoglobulina	ésteres ácidos pirazinas	Pelletier et al. (1998)
$\beta$ -lactoglobulina	2-nonanona	O’Neil y Kinsella (1988)
Proteína de soja	n-butanol n-hexanol	Chung y Villota (1989)
$\beta$ -lactoglobulina	2-heptanona 2-octanona 2-nonanona etil hexanoato etil octanoato etil nonanoato isoamil acetato limoneno mirceno	Jouenne y Crouzet (2000)
Caseinato sódico	diacetilo etil acetato etil butanoato etil hexanoato	Landy et al. (1995)
Ovoalbúmina	disulfuros	Adams et al. (2001)

**Tabla II.1.-** (Continuación)

Proteína	Compuesto volátil	Referencia
$\beta$ -lactoglobulina	d-linalol 2-nonanona benzaldehido isoamil acetato	Seuvre et al. (2001)
Proteínas de leche	diacetil etil butanoato Metil hexanoato etil hexanoato hexenol $\gamma$ -octalactona	Fabre et al. (2002)
$\beta$ -lactoglobulina	aldehídos ésteres alcoholes	van Ruth y Villeneuve (2002)
Miofibrillas de pollo	hexanal	Goodridge et al. (2003)

embargo, la utilización de esta proteína está limitada por los problemas de aroma y sabor producidos por los compuestos volátiles generados por oxidación de los lípidos insaturados presentes en el frejol de soja. Estos compuestos se encuentran asociados a las proteínas y no son completamente eliminados con las técnicas empleadas en la producción de concentrados proteicos (Kinsella, 1978; Damodaran y Kinsella, 1980; 1981a). Por tanto, permanecen en el producto final limitando la aceptación por el consumidor de los productos alimentarios que contengan estos concentrados proteicos.

### II.1.2.- Tipos de interacción

La interacción se define como la unión molecular existente entre un compuesto volátil y una proteína. En términos microscópicos es posible definir la interacción en función de las constantes termodinámicas de

equilibrio con la contribución de las propiedades fisicoquímicas, es decir, volatilidad y solubilidad de los compuestos volátiles (Lubbers et al., 1998).

La interacción entre los compuestos volátiles y las proteínas es uno de los factores determinantes en la percepción y realce del aroma y sabor. Existen dos tipos de interacción entre las proteínas y los componentes responsables del aroma y sabor: (i) adsorción física reversible por enlaces de Van der Waals y (ii) reacciones químicas por enlace covalente y/o electrostático. En el primer caso, las fuerzas de interacción son relativamente débiles, mientras que en el segundo, se forman fuertes enlaces químicos tales como sales, amidas, ésteres y condensación de aldehídos con grupos amina y sulfhidrilo (Fischer y Widder, 1997; Leland, 1997).

La fijación de un compuesto volátil es el resultado de varios procesos de unión entre los componentes de los alimentos: (i) Unión covalente e irreversible, que es el caso de fijación de aldehídos y cetonas a los grupos amino de las proteínas, (ii) Puentes de hidrógeno entre proteínas y sustancias volátiles polares como los alcoholes, y (iii) Unión hidrofóbica entre compuestos volátiles apolares y proteínas (Le Thanh et al., 1992). Especial atención tienen los aldehídos que pueden interaccionar con las proteínas de forma reversible mediante fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno, e irreversiblemente formando enlaces covalentes con los grupos amino presentes en las proteínas (Plug y Haring, 1993).

### **II.1.3.- Medida de la interacción**

Es importante conocer cómo interaccionan las proteínas y los compuestos responsables del aroma y sabor en condiciones de equilibrio. La fijación no covalente y reversible de compuestos responsables del aroma y sabor con las proteínas sigue la ecuación de Scatchard (Scatchard, 1949)

(Ec.1). Esta ecuación, expresada en la forma de dobles recíprocos, es denominada ecuación de Klotz (Ec.2).

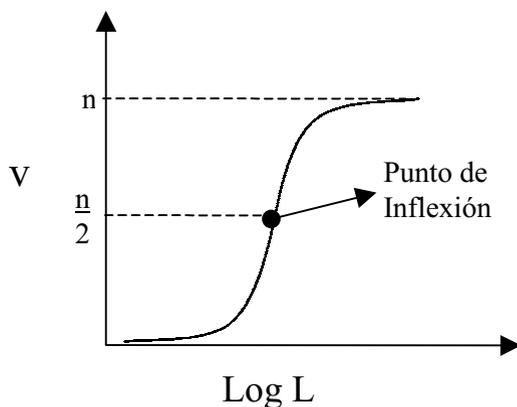
$$v/L = nK - vK \quad \text{Ec.1}$$

$$1/v = 1/n + 1/nKL \quad \text{Ec.2}$$

donde:

- v: Número de moles de ligando (compuesto volátil) unido por mol de proteína
- L: Concentración de ligando (compuesto volátil) libre en la solución acuosa (M)
- n: Número total de sitios de unión
- K: Constante intrínseca de unión ( $M^{-1}$ )

Para medir el efecto de la interacción con los compuestos volátiles, se deben cumplir algunos requisitos para que el ajuste de los datos a la ecuación de Scatchard ((Ec.1) sea válido (Klotz, 1982). Para ello, se representa (ver figura II.1) el número de moles de ligando unido por mol de proteína (v) en función del logaritmo de la concentración de compuesto volátil libre (log L). En esta gráfica debe existir un punto de inflexión a la mitad del valor del número de sitios de unión, es decir, en  $n/2$ . Además, la curva debe ser sigmoideal y simétrica respecto del punto de inflexión y, por último, a medida que la concentración de ligando libre aumenta el valor del número de moles de ligando unido por mol de proteína se aproxima asintóticamente al valor del número de sitios de unión.



**Figura II.1.-** Número de moles de ligando unidos por mol de proteína en función de la concentración de compuesto volátil libre.

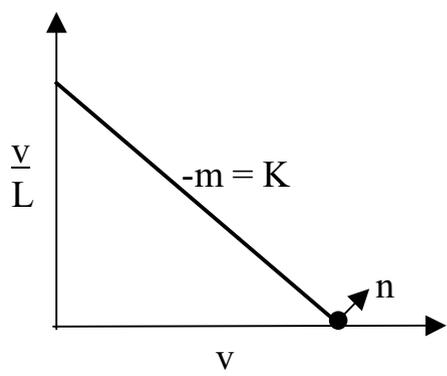
Los parámetros obtenidos del estudio de interacción entre proteínas y compuestos volátiles como las constantes de equilibrio, número de sitios de unión y energía libre se muestran en la tabla II.2. Para medir el grado de interacción se encuentra el número de sitios de unión y la constante de afinidad ( $K$ ), que indica la fuerza de la interacción. Estos valores se pueden obtener de la ecuación 1 (Ec.1), al representar (ver figura II.2), el cociente entre el número de moles de ligando (compuesto volátil) unido por mol y la concentración de ligando (compuesto volátil) libre en la solución acuosa ( $v/L$ ) en función del número de moles de ligando unido por mol de proteína ( $v$ ). Se obtiene una línea recta, donde la constante intrínseca de unión ( $K$ ) es la pendiente y la intersección con la abscisa es el número de sitios de unión ( $n$ )

Tabla II.2.- Parámetros de interacción reversible entre proteínas y compuestos volátiles

Proteína	Compuesto volátil	Concentración de NaCl (M)	Número de Sitios (n)	Parámetros de Constante K (M <sup>-1</sup> )	ΔG (kJ/mol)	Referencia
Actomiosina de pescado	2-octanona	0,15		110	-11,8	Damodaran y Kinsella (1983)
	2-nonanona	0,15	50	600	-16,1	
	2-nonanona	0,60	13	386	-15,0	
Albumina de suero bovino	2-heptanona	0,15	5-6	270	-14,1	Damodaran y Kinsella (1980)
	2-nonanona	0,15	5-6	1800	-18,8	
β-Lactoglobulina	2-heptanona	--	1	152	-12,6	O'Neil y Kinsella (1987)
	2-octanona	--	1	481	-15,5	
	2-nonanona	--	1	2439	-19,6	
	vainillina	--	28	106	-11,7	
Micelas proteicas de haba						Ng et al. (1989)
Proteína de soja	2-heptanona	--	4	110	-11,8	Damodaran y Kinsella (1981a)
	2-octanona	--	4	310	-14,5	
	5-octanona	--	4	541	-15,8	
	2-nonanona	--	4	930	-17,2	
	nonanal	--	4	1094	-17,6	
Proteína de soja	2-nonanona	--	4	1240	-17,9	Damodaran y Kinsella (1981b)
Glicina de soja	butanal	--	171	44	-9,3	O'Keefe et al. (1991a)
	pentanal	--	193	119	-11,7	
	hexanal	--	108	455	-15,4	
	octanal	--	66	902	-17,1	
	2-hexanona	--	67	500	-15,6	

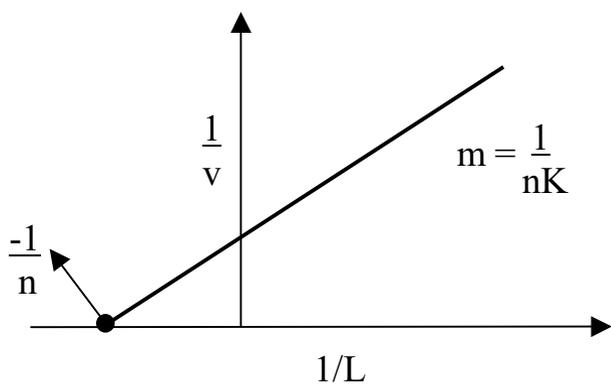
Tabla II.2.- (Continuación)

Proteína	Compuesto volátil	Concentración de NaCl (M)	Número de Sitios (n)	Parámetros de unión Constante K (M <sup>-1</sup> )	ΔG (kJ/mol)	Referencia
Glicina de soja	3-hexanona	--	60	357	-14,8	O'Keefe et al. (1991a)
	2-nonanona	--	96	1000	-17,4	
	5-nonanona	--	65	769	-16,7	
	hexenol	--	42	344	-14,7	
Glicina de soja	hexanal	--	84	483	-15,5	O'Keefe et al. (1991b)
	hexanal	0,50	43	172	-12,9	
β-Conglicina de soja	butanal	--	21	18	-7,3	O'Keefe et al. (1991a)
	pentanal	--	49	149	-12,6	
	hexanal	--	26	303	-14,4	
	octanal	--	59	588	-16,1	
	2-hexanona	--	38	476	-15,5	
	3-hexanona	--	22	217	-13,5	
	2 nonanona	--	30	303	-14,4	
	5-nonanona	--	20	396	-15,1	
	hexenol	--	10	131	-12,3	
	hexanal	--	23	1437	-18,3	O'Keefe et al. (1991b)
β-Conglicina de soja	hexanal	0,50	26	1431	-18,3	
	etil butanoato	--	11	66	-10,5	Landy et al. (1995)
Caseína	etil hexanoato	--	3	2500	-19,5	



**Figura II.2.-** Grafica de Scatchard.

También es posible obtener las constantes de interacción entre compuestos volátiles y proteínas mediante la ecuación de Klotz o de dobles recíprocos (Ec.2). Estas constantes se obtienen al representar el inverso del número de moles de ligando unido por mol de proteína ( $1/v$ ) en función del inverso de la concentración de ligando (compuesto volátil) libre en la solución sin proteína ( $1/L$ ). Se obtiene una línea recta (ver figura II.3), donde la pendiente es el inverso del número de sitios de unión por la constante intrínseca de unión ( $1/nK$ ) y la intersección con la abscisa es el inverso del número de sitios de unión ( $1/n$ ).



**Figura II.3.-** Grafica de Klotz o de dobles recíprocos.

Sin embargo, en algunos casos la unión de un compuesto volátil modifica la unión a los centros de unión (Landy et al., 1995). Esta unión corresponde a un mecanismo de cooperación entre los sitios. En este caso de cooperación, la interacción entre ligando y proteína puede ser representada por la ecuación de Hill (Hill, 1910):

$$1/v = n / \left( \left( 1 / (KL)^h \right) + 1 \right) \quad \text{Ec.3}$$

donde:

h: Coeficiente de Hill

El coeficiente de Hill refleja la cooperación entre los sitios. La ecuación de dobles recíprocos se utiliza para determinar los parámetros de la interacción (n, K, h).

Es posible obtener el valor del cambio de la energía libre de Gibbs para el proceso de interacción entre compuestos volátiles y proteínas (Ec.4). Esta ecuación de energía es:

$$\Delta G = -RT \ln K \quad \text{Ec.4}$$

donde:

R: Constante universal de los gases (J/mol °K)

T: Temperatura absoluta (°K)

Los cambios en la entalpía ( $\Delta H$ ), son despreciables en los procesos de unión entre proteínas y compuestos volátiles. En termodinámica clásica encontramos que  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ . Si el cambio de entalpía ( $\Delta H$ ) es muy pequeño, los cambios de energía libre ( $\Delta G$ ) son debidos a un incremento en la entropía ( $\Delta S$ ) del sistema (Castellan, 1987). El cambio positivo de

entropía puede ser debido a cambios estructurales en el solvente cuando la interacción soluto-solvente es remplazada por la interacción soluto-soluto, generando posiblemente una desorientación y desplegamiento de la molécula de proteína (Damodaran y Kinsella, 1980).

#### **II.1.4.- Factores que influyen en la interacción**

La estructura y características físicas de la proteína están determinadas por la distribución específica de regiones hidrofílicas e hidrofóbicas presentes en ella. Existen factores presentes en los alimentos o en sistemas modelo tales como, la fuerza iónica del medio, pH y temperatura que pueden modificar la configuración de la proteína. Estos factores modifican la estructura específica de la proteína y, por tanto, también modifican la interacción entre las proteínas y los compuestos volátiles.

##### **II.1.4.1.- Proteínas**

###### **II.1.4.1.1.- Efecto de la estructura**

El efecto de la estructura de la proteína sobre la interacción con los compuestos volátiles ha sido estudiado por Damodaran y Kinsella (1980) en la proteína de albúmina de suero bovino (BSA). Los puentes disulfuro son parcialmente responsables de la estructura nativa de BSA. La reducción de estos puentes por acción de agentes como el tior, altera la conformación de la proteína y, en consecuencia, se produce una modificación en la estructura de BSA. Durante el estudio de la interacción entre dicha proteína y determinados compuestos volátiles, como la 2-nonanona, se observa un importante cambio en la gráfica de Scatchard por efecto del tior, ya que cambia la afinidad por los sitios de unión con 2-nonanona.

El efecto de la estructura de los aminoácidos y péptidos es muy importante ya que afecta a la interacción entre compuestos volátiles y proteínas. Zhou y Decker (1999a y 1999b) han estudiado la interacción entre los aminoácidos y dipéptidos presentes en el músculo, y los compuestos aldehídos generados durante la oxidación lipídica. La interacción entre histidina y lisina con *trans*-2-hexenal es mayor que la encontrada con otros aminoácidos como  $\beta$ -alanina, glicina, L-alanina, ácido  $\gamma$ -amino butírico y L-valina. Esto indica que el grupo  $\alpha$ -amino no reacciona fuertemente con el grupo  $\alpha$ ,  $\beta$ -carbonilo de los aldehídos insaturados (Zhou y Decker, 1999a). Sin embargo, en estudios de interacción entre hexenal y varios aminoácidos (L-alanina,  $\beta$ -alanina, ácido  $\gamma$ -amino butírico, glicina, L-histidina, DL-lisina, L-valina) (Zhou y Decker, 1999b), se observa que solo existe una reducción de la concentración de hexenal en el espacio de cabeza en presencia de histidina. Esto indica que los grupos amino  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  de los aminoácidos no afectan a la interacción con el grupo carbonilo del hexenal. Por otra parte, se ha estudiado la interacción entre *trans*-2-hexenal, histidina e imidazol (Zhou y Decker, 1999a). La concentración en el espacio de cabeza de *trans*-2-hexenal en presencia de cada uno de estos compuestos disminuye un 8%, lo cual sugiere que el sitio de reacción principal de la histidina es el grupo amino del anillo de imidazol y no el grupo  $\alpha$ -amino. Además, en la interacción entre *trans*-2-hexenal y los siguientes dipéptidos que contienen histidina: glicina-histidina, leucina-histidina, valina-histidina, carnosina ( $\beta$ -alanina-histidina) e isoleucina-histidina se observa que disminuye la concentración en el espacio de cabeza en un 75,5%, 62,1%, 59%, 56%, y 54,4%, respectivamente. Sin embargo, la interacción de *trans*-2-hexenal e histidina es menor que la observada con los dipéptidos que contienen este aminoácido. Esta mayor disminución del porcentaje de *trans*-2-hexenal en el espacio de cabeza en presencia de los dipéptidos respecto de la histidina, se

puede deber a un aumento de la reactividad del grupo amino del enlace peptídico. Este aumento de la reactividad también se pone de manifiesto en los dipéptidos que no contienen histidina, donde la reactividad de los dipéptidos es mayor que la encontrada con cada aminoácido de forma individual (Zhou y Decker, 1999a).

En el estudio de la interacción de hexanal con dipéptidos que contienen un grupo amino libre en la posición “ $\alpha$ ” (alanina-glicina, glicina-alanina y leucina-glicina), la concentración en el espacio de cabeza de hexanal disminuye entre un 4 y 5%, lo cuál indica también que el enlace peptídico incrementa la reactividad de grupo  $\alpha$ -amino (Zhou y Decker, 1999b). Estos autores estudian también el efecto del grupo  $\beta$ -amino libre del dipéptido  $\beta$ -alanina- $\beta$ -alanina. Este dipéptido no tiene ningún efecto sobre la concentración de hexanal en el espacio de cabeza, lo que sugiere que la influencia de la unión peptídica no puede ser ampliada al grupo  $\beta$ -amino libre.

También se observa que a medida que aumenta el número de carbonos en la cadena del aminoácido la interacción aumenta. Así, la interacción entre hexanal y los dipéptidos leucina-histidina, valina-histidina, alanina-histidina, y glicina-histidina reduce la concentración de hexanal en el espacio de cabeza en un 17,8%, 9,6%, 8,4% y 7%, respectivamente (Zhou y Decker, 1999b). Por tanto, la longitud de la cadena del aminoácido que acompaña a la histidina en dipéptidos tendría un efecto positivo en la interacción.

Los mismos autores observan que la histidina interacciona débilmente con el hexanal ya que la presencia de este aminoácido solo reduce un 2% la concentración de hexanal en el espacio de cabeza. Sin embargo, dipéptidos que contienen histidina con el grupo  $\alpha$ -amino libre, como alanina-histidina y leucina-histidina, reducen la concentración de

hexanal en el espacio de cabeza en un 7% y 19,7% respectivamente. Cuando estudian la interacción de hexanal con carnosina y homocarnosina, con su grupo amino libre en la posición  $\beta$  ( $\beta$ -alanina) o en la posición  $\gamma$  (GABA) respectivamente, el porcentaje de reducción de la concentración de hexanal en el espacio de cabeza es similar a la reducción de porcentaje obtenido con histidina. Esto sugiere, una vez más, que el sitio de unión principal de la histidina es el grupo amino del anillo de imidazol y no los grupos  $\beta$  o  $\gamma$  amino libres presentes en los dipéptidos, tal y como lo indicaron con anterioridad en el estudio de interacción entre *trans*-2-hexenal e histidina (Zhou y Decker, 1999a).

Por otra parte, cuando se estudia la interacción entre hexanal y los dipéptidos leucina-histidina y isoleucina-histidina, se observa que en presencia de isoleucina-histidina el porcentaje de hexanal en el espacio de cabeza es mayor que el obtenido al interaccionar con leucina-histidina. Es decir, la leucina-histidina tiene mayor afinidad por el hexanal que la isoleucina-histidina. Esto indicaría que el grupo metilo en el primer carbono de la cadena tiene menor impacto en la unión de hexanal que cuando el grupo metilo está en el segundo carbono de la cadena (Zhou y Decker, 1999b). Sin embargo, en la interacción de estos dipéptidos con *trans*-2-hexenal se observa el efecto contrario, es decir, la isoleucina-histidina tiene mayor afinidad por *trans*-2-hexenal que la leucina-histidina (Zhou y Decker, 1999a).

Los resultados de la interacción hidrofóbica entre ligando y proteína dependen tanto de la compatibilidad estérica como de la hidrofobicidad de los sitios de unión (Damodaran y Kinsella, 1980). Por lo tanto, cualquier cambio del estado estructural de los sitios de unión debería afectar a la interacción hidrofóbica entre el ligando y la proteína. Los cambios estructurales en la proteína pueden ser inducidos por la presencia de urea. El efecto de la urea en la interacción entre 2-nonanona y proteína de soja ha

sido estudiado por Damodaran y Kinsella (1981b) quienes observan una disminución de la constante de afinidad al aumentar la concentración de urea, principalmente causado por cambios en la estructura de la proteína en presencia de urea. La proteína de soja presenta un máximo de fluorescencia a 337 nm, y se debe principalmente a los restos de triptófano presentes. La intensidad de la fluorescencia disminuye cuando la concentración de urea aumenta hasta 4M, pero cuando la concentración de urea excede una concentración 4M, comienza a aumentar la intensidad de la fluorescencia. El mayor cambio estructural ocurre cuando se alcanza una concentración 4M de urea, debido a la disociación de las subunidades que constituyen la proteína de soja. Sin embargo, el desdoblamiento de las subunidades ocurre cuando se alcanza una concentración 5M de urea (Damodaran y Kinsella, 1981b).

O'Neil y Kinsella (1987) también han estudiado el efecto de la concentración de urea en la interacción entre la  $\beta$ -lactoglobulina y la 2-nonanona. Al desnaturalizar la proteína con urea, se despliega la estructura terciaria de la proteína, de tal modo que alteran las regiones hidrofóbicas de la estructura y, por tanto, los sitios de unión hidrofóbicos. Al aumentar la concentración de urea, disminuye la constante de afinidad entre la  $\beta$ -lactoglobulina y la 2-nonanona aunque el número de sitios de unión permanece constante. Esto indica que la molécula de  $\beta$ -lactoglobulina se despliega parcialmente en presencia de urea, pero no destruye los sitios de unión iniciales. No obstante, reduce la hidrofobicidad de la región de unión lo que genera una disminución en la afinidad.

#### **II.1.4.1.2.- Efecto de la proporción entre compuesto volátil y proteína**

Cuando interaccionan las proteínas con compuestos volátiles, pueden existir cambios en la estructura proteica como consecuencia del comportamiento cooperativo, de manera que la unión del ligando altera la

conformación de la proteína (Landy et al., 1995). En un estudio de interacción entre la 2-nonanona y la albúmina de suero bovino (BSA), se han detectado cambios en la adsorción UV y en la fluorescencia al incrementar la razón molar de la 2-nonanona, lo cual indica cambios en la estructura de BSA cuando interacciona con la 2-nonanona (Damodaran y Kinsella, 1980).

Landy et al. (1995) han estudiado la interacción en soluciones de caseinato sódico con cetonas y ésteres. Los resultados indican que la adición de una pequeña concentración de proteína produce una disminución en la volatilidad relativa, es decir, existe menos compuesto volátil en la fase vapor, lo que indica que existe interacción. Esto se refleja como un incremento en la retención de los compuestos volátiles, debido a la presencia de diferentes sitios de unión, en particular en los sitios de afinidad hidrofóbica. Al aumentar la concentración de la proteína se observa una disminución en la volatilidad relativa y un aumento del porcentaje de compuesto volátil retenido por la caseína. Además, al aumentar la concentración de proteína disminuye progresivamente el número de sitios disponibles para la unión, indicando que el aumento de la concentración de proteína influye de manera importante en la interacción proteína-proteína y, por tanto, el ligando interacciona más con un menor número de sitios. Este mismo efecto de la concentración de proteína ya es detectado por Ng et al. (1989) cuando estudian la interacción de vainillina y una proteína micelar de haba.

Recientemente, Goodridge et al. (2003) han estudiado la interacción de miofibrillas de pollo con el hexanal. Los resultados indican que las miofibrillas interaccionan con hexanal, aunque el porcentaje de hexanal unido por la proteína es menor cuando la concentración de hexanal aumenta. En este trabajo, la concentración de proteína es constante, de manera que el número de sitios de unión para el hexanal se encuentra limitado por la

concentración de proteína, es decir, al aumentar la concentración de hexanal se produce una saturación de los sitios de unión.

#### **II.1.4.2.- Compuestos volátiles**

La volatilidad de los compuestos responsables del aroma depende de su estructura química (Buttery et al., 1971), pero esta volatilidad cambia en presencia de las proteínas dependiendo de la naturaleza del compuesto volátil y de la proteína. Compuestos volátiles tales como: cetonas, alcoholes, aminas, ácidos carboxílicos, ésteres, se pueden unir reversiblemente a las proteínas mediante interacciones hidrofóbicas y, su mayor o menor afinidad a la proteína dependerá de su polaridad (Lubbers et al., 1998).

##### **II.1.4.2.1.- Efecto de la longitud de cadena**

El efecto de la longitud de la cadena del compuesto volátil también tiene un efecto importante en su interacción con las proteínas. En un estudio de interacción realizado entre cetonas y la actomiosina de pescado (Damodaran y Kinsella, 1983), se observa que la constante de afinidad aumentaba alrededor de 5 veces por cada grupo metilo de aumento en la longitud de la cadena de las cetonas. Estos resultados son diferentes a los obtenidos con proteína de soja (Damodaran y Kinsella, 1981a) y BSA (Damodaran y Kinsella, 1980), en los cuales la constante de afinidad aumentaba 3 veces con cada grupo metilo que aumenta la longitud de cadena de las cetonas. La diferencia de estos resultados se atribuye a que en el primer caso las experiencias son realizadas con actomiosina de pescado en suspensión mientras que las otras dos experiencias son realizadas con la proteína en solución (Damodaran y Kinsella, 1983). En estos estudios se

observa que la naturaleza de la interacción es hidrofóbica ya que la constante de afinidad aumenta con la hidrofobicidad de la cadena de las cetonas.

Por otra parte, los estudios de interacción realizados con  $\beta$ -lactoglobulina y cetonas, indican que el número de sitios de unión para las tres cetonas estudiadas es el mismo, aumentando la constante de afinidad con la longitud de la cadena (O'Neil y Kinsella, 1987). El incremento en la constante de afinidad es de 3 veces cuando la cadena incrementa un grupo metilo desde 2-heptanona a 2-octanona y alrededor de 5 veces cuando la cadena aumenta en un grupo metilo desde 2-octanona a 2-nonanona. Así pues, la interacción entre proteína y compuesto volátil se ve favorecida por la adición de estos grupos (O'Neill y Kinsella, 1987).

#### **II.1.4.2.2.- Efecto del grupo funcional**

El efecto de los grupos funcionales presentes en el compuesto volátil en su interacción con las proteínas es importante. Así, el efecto que tiene la posición del grupo ceto en la cadena del compuesto volátil en la interacción con BSA, así como en la constante de afinidad ha sido estudiado por Damodaran y Kinsella (1980). La constante de afinidad en la interacción entre nonanal y BSA es mayor que la constante de afinidad en la interacción entre 2-nonanona y BSA. Esta diferencia se debe a la posición del grupo ceto en la cadena. En el caso de la 2-nonanona, la presencia del grupo ceto en la segunda posición puede introducir un impedimento estérico para la afinidad hidrofóbica con toda la cadena. Por otra parte, en el caso del nonanal, donde el grupo aldehído se encuentra en la primera posición, el impedimento estérico sería menor al compararlo con las cetonas.

Damodaran y Kinsella (1981a) han investigado el efecto de la posición en la cadena del grupo ceto en la interacción con proteína de soja. Los resultados indican que no existe un efecto de la posición del grupo ceto

sobre el número de sitios de unión pero sí sobre la constante de afinidad. El nonanal muestra mayor afinidad que la 2-nonanona y la 5-nonanona. En el caso del nonanal, la presencia del grupo ceto en la primera posición permite el contacto de toda la cadena del ligando con los sitios de unión de la proteína. Cuando se trata de la 2-nonanona y la 5-nonanona, la presencia del grupo ceto en la segunda y en la quinta posición, respectivamente, presenta un impedimento estérico que desestabiliza la interacción hidrofóbica. Esta desestabilización aumenta progresivamente cuando el grupo ceto se acerca al centro de la cadena.

#### **II.1.4.3.- Efecto del pH**

La influencia del pH en la interacción proteína-compuesto volátil es muy importante, pero depende de la naturaleza de la proteína. Para un pH dado, el estado de ionización de la proteína es diferente dependiendo de su punto isoeléctrico, lo que causa cambios conformacionales en la proteína (Lubbers et al., 1998).

Kinsella (1990) ha estudiado el efecto del pH en la afinidad de la 2-nonanona con BSA. La afinidad de unión aumenta a pH 3,0, 5,0, y 6,0 y disminuye a pH 9,0. Esto se debe principalmente a alteraciones en los sitios de unión inducidos por cambios conformacionales de la proteína.

Adams et al. (2001) han investigado el efecto del pH en la interacción entre ovoalbúmina y compuestos disulfuro (dietil-, dialil-, dipropil-, dibutil- y 2-furfurilmetil sulfuros). Dichos autores indican que cuando el pH aumenta desde 6,7 a 8,0 la cantidad de compuestos disulfuros disminuyen el espacio de cabeza en presencia de ovoalbúmina nativa y ovoalbúmina desnaturalizada por calor. En este caso, el aumento del pH produce un aumento en la interacción.

En el caso de la  $\beta$ -lactoglobulina, la variación de interacción según el pH del medio está también relacionada con cambios estructurales de la proteína (Jouenne y Crouzet, 2000). Se ha observado que al incrementar el pH desde 3,0 a pH 9,0, aumenta también la retención de los compuestos volátiles, metil-cetonas y etil-ésteres. El aumento de pH genera una modificación en la flexibilidad de la proteína, que facilita la interacción con las regiones hidrofóbicas de la proteína. Sin embargo, la retención disminuye drásticamente a pH 11,0 como consecuencia de la desnaturalización alcalina de la  $\beta$ -lactoglobulina. Otro estudio realizado por van Ruth y Villeneuve (2002) sobre el efecto del pH en la interacción de compuestos volátiles con la  $\beta$ -lactoglobulina muestra que, con hexanal, heptanal y octanal se produce una disminución del coeficiente de partición aire / líquido. Además con octanal se obtiene la mayor disminución del coeficiente de partición, lo que indica una mayor interacción entre el octanal y la  $\beta$ -lactoglobulina. Por otra parte, el coeficiente de partición disminuye cuando el pH aumenta desde 3,0 a 9,0. Es decir, el incremento del pH aumenta también la interacción entre la  $\beta$ -lactoglobulina con los aldehídos estudiados (van Ruth y Villeneuve, 2002).

#### **II.1.4.4.- Efecto de la fuerza iónica**

La concentración de sal afecta a la conformación de la proteína y, por consiguiente, al grado de interacción con los compuestos volátiles. En el estudio de interacción de actomiosina con cetonas (Damodaran y Kinsella, 1983), se ha observado que al aumentar la fuerza iónica, aumenta la constante de afinidad, es decir, la afinidad de la unión. Sin embargo, al aumentar la fuerza iónica esta proteína aumenta también su solubilidad, disminuyendo el número de sitios de unión. En la interacción de proteína de

soja con cetonas también se observa un aumento en la afinidad de la unión con el incremento de la fuerza iónica, pero el aumento de la constante de afinidad es independiente del ion y depende solo de la fuerza iónica (Damodaran y Kinsella, 1981b).

El efecto de diferentes sales de sodio fue evaluado en la interacción entre BSA y 2-nonanona. La fijación de este compuesto aumenta linealmente con la concentración de sulfato de sodio, cloruro de sodio, bromuro de sodio y perclorato de sodio. Este efecto se relaciona con la estabilidad conformacional de la proteína ya que los sulfatos y cloruros estabilizan la estructura globular nativa de la proteína de BSA, aumentando la interacción hidrofóbica entre los sitios hidrofóbicos de la cadena, e incrementado la afinidad por ligandos no polares (Kinsella, 1990). Sin embargo, se observa una disminución en la fijación de 2-nonanona en presencia de tricloroacético, ya que este compuesto cambia la interacción hidrofóbica y reduce la interacción de BSA con este compuesto volátil.

#### **II.1.4.5.- Efecto de la temperatura**

El efecto de la temperatura en la interacción entre proteínas y compuestos volátiles depende del intervalo de temperatura usado y la naturaleza de la proteína (Damodaran y Kinsella, 1980; 1981a; 1983). Los cambios conformacionales en la proteína causados por el calor pueden alterar la afinidad de la proteína por los compuestos volátiles lo cual es de gran transcendencia en el procesamiento de alimentos ya que puede causar una reducción o un incremento de la afinidad dependiendo de los cambios conformacionales causados a la proteína y la alteración de los sitios de unión.

La afinidad de unión aumenta drásticamente con el incremento de la temperatura debido a que la proteína se despliega con una mayor exposición

de regiones que originalmente se encontraban en el interior de la molécula (O'Keefe et al., 1991a). Se ha observado que el incremento de temperatura produce un aumento en la constante de afinidad (K) y en el número de sitios de unión (n). Por tanto, el incremento de la temperatura induce cambios en la afinidad de unión debido a cambios conformacionales en la estructura terciaria y cuaternaria de la proteína (Damodaran y Kinsella, 1983).

O'Neil y Kinsella (1988) han estudiado el efecto del tratamiento térmico en la interacción entre la  $\beta$ -lactoglobulina y la 2-nonanona. Al aumentar el tiempo de tratamiento térmico disminuye la constante de afinidad pero el número de sitios de unión permanece constante. También se observaron cambios en la fluorescencia con el tratamiento térmico debido a cambios conformacionales bien en la proteína o bien en la asociación proteína-proteína.

Estudios realizados sobre el efecto de la temperatura sobre la afinidad de la 2-nonanona con la actomiosina de pescado indican que la afinidad de unión aumenta cuando la temperatura aumenta de 0 °C a 25 °C (Damodaran y Kinsella, 1983). Sin embargo, Damodaran y Kinsella (1980), observan un pequeño efecto sobre la afinidad de la unión en la interacción entre la 2-nonanona y el BSA, cuando la temperatura aumenta de 10 °C a 30 °C. Por otra parte, Damodaran y Kinsella (1981a), observan el cambio de la afinidad de unión entre la 2-nonanona y la proteína de soja cuando la temperatura aumenta de 25 °C a 45 °C. Los resultados indican que en este intervalo de temperatura, los parámetros termodinámicos de afinidad de unión y número de sitios de unión son idénticos, mientras que a 5 °C el número de sitios de unión disminuye y la constante de afinidad aumenta. Este efecto de la temperatura sobre la afinidad de unión es explicado por cambios producidos en las estructuras cuaternaria y terciaria de la proteína de soja al bajar la temperatura. Asimismo, en la interacción entre la  $\gamma$ -decalactona con el BSA (Druaux et al., 1995) se observa que entre 20 y 30

°C no existe diferencia en la constante de unión, pero a 10 °C esta constante de unión es 3,5 veces mayor que los valores obtenidos a 20 ó 30 °C. Por otra parte, dado que el número de sitios de unión no cambia significativamente con las diferentes temperaturas, se puede deducir que la disminución de la temperatura produce cambios conformacionales en la proteína.

### **Desnaturalización**

La desnaturalización de la proteína puede aumentar el número de sitios hidrofóbicos disponibles a los compuestos volátiles, reduciendo su concentración en el espacio de cabeza (Fischer y Widder, 1997), probablemente debido a la exposición de regiones hidrofóbicas de la proteína (Leland, 1997). Sin embargo, el estudio de la interacción entre compuestos volátiles y proteína de soja parcialmente desnaturalizada, muestra que la constante de afinidad aumenta pero el número de sitios de unión no cambia lo cual indica que la desnaturalización parcial no afecta a la estructura y, en consecuencia, no hay más regiones hidrofóbicas donde se pueda realizar la unión (Damodaran y Kinsella, 1981a). El aumento de la constante de afinidad a altas temperaturas se puede deber a una mayor exposición de las regiones hidrofóbicas que favorecerían la unión al ligando.

## **II.2.- LA MATRIZ PROTEICA DE LA CARNE**

Las proteínas del músculo esquelético se clasifican en tres grandes grupos: sarcoplásmicas, miofibrilares y proteínas del tejido conectivo. Esta clasificación se basa en su localización y solubilidad. Las proteínas sarcoplásmicas son solubles en agua o en soluciones diluidas de sal (<50mM). Las proteínas miofibrilares son solubles en soluciones con alta fuerza ionica, especialmente a 0,6 M de KCl. Estas proteínas representan

aproximadamente el 11,5% de total de la proteína del músculo. Las proteínas del tejido conectivo son insolubles y estructurales (Pearson y Young, 1989).

### **II.2.1.- Proteínas miofibrilares**

Las proteínas miofibrilares forman parte de la miofibrilla e imparten al músculo rigidez estructural y transforman la energía química en energía mecánica en la contracción. La unidad contráctil de la miofibrilla es el sarcómero, que está formada por filamentos longitudinales gruesos y delgados (Fennema, 2000). La banda A comprende filamentos gruesos (principalmente miosina) y filamentos delgados (principalmente actina), en tanto que la banda I está compuesta únicamente por filamentos delgados que se prolongan a ambos lados de los discos Z. Durante la contracción del músculo se produce un acercamiento de la banda I mientras que la longitud de la banda A permanece constante.

### **II.2.2.- Proteínas sarcoplásmicas**

Las proteínas del sarcoplasma representan alrededor del 30-35% del total de las proteínas del músculo (Pearson y Young, 1989). Mediante centrifugación diferenciada es posible aislar cada una de las fracciones que la constituyen: citoplasmática, nuclear, mitocondrial y microsomal.

#### **II.2.2.1.- Mioglobina**

La mioglobina es una proteína globular formada por una sola cadena polipeptídica. La globina es la porción proteica y una porfirina denominada hemo es el componente cromóforo responsable de la absorción de la luz y el color. Dentro del anillo de porfirina y en posición central, existe un átomo de

hierro formando un complejo de globina y hemo. El hierro localizado centralmente posee seis puntos de coordinación, cuatro de los cuales están ocupados por átomos de nitrógeno del anillo tetrapirrólico. El quinto punto de coordinación está unido al residuo de histidina de la globina, quedando el sexto punto disponible para formar complejos con átomos electronegativos donados por diversos ligandos.

El color de la carne depende de la química de la mioglobina, su estado de oxidación, el tipo de ligando unido al grupo hemo y el estado de la globina. El hierro hemo del anillo de porfirina puede existir en dos formas: como hierro ferroso reducido (+2) o férrico oxidado (+3). Se denomina mioglobina cuando el hierro hémico está en estado +2 (ferroso) y falta un ligando en la posición seis (Fennema, 2000). El estado de oxidación del átomo de hierro del grupo hemo debe distinguirse de la oxigenación de la mioglobina. Cuando el oxígeno molecular se une a la mioglobina, se forma la oximioglobina, lo que se conoce como oxigenación. Cuando ocurre la oxidación de la mioglobina, el átomo de hierro ferroso se convierte en férrico, formándose metamioglobina de color marrón. El tejido muscular contiene principalmente mioglobina (desoximioglobina) de color púrpura. La unión del oxígeno produce oximioglobina y el color del tejido cambia a rojo brillante. Las reacciones del color de la carne fresca son dinámicas y están determinadas por el estado del músculo y las proporciones resultantes de mioglobina, metamioglobina, y oximioglobina. La interconversión entre las formas ocurre fácilmente, dependiendo de las condiciones del medio como presión parcial de oxígeno, temperatura, pH, etc.

Durante el proceso de curado, ocurren reacciones específicas que son responsables del color rosa típico de estos productos. La primera reacción se produce entre el óxido nítrico y mioglobina dando mioglobina óxido nítrica denominada también nitrosilmioglobina. La mioglobina óxido nítrica es de color rojo brillante e inestable. Al calentarla, se forma óxido

nítrico miohemocromógeno (nitrosilhemocromógeno) que es más estable. Este producto confiere el deseable color rosáceo de los productos cárnicos cocidos. El calentamiento de este pigmento desnaturaliza la globina, pero persiste el color rosa.

### **II.2.3.- Péptidos**

#### **II.2.3.1.- Carnosina y anserina**

La carnosina ( $\beta$ -alanil-L-histidina) y la anserina ( $\beta$ -alanil-1-metil-histidina), son dipéptidos que se encuentran presentes en forma natural en el músculo. La concentración de carnosina y anserina en carne de cerdo es de 20,62 y 1,2 mM, respectivamente (Plowman y Close, 1988). Estos dipéptidos tienen estructura semejante y posiblemente cumplen similares funciones biológicas. Ambos contienen histidina que tiene la capacidad de actuar como un excelente agente tamponante a valores de pH fisiológico. Esta capacidad tamponante se debe a que el anillo imidazol tiene un  $pK_a$  de 6,83 en carnosina y de 7,04 en anserina (Chan y Decker, 1994).

Durante el proceso de elaboración de jamón Serrano la concentración de anserina permanece constante, y la concentración de carnosina disminuye ligeramente cuando han transcurrido 100 días de proceso (Toldrá et al., 2000).

Por otra parte, se ha demostrado que carnosina y anserina inhiben la oxidación lipídica pero esta actividad antioxidante es dependiente de la concentración y ocurre a concentraciones comparables a las del músculo (Decker et al., 1992). El mecanismo antioxidante de la carnosina y la anserina es una combinación de su capacidad para complejar iones metálicos que participan en el proceso de oxidación y para atrapar radicales libres (Chan y Decker, 1994). Se ha determinado, por evaluación sensorial, que la

carosina es capaz de mantener el color rojo de la carne de cerdo (Decker y Crum, 1991) y puede inhibir la oxidación de la mioglobina previniendo su decoloración (Decker et al.,1995).

Además la presencia de carosina y anserina en caldo de carne prolonga la sensación de sabor en la cavidad bucal (MacLeod y Seyyedain-Ardebili, 1981), y se ha encontrado una correlación entre los niveles de carosina y anserina y la calidad sensorial de dicho caldo (Pereira-Lima et al., 2000).

## **II.3.- JAMÓN CURADO**

Históricamente, el curado consistió en un procedimiento para conservar la carne mediante la adición de sal. Actualmente, el término curado de la carne se refiere a la conservación de la carne y mejora del sabor del producto por adición de sal, nitrato, nitrito y en algunos casos otros ingredientes o coadyudantes.

### **II.3.1.- Tipos**

En el área del Mediterráneo hay diferentes tipos de jamón curado. Los más importantes son: Ibérico y Serrano en España con una gran variedad de denominaciones de origen, Parma y San Danielle en Italia, y Bayona en Francia. Otros productos elaborados en otras regiones, y que antes de ser consumidos son ahumados y cocinados son el jamón Country-style producido en USA y el jamón Wesphalia en Alemania.

Las características sensoriales de cada uno de estos tipos de jamón dependen fundamentalmente de factores genéticos, ambientales y de las condiciones de proceso. En el desarrollo del proceso de elaboración de jamón curado español se distinguen las siguientes etapas: salado, post-salado

y maduración / secado. En la tabla II.3. se observa las condiciones típicas de fabricación de jamón curado.

### **II 3.2.- Características sensoriales**

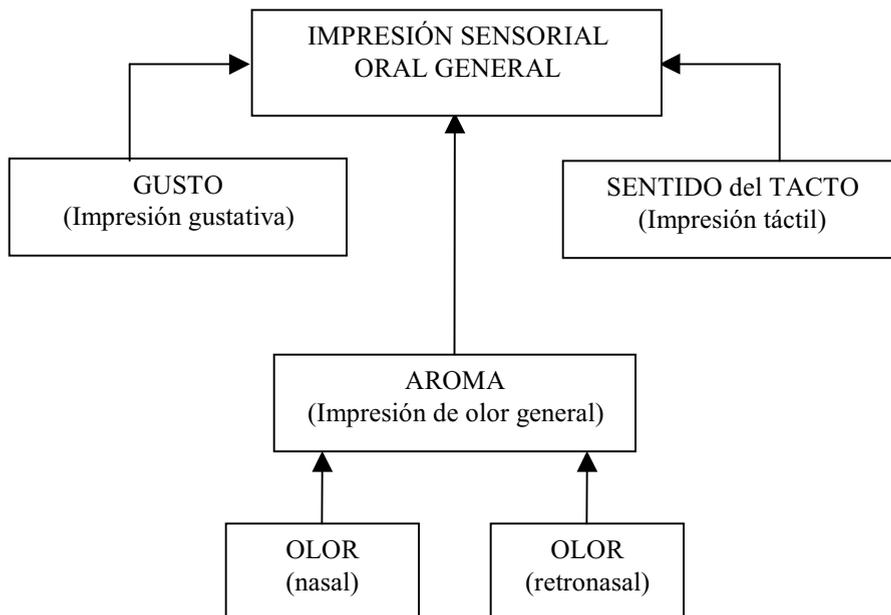
La percepción del aroma y sabor es un factor muy importante que determina la aceptación de un producto alimenticio. La percepción general del alimento durante el proceso de ingestión es el resultado de una respuesta integrada a una mezcla compleja de estímulos y varias sensaciones incluyendo olor, gusto, tacto (figura II.4). La percepción general del alimento está determinada por tres factores (Plug y Haring, 1994): (i) la razón en el alimento entre compuestos volátiles y no volátiles, (ii) la capacidad y liberación de cada uno de estos componentes en el sistema sensorial, y (iii) el mecanismo de percepción.

El aroma percibido depende del umbral de percepción y de los coeficientes de partición de los compuestos volátiles en cada una de las fases. La partición de los compuestos responsables del aroma en la fase gas determina un perfil característico de los compuestos volátiles (Taylor, 1998). Las proteínas participan en la liberación y la percepción del aroma, debido a la interacción que existe entre compuestos volátiles y las proteínas presentes en los alimentos, modificando los coeficientes de partición de los compuestos volátiles (Lubbers et al., 1998).

La señal química que es percibida como aroma, se realiza durante la ingestión del alimento. En esta situación, la naturaleza del alimento cambia si es mezclado con agua adicional y la temperatura se ajusta a valores próximos a la temperatura fisiológica (Taylor, 1998). Además, en esta situación el equilibrio no se alcanza, debido a los fenómenos de transferencia de masa que ocurren, y que vienen determinados por los coeficientes de partición de los compuestos en cada fase.

**Tabla II.3.-** Condiciones típicas de la fabricación del jamón curado Serrano, Ibérico, Parma, Francés, y Country (Toldrá y Flores, 1998).

	Serrano	Ibérico	Parma	Frances	Country
<b>SALADO</b>					
I Etapa					
T (°C)	0-4	0-4	1-4	1-3	1-4
t (días)	10-12	10-12	5-6	14-21	40-50
RH (%)	75-95	75-95	75-90	85-95	---
II Etapa					
T (°C)	---	---	1-4	---	---
t (días)	---	---	21	---	---
RH (%)	---	---	70-80	---	---
<b>POST-SALADO</b>					
I Etapa					
T (°C)	0-6	0-6	1-4	1-3	10-12
t (días)	40-60	40-60	14	21-28	15
RH (%)	70-95	70-95	50-60	70-85	75
II Etapa					
T (°C)	---	---	1-4	---	---
t (días)	---	---	70	---	---
RH (%)	---	---	70-80	---	---
<b>AHUMADO</b>					
T (°C)					38
t (días)	---	---	---	---	24
<b>SECADO</b>					
I Etapa					
T (°C)	6-16	6-16	15-18	20-25	25-30
t (días)	>45	>90	180-330	2-4	30-90
RH (%)	79-90	60-80	65-75	75-85	65
II Etapa					
T (°C)	16-24	16-26	---	14	---
t (días)	>35	>90	---	90-215	---
RH (%)	70-95	55-85	---	70-80	---
III Etapa					
T (°C)	24-34	12-22	---	---	---
t (días)	>30	>115	---	---	---
RH (%)	70-95	60-90	---	---	---
IV Etapa					
T (°C)	12-20	---	---	---	---
t (días)	>35	---	---	---	---
RH (%)	70-95	---	---	---	---
Tiempo total (días)	>215	>365	300-455	143-270	85-145



**Figura II.4.-** Diagrama de los factores incluidos en la percepción oral de los alimentos.

Los compuestos responsables del aroma característico de la carne están presentes en concentraciones muy bajas, del orden de ppm, ppb, y hasta ppt. Existe una gran variedad de compuestos volátiles en la carne y productos cárnicos, pero no todos ellos son responsables del aroma porque depende de su concentración y de su umbral de percepción. Por lo general, contienen grupos químicos diferentes, y son compuestos volátiles con temperaturas de ebullición que oscilan entre 20 °C y 300 °C (Acree y Teranishi, 1993).

Los compuestos volátiles que participan activamente en el aroma de jamón curado han sido analizados por cromatografía de gases olfatométrica, mediante el método de frecuencia de detección (Carrapiso et al., 2002). Una gran variedad de regiones aromáticas activas se han encontrado en el espacio de cabeza de jamón curado (ver tabla II.4), entre ellas se puede mencionar

**Tabla II.4.-** Compuestos volátiles identificados en regiones aromáticas activas (Carrapiso et al., 2002).

<b>Compuesto volátiles</b>	<b>Frecuencia de Detección</b>
2-metil-3-furantiol/2-heptanona	49
metanotiol	45
3-metil-butanal	45
sulfuro de hidrógeno	43
hexanal/(Z)-3-hexenal	43
1-penten-3-ona	39
2-metil-propanal	30
etil-2-metilbutirato/(E)-2-hexenal	26
2-propionil-1-pirrolina/octanal	25
2-acetil-1-pirrolina	20
1-octen-3-ona/1-octen-3-ol	20
metional/2-furfuriltiol	9
etil 2-metilpropanoato	7
(E)-2-heptenal	7
heptanal/3-mercaptop-2-pentanona	6
(E)-2-octenal	6
pentanal	5
2,3-butanodiona	4
2-metil-butanal	3
2-pentanona	3
dimetil-trisulfuro	3

regiones con olor frutal, a queso, a setas o frutos secos. Los compuestos que tienen una mayor frecuencia de detección han sido identificados por espectrometría de masas. Algunos de estos compuestos volátiles identificados son: metanotiol, 2-metil-propanal, 3-metil-butanal, hexanal, 2-heptanona, y 1-octen-3ol, los cuales han sido identificados como los compuestos volátiles que constituyen el aroma a jamón curado. Sin embargo, su contribución general al aroma de jamón curado no esta clara. Otros compuestos identificados como 2-metil-3-furantiol, 2-furfuriltiol, 3-

marcapto-2-pentanona, 2-acetil-1-pirrolina, destacan por tener un fuerte olor a carne.

En el jamón curado se ha descrito que existe un aumento positivo del aroma y sabor cuando aumentan los niveles de 2-metil-butanal y 3-metil-butanal y se reducen los niveles de hexanal y de otros productos de oxidación (Ruiz et al., 1999). Además, se ha encontrado una relación positiva entre el aroma a curado y la concentración de 2-metil-butanal. Estos compuestos volátiles, 2-metil-butanal y 3-metil-butanal, se han asociado con aromas producidos durante procesos de maduración largos (Careri et al., 1993; Hinrichsen y Pedersen, 1995).

### **II.3.3.- Generación del aroma a lo largo del proceso de curado**

El desarrollo del aroma en los productos cárnicos es muy complejo, debido al gran número de reacciones involucradas. En general, los compuestos responsables del aroma son el resultado de la acción enzimática o de reacciones químicas como la oxidación lipídica, la reacción de Maillard, y la degradación vía Strecker de aminoácidos. Existen además otros factores que influyen en las características del aroma de la carne procesada como las propiedades de la carne propiamente, aditivos, condiciones de procesamiento. Sin embargo, la proteolisis y la lipolisis constituyen las principales reacciones en la generación de compuestos precursores del aroma (aminoácidos, y ácidos grasos libres).

La proteolisis es importante en la calidad final de jamón curado ya que involucra los cambios bioquímicos más importantes dentro del proceso y tiene una contribución directa en la textura, pero también contribuye directamente en el sabor y aroma, con la generación de aminoácidos y péptidos que poseen ciertas características específicas de sabor (Toldrá y Flores, 1998). Además, los aminoácidos generados de este proceso pueden

contribuir en forma indirecta al aroma característico, participando en reacciones posteriores que implican la generación de compuestos volátiles.

La oxidación lipídica es uno de los principales factores que afectan la calidad y aceptabilidad de la carne y los productos cárnicos, (Morrissey et al., 1998). Los aldehídos lineales que provienen de la degradación oxidativa de los ácidos grasos insaturados, participan de forma importante en la percepción del aroma de los productos cárnicos debido a su olor característico y por ser detectados a muy bajas concentraciones por el sistema olfativo humano (Shahidi et al., 1986). Dicha oxidación lipídica es necesaria para el desarrollo del aroma característico de los productos cárnicos pero también es responsable del desarrollo de aromas desagradables en la carne (WOF) (Shahidi et al., 1986).

### **II.3.3.1.- Reacciones químicas responsables del aroma**

El desarrollo del aroma en jamón curado es un proceso complejo. En general, los compuestos responsables del aroma pueden ser resultado de degradaciones de azúcares; degradación de Strecker de aminoácidos; reacción de Maillard; degradación de los lípidos y degradación de la tiamina (Mottram, 1998). Todas estas reacciones generan una gran variedad de compuestos volátiles que contribuyen al aroma y sabor característico de la carne.

Las principales vías de formación de compuestos volátiles en el jamón curado son: degradación de Strecker de aminoácidos, y la oxidación lipídica (Barbieri et al., 1992; Flores et al., 1998). La reacción de Maillard como la degradación de la tiamina se dan en presencia de altas temperaturas, y durante el procesado de jamón curado, no se alcanza dichas temperaturas, por ello estas reacciones no son las vías principales de formación del aroma en jamón curado. Aunque, se ha encontrado algunos compuestos que

proceden de la reacción de Maillard como las pirazinas (Barbieri et al., 1992; Bolzoni et al., 1996; Dirinck et al., 1997; Ruiz et al., 1998; Sabio et al., 1998; Flores et al., 1997a).

#### **II.3.3.1.1.- Degradación vía Strecker de aminoácidos**

La degradación vía Strecker de aminoácidos consiste en una desaminación oxidativa y decarboxilación de un  $\alpha$ -aminoácido en presencia de un compuesto dicarbonilo, y la posterior generación de un  $\alpha$ -amino-cetona y un aldehído que contiene un átomo de carbono menos que el aminoácido precursor (MacLeod y Seyyedain-Ardebili, 1981). Los aldehídos generados sufren a menudo nuevas reacciones y el  $\alpha$ -amino-cetona puede generar dímeros en forma de pirazina, aumentando así el número de compuestos volátiles generados.

#### **II.3.3.1.2.- Reacción de Maillard**

La reacción Maillard es una de las rutas más importantes en la generación de compuestos responsables del aroma y sabor en los alimentos procesados mediante tratamiento térmico o almacenado a temperatura ambiente, incluyendo los productos cárnicos (Shahidi et al., 1986).

Esta reacción ocurre entre un compuesto con un grupo amino (por ejemplo, aminoácidos, aminas, péptidos, proteínas, y el amoníaco) y un azúcar reductor. Implica la condensación del grupo carbonilo del azúcar con el grupo amino, dando lugar a una glicosilamina. Posteriormente, a través de sucesivas reacciones es posible obtener compuestos como furfural y derivados furanona, hidroxí-cetonas y compuestos dicarbonilo (Mottram, 1998). Las etapas siguientes de la reacción de Maillard implican la interacción de estos compuestos con otros compuestos reactivos como

aminas, aminoácidos, aldehídos, sulfuro de hidrógeno y amoníaco (MacLeod y Seyyedain-Ardebili, 1981). Una reacción importante asociada a la reacción de Maillard es la degradación de Strecker de aminoácidos. Esta reacción usa el compuesto dicarbonilo formado en la reacción Maillard y si el aminoácido es cisteína, la degradación de Strecker puede conducir a la producción de sulfuro de hidrógeno, amoníaco y acetaldehído (Mottram, 1998). Estos compuestos, junto con compuestos carbonilo producidos en la reacción de Maillard, proporcionan una variedad de compuestos intermedios para las reacciones que contribuyen a la formación del aroma. En la reacción de Maillard se forman varios compuestos heterocíclicos que son reconocidos por su enorme contribución al aroma total en la carne (Gandemer, 1999).

#### **II.3.3.1.3.- Reacciones de oxidación de los lípidos**

La oxidación de los lípidos es un proceso complejo. En primer lugar, los peróxidos se forman por el mecanismo del radical libre y, posteriormente, ocurren reacciones secundarias que dan lugar a un gran número de compuestos volátiles, como hidrocarburos alifáticos, aldehídos, cetonas, alcoholes, ácidos carboxílicos y ésteres (Frankel, 1991).

Los hidroperóxidos procedentes de la oxidación de los lípidos son inodoros. Sin embargo, estos compuestos son inestables y se degradan dando lugar a una gran variedad de productos (Love, 1996). Los compuestos específicos que se forman dependen de la estructura del ácido graso precursor, la posición del grupo hidroperóxido en la molécula, así como del lugar donde ocurre la escisión, y de las reacciones posteriores sufridas por el radical. Estas reacciones posteriores se ven afectadas por factores tales como la temperatura, la presión de oxígeno y la presencia en el alimento de catalizadores o antioxidantes.

Predecir los compuestos volátiles que se forman a partir de la degradación de hidroperóxidos es complicado porque se generan además productos insaturados que también pueden sufrir reacciones posteriores (Love, 1996).

Los valores del umbral de percepción de estos compuestos volátiles generados en la oxidación lipídica, en general, son mucho más altos que el valor del umbral de percepción de aquellos compuestos que contienen azufre y compuestos heterocíclicos que contiene nitrógeno obtenidos a partir de precursores presentes en la carne y además, son solubles en agua (Forss, 1972; Mottram, 1998). Los aldehídos saturados e insaturados, con 6-10 átomos de carbono, son los principales componentes volátiles de todas las carnes cocinadas y, por lo tanto, juegan un papel importante en el aroma de carne. El aroma de estos aldehídos es descrito como verde, graso (Mottram, 1998).

El aroma característico de cada especie de carne se cree que es responsabilidad de las diferencias en el perfil lipídico particular de cada especie animal. Los aldehídos, son el producto principal de degradación de los lípidos, y se encuentran implicados en ciertas características organolépticas de cada especie. Por ejemplo, la carne de cerdo y pollo tienen una proporción más alta de ácidos grasos insaturados en los triglicéridos comparada con la carne de ternera o de cordero. Esto permite la generación de más aldehídos en estas carnes, que determina el aroma de las especies (Mottram, 1998).

#### **II.3.3.1.4.- Degradación de la tiamina**

La tiamina es una vitamina del grupo B que se encuentra en carne de cerdo en una concentración 5 a 10 veces mayor que en ternera y cordero. La degradación térmica de la tiamina produce tres clases de compuestos

volátiles derivados del azufre como tiofenos, furanos y tiazoles (MacLeod y Seyyedain-Ardebili, 1981). Los compuestos derivados del azufre se caracterizan por poseer umbrales de percepción muy bajos (Shahidi et al., 1986), lo cual hace que sean de gran interés por su potencia aromática. También, se debe tener en cuenta la interacción con otros componentes de alimentos que afectarán su concentración en la fase de gas y, por lo tanto, el aroma percibido.

### **II.3.3.2.- Extracción e identificación de los compuestos volátiles responsables del aroma**

#### **II.3.3.2.1.- Técnicas de extracción**

El estudio de los compuestos volátiles característicos del aroma de jamón curado se ve afectado por muchos factores. No solo afectan factores genéticos, ambientales y condiciones de procesamiento en la composición de los compuestos volátiles, también los resultados se ven afectados por la metodología analítica empleada (Flores et al., 1998; Ruiz et al., 2001) como: la extracción con solvente, destilación a vacío, espacio de cabeza dinámico, etc. Los estudios realizados en la extracción de los compuestos volátiles presenten en jamón curado se muestran en la tabla II.5.

##### **II.3.3.2.1.1- Extracción con disolventes**

La técnica de extracción con disolvente se realiza mezclando la muestra con un disolvente, y dejando reposar la mezcla hasta que ocurra la separación de fases. La fase de extracción contiene los compuestos volátiles, aunque algunos pueden permanecer retenidos en la matriz en el proceso de extracción, lo que dificulta su separación. Además, el empleo de esta técnica

**Tabla II.5.-** Técnicas empleadas en la extracción de compuestos volátiles en el jamón curado.

Tipo de jamón	Técnica de Extracción	Temperatura (°C)	Referencia
Bayonne, Corsican, Parma, Iberico, Serrano, Country-Style	Purga y trampa (Tenax)	35	Sabio et al. (1998)
Francés	Destilación a vacío y trampa fría	--	Berdagué et al. (1991)
Francés	Purga y trampa (Tenax)	25	Buscaillon et al. (1993)
Ibérico	Fluidos supercríticos (CO <sub>2</sub> )	40-60	Timón et al. (1998)
Ibérico	Purga y trampa (Tenax)	40	Ruiz et al. (1999)
Ibérico	Destilación a vacío y trampa fría	--	García et al. (1991)
Ibérico	Purga y trampa (Tenax)	29	López et al. (1992)
Ibérico	Microextracción en fase sólida (SPME)	25	Ruiz et al. (2001)
Ibérico	Microextracción en fase sólida (SPME)	40-60	Ruiz et al. (1998)
Serrano	Purga y trampa (Tenax)	40	Flores et al. (1997a)
Serrano y Parma	Destilación-extracción	--	Dirinck et al. (1997)
	Purga y trampa (Tenax)	60	
Parma	Purga y trampa (Tenax)	40	Barbieri et al. (1992)
Parma	Purga y trampa (Tenax)	50	Hinrichsen y Pedersen (1995)
Parma	Purga y trampa (Tenax)	40	Bolzoni et al. (1996)

produce la extracción de lípidos presentes en el alimento que posteriormente dificultan el análisis de los compuestos volátiles. Por otra parte, estos disolventes favorecen la extracción selectiva de los compuestos volátiles en función de la polaridad del disolvente y de los compuestos volátiles.

Esta técnica no se emplea en el análisis de compuestos volátiles de jamón debido a que la extracción también extrae los lípidos presentes en el jamón (tabla II.5).

**II.3.3.2.1.2.- Destilación simultanea con arrastre de vapor**

Los compuestos volátiles se obtienen mediante una destilación a vacío, de una suspensión acuosa del alimento. Este destilado se condensa mediante trampas refrigeradas para obtener los compuestos en fase acuosa. Los compuestos volátiles son extraídos de este condensado acuoso mediante extracción con disolventes (apartado II.3.3.2.1.1). En este caso se evita la posible interferencia de la extracción de lípidos.

Uno de los primeros trabajos realizados para identificar los compuestos volátiles presentes en el jamón curado, se ha realizado utilizando un sistema de destilación a vacío equipada con trampas de frío (Ockerman et al., 1964). En este trabajo se han identificado aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos y compuestos que contienen azufre.

Esta técnica ha sido empleada para el análisis de compuestos volátiles de jamón curado Francés (Berdagué et al., 1991), Ibérico (García et al., 1991), Serrano y Parma (Dirinck et al., 1997).

Esta técnica se caracteriza por una mayor extracción de compuestos volátiles como los ácidos carboxílicos, lactonas e hidrocarburos alifáticos (Flores et al., 1998).

**II.3.3.2.1.3.- Extracción con fluidos supercríticos**

La extracción con fluidos supercríticos (SFE) es una técnica atractiva, libre de solventes, para la extracción de compuestos volátiles. Sin embargo, se requiere de una inversión inicial alta, debido a que necesita de un sistema de altas presiones. Además, con este tipo de extracción se consume una gran cantidad de dióxido de carbono (Zhang et al., 1994). Esta técnica permite la extracción de compuestos sensibles a la temperatura

debido a que las temperaturas de operación son bajas (Merkle y Larick, 1994).

En la extracción de compuestos volátiles con dióxido de carbono supercrítico son importantes las condiciones de operación de presión y de temperatura. A una menor presión y temperatura (91 atm, 40 °C) se observa que el número y concentración de compuestos volátiles extraídos del jamón curado es mayor que los obtenidos a una presión y temperatura mayor (129 atm, 60°C) (Timón et al., 1998). Dichos autores indican que probablemente la presión y la temperatura alta modifican la matriz del jamón y puede causar reacciones entre los componentes de la matriz y los compuestos volátiles impidiendo la entrada de dióxido de carbono, también en dichas condiciones se pueden producir alteraciones de los compuestos volátiles. Por otra parte, la solubilidad de ácidos grasos y triglicéridos aumenta en condiciones de presión alta, lo cual impide la extracción e identificación de otros compuestos volátiles.

#### **II.3.3.2.1.4.- Extracción del espacio de cabeza**

La técnica de espacio de cabeza es un método muy popular para la extracción de compuestos volátiles en los alimentos y posee las ventajas de evitar el uso de disolventes, permite el análisis de compuestos de bajo peso molecular y permite la relación con el aroma nasal percibido antes de ingerir el alimento.

##### **a) Espacio de cabeza estático**

Consiste básicamente en retirar una porción del espacio de cabeza, que posteriormente es analizada. Los volátiles se distribuyen en cada una de las fases que lo contienen según el coeficiente de distribución. La

temperatura ayuda a disminuir el tiempo requerido para que se alcance el equilibrio entre la fase gas y la fase (sólida y/o líquida) que constituye el alimento (Stevenson et al., 1996).

En la práctica, la muestra del alimento se coloca en un vial que posteriormente es sellado, en algunos casos la muestra es calentada para permitir la vaporización de los compuestos volátiles y se mantiene a una temperatura un periodo de tiempo lo cual permite establecer el equilibrio en cada una de las fases. Una vez que los compuestos volátiles se han equilibrado en cada una de las fases, una alícuota del gas presente en el espacio de cabeza es retirada con una jeringa, la porción de espacio de cabeza es inyectada en el puerto de inyección y analizada por cromatografía de gases.

La cantidad de compuesto volátil presente en el espacio de cabeza depende de varios factores tales como la cantidad del compuesto presente en la muestra original, la volatilidad, la solubilidad del compuesto volátil en la matriz del alimento, la temperatura de análisis, y el tiempo que se mantiene la muestra para ser acondicionada en el vial.

Las principales ventajas de esta técnica de extracción son las siguientes:

- Permite analizar compuestos volátiles de bajo peso molecular, que son difíciles de cuantificar con la técnica de extracción con disolventes.
- Existen instrumentos automáticos que calientan los viales con la muestra, luego retiran una porción del espacio de cabeza y la inyectan en el cromatógrafo de gases. El control automático aumenta la reproducibilidad de esta técnica.
- Es un método simple y rápido, elimina la presencia de otros reactivos (disolventes), y el coste es relativamente bajo.

Las principales inconvenientes del uso de esta técnica son:

- Esta técnica tiene baja sensibilidad debido a la ausencia de concentración previa de los compuestos. La concentración del compuesto volátil en el espacio de cabeza se encuentra en equilibrio con la matriz del alimento y sólo una parte del espacio de cabeza es retirado y transferido al cromatógrafo de gases para su análisis.
- La reproducibilidad requiere que se alcance el equilibrio, aunque esta condición de equilibrio es difícil de alcanzar por los compuestos menos volátiles.

## **b) Espacio de cabeza dinámico**

### **- Purga y trampa**

Esta técnica consiste en arrastrar los compuestos volátiles presentes en el espacio de cabeza mediante una corriente de gas inerte durante un tiempo suficiente para extraer la mayoría de los compuestos volátiles presentes.

Los compuestos volátiles arrastrados por el flujo de gas son concentrados o atrapados en un material poroso. Los cuatro materiales comúnmente usados son: Tenax TA, Tekmar N° 8, Vocab 3000 y Vocab 4000 (Pillonel et al., 2002). Tenax es el más usado, es efectivo en recuperar aldehídos, ésteres, hidrocarburos alifáticos y aromáticos. Es capaz de concentrar una amplia gama de compuestos volátiles, es especialmente eficaz con compuestos aromáticos. Este material puede ser calentado a temperaturas relativamente altas para la desorción, y es duradero. No es conveniente para hidrocarburos muy volátiles (pentano) o para pequeños alcoholes. Este material ha sido usado para el análisis de diferentes tipos de espacio de cabeza dinámico existiendo amplia información sobre su

conveniencia para un análisis particular (Wampler, 1997). Por otra parte, Vocarb 3000 es más efectivo para atrapar alcoholes y cetonas.

Las principales ventajas de esta técnica son:

- Ofrece las mismas ventajas que la técnica de espacio de cabeza estático, es decir, eliminación de un frente de disolvente, automatización y simplicidad en la preparación de la muestra.
- Aumenta la sensibilidad, permitiendo el análisis de compuestos volátiles a niveles de ppb.

Los principales inconvenientes son:

- Los instrumentos son complejos y requieren ser supervisados en varios pasos, existen válvulas, zonas de calefacción, por esto la instrumentación es más compleja y puede ser más cara, con riesgo de escapes.
- Requiere más tiempo de preparación y análisis que el método estático.
- La adsorción de los compuestos volátiles depende del material adsorbente utilizado.

### **II.3.3.3.- Compuestos volátiles aislados en los distintos tipos de jamón curado**

Se han realizados investigaciones para identificar y cuantificar los compuestos volátiles en jamones curados de Francia (Berdagué et al., 1991; 1993; Buscailhon et al., 1993), Parma (Barbieri et al., 1992; Careri et al., 1993; Hinrichsen y Pedersen, 1995; Bolzoni et al., 1996) así como en los españoles Iberico y Serrano (García et al., 1991; López et al., 1992; Flores et al., 1997a; Timón et al., 1998; Ruiz et al., 1998; 1999; 2001). La tabla II.6 muestra los compuestos volátiles identificados en estos jamones curados. Una gran variedad de aldehídos, hidrocarburos alifáticos y aromáticos, alcoholes, cetonas, y ésteres, se han identificado en jamón curado, en menor

**Tabla II.6-** Compuestos volátiles detectados en el jamón curado.

1López et al. (1992), 2García et al. (1991), 3Hinrichsen y Pedersen (1995), 4Barbieri et al. (1992), 5Berdagué et al. (1991), 6Buscailhon et al. (1993), 7Bolzoni et al. (1996), 8Dirinck et al. (1997), 9Ruiz et al. (1998), 10Ruiz et al. (1999), 11Timón et al. (1998), 12Sabio et al. (1998), 13Flores et al. (1997a), 14Ruiz et al. (2001), 15Carrapiso et al. (2002).

---

**ALDEHÍDOS**

---

(C-T)-2,4-Decadienal <sup>8</sup>	2-Pentenal <sup>8</sup>
(E)-2-Heptenal <sup>4</sup>	2-Undecenal <sup>9, 13,14</sup>
(E)-2-Nonenal <sup>2</sup>	3-Metil-2-butenal <sup>1</sup>
(E)-2-Octenal <sup>4</sup>	3-Metilbutanal <sup>2, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15</sup>
(E)-2-Pentenal <sup>4, 15</sup>	3-Metilhexanal <sup>6</sup>
(E-E)-2,4-Decadienal <sup>2</sup>	4-Metil-2-pentenal <sup>1</sup>
(E-E)-2,4-Pentadienal <sup>4</sup>	9-Octadecanal <sup>5</sup>
(E-Z)-2,4-Decadienal <sup>2, 13</sup>	Acetaldehído <sup>3, 12</sup>
(T-T)-2,4-Decadienal <sup>8</sup>	Benzaldehído <sup>1, 3, 4, 8, 9, 11,12</sup>
(Z)-2-Decenal <sup>4</sup>	Benzenacetaldehído <sup>3, 5, 11, 12</sup>
(Z)-2-Nonenal <sup>4</sup>	Butanal <sup>2, 4, 8, 11</sup>
2,4-Docadienal <sup>11, 14</sup>	Decanal <sup>1, 6, 8, 9, 11, 12, 13,14</sup>
2,4-Nonadienal <sup>3, 8, 11, 12</sup>	Dodecanal <sup>1, 5, 9, 11</sup>
2,4-Octadienal <sup>3</sup>	Fenilacetaldehído <sup>1, 2, 8, 9</sup>
2-Decenal <sup>1, 8, 14</sup>	Heptanal <sup>1, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14,15</sup>
2-Dodecenal <sup>1</sup>	Hexadecanal <sup>2, 5</sup>
2-Furaldehído <sup>1</sup>	Hexanal <sup>1, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14,15</sup>
2-Heptenal <sup>3, 7, 8, 10,14, 15</sup>	Hexenal <sup>3</sup>
2-Hexenal <sup>1, 3, 4, 6, 8, 15</sup>	Nonanal <sup>1, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 13,14</sup>
2-Metil-2-butenal <sup>3</sup>	Octadecanal <sup>5</sup>
2-Metil-2-pentenal <sup>1</sup>	Octadecenal <sup>5, 8, 9</sup>
2-Metil-2-propenal <sup>3</sup>	Octanal <sup>1, 3, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15</sup>
2-Metilbutanal <sup>2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13,14, 15</sup>	Pentadecanal <sup>5,9</sup>
2-Metilbutenal <sup>10</sup>	Pentanal <sup>1, 4, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15</sup>
2-Metilpropanal <sup>3, 6, 8, 9, 12, 14, 15</sup>	Propanal <sup>3</sup>
2-Nonenal <sup>5, 8, 9, 12, 13, 14</sup>	Tetradecanal <sup>5, 8</sup>
2-Octenal <sup>3, 7, 8, 12</sup>	Undecanal <sup>5, 9</sup>

---

**HIDROCARBUROS ALIFATICOS**

---

(E) 2-Octeno <sup>10</sup>	1-Hexadeceno <sup>11</sup>
1,3- Pentadieno <sup>14</sup>	1-Octadeceno <sup>11</sup>
1,3-Octadieno <sup>10</sup>	1-Octeno <sup>4, 6, 7, 13, 14</sup>
1-Dodeceno <sup>11</sup>	1-Tetradeceno <sup>11</sup>
1-Hepteno <sup>4, 7</sup>	2,2,3-Trimetilpentano <sup>4, 5</sup>

**Tabla II.6-** (Continuación)

2,2,4,6,6-Pentametilheptano <sup>6</sup>	Dimetilundecano <sup>5</sup>
2-Dodeceno <sup>11</sup>	Docosano <sup>2</sup>
2-Etil-1-dodeceno <sup>11</sup>	Dodecano <sup>2, 5, 11, 12, 13</sup>
2-Metildecano <sup>11</sup>	Etilciclopentano <sup>10</sup>
2-Octeno <sup>8, 14</sup>	Heneicosano <sup>2, 5</sup>
2-Tetradeceno <sup>11</sup>	Heptadecano <sup>2, 5, 11</sup>
3-Dodeceno <sup>11</sup>	Heptano <sup>3, 4, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14</sup>
3-Hexadeceno <sup>11</sup>	Hexadecano <sup>2, 11</sup>
3-Metilheptano <sup>10</sup>	Hexano <sup>6, 8, 11, 12, 13, 14</sup>
3-Metilhexano <sup>10</sup>	Metilciclopentano <sup>9, 10, 12</sup>
3-Metilnonano <sup>6</sup>	Metildecano <sup>5</sup>
3-Tetradeceno <sup>11</sup>	Mirceno <sup>1, 12</sup>
4,6,8-Trimetilnoneno <sup>4</sup>	Nonadecano <sup>2</sup>
4-Metil-1-undeceno <sup>11</sup>	Nonano <sup>1, 3, 5, 6, 11, 12, 13</sup>
4-Metilheptano <sup>5</sup>	Noneno <sup>3</sup>
4-Octeno <sup>10</sup>	Octadecano <sup>2, 5, 11</sup>
5-Metildodeceno <sup>11</sup>	Octano <sup>3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13</sup>
5-Metildecano <sup>11</sup>	Pentadecano <sup>2, 5, 11, 14</sup>
Alcano ramificado <sup>1</sup>	Pentano <sup>4, 6, 8, 14</sup>
Alquil ciclopentano <sup>6</sup>	Policiclopentano <sup>9</sup>
Ciclododeceno <sup>11</sup>	Tetradecano <sup>2, 8, 11, 14</sup>
Decano <sup>2, 5, 6, 9, 11, 13</sup>	Tridecano <sup>2, 5, 12, 14</sup>
Deceno <sup>3</sup>	Undecano <sup>2, 5, 11, 12</sup>

---

**ALCOHOLES**

---

(E)-2-Octen-1-ol <sup>4</sup>	1-Propanol <sup>3, 4, 7, 8, 13, 14</sup>
(z)-2-Octen-1-ol <sup>4</sup>	1-Tetradecanol <sup>2, 9</sup>
1,2-Propanediol <sup>4</sup>	2,2- Dimetiloctanol <sup>13</sup>
1,3-Butanediol <sup>11</sup>	2,3-Butanediol <sup>11</sup>
1,4-Butanediol <sup>1</sup>	2-Butanol <sup>3, 4, 7, 8, 13</sup>
1-Butanol <sup>4, 6, 7, 8, 13, 14</sup>	2-Butoxietanol <sup>2, 4, 6, 7, 13</sup>
1-Butoxi-2-propanol <sup>4, 7</sup>	2-Etoxietoxi etanol <sup>2</sup>
1-Butoxietoxietanol <sup>5</sup>	2-Etil-1-hexanol <sup>4, 11</sup>
1-Decanol <sup>1</sup>	2-Heptanol <sup>12</sup>
1-Dodecanol <sup>1, 9, 11, 12</sup>	2-Hepten-1-ol <sup>4</sup>
1-Etilciclopropanol <sup>3</sup>	2-Hexanol <sup>4</sup>
1-Heptanol <sup>2, 4, 7, 12</sup>	2-Metil-1-butanol <sup>13</sup>
1-Heptenol <sup>12</sup>	2-Metil-1-propanol <sup>4, 6, 7, 8, 10, 12, 13</sup>
1-Hexanol <sup>1, 5, 7, 8, 10, 11, 12, 13</sup>	2-Metil-2-buten-1-ol <sup>4, 7, 13</sup>
1-Octanol <sup>1, 4, 5, 9, 13, 14</sup>	2-Metil-3-buten-2-ol <sup>2, 4, 7, 12</sup>
1-Octen-3-ol <sup>2, 7, 8, 9, 12, 14, 15</sup>	2-Metilbutan-1-ol <sup>1, 3, 5, 6, 12</sup>
1-Pentanol <sup>1, 7, 8, 9, 12, 13, 14</sup>	2-Pentanol <sup>3, 4, 7, 8, 12</sup>
1-Penten-3-ol <sup>3, 4, 6, 7, 10, 12, 13, 14</sup>	2-Propanol <sup>3, 8, 9, 13</sup>

**Tabla II.6-** (Continuación)

3-Etoxi-1-propanol <sup>14</sup>	4-Metil-4-heptanol <sup>11</sup>
3,7-Dimetil-1-octen-3-ol <sup>4</sup>	5-Metilheptan-2-ol <sup>1</sup>
3-Etilfenol <sup>10</sup>	cis-3-Hexen-1-ol <sup>1</sup>
3-Metil-2-hexanol <sup>13</sup>	Dodecanol <sup>11</sup>
3-Metil-3-buten-1-ol <sup>4, 6, 7, 13</sup>	Etanol <sup>3, 6, 8, 12, 13</sup>
3-Metil-butan-1-ol <sup>1, 7, 8, 10, 13</sup>	Etil fenol <sup>12</sup>
3-Metilfenol <sup>10</sup>	Feniletanol <sup>2, 5, 9, 11</sup>
3-Penten-1-ol <sup>3</sup>	Furfurilalcohol <sup>1</sup>
4-Metilfenol <sup>14</sup>	Hexadecanol <sup>9</sup>
4-Metil-2-pentanol <sup>11</sup>	Metanol <sup>3</sup>

---

**HIDROCABUROS AROMÁTICOS**

---

1,2,3-Trimetilbenceno <sup>1, 4, 6, 8</sup>	4-Etil-1,2-dimetilbenceno <sup>11</sup>
1,2,4-Trimetilbenceno <sup>5</sup>	Benceno <sup>3, 4, 7, 8</sup>
1,2-Dimetil-3-etilbenceno <sup>1</sup>	Bencenometanol <sup>11</sup>
1,2-Dimetilbenceno ( <i>o</i> -Xileno) <sup>1, 3, 6, 12</sup>	Benzonitrilo <sup>4</sup>
1,3,4,5-Tetrametilbenceno <sup>11</sup>	Dimetilfenol <sup>6</sup>
1,3,5-Trimetilbenceno <sup>10</sup>	Epoxidihidrolinalool <sup>4</sup>
1,3-Dimetilbenceno ( <i>m</i> -Xileno) <sup>4, 7, 12, 13</sup>	Etenilbenceno <sup>1, 4, 6, 10</sup>
1,4-Dimetilbenceno ( <i>p</i> -Xileno) <sup>1, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 13</sup>	Etilbenceno <sup>1, 4, 5, 7, 8, 12</sup>
1-Etil-2-metilbenceno <sup>4, 6, 10, 12</sup>	Isopropilbenceno <sup>4</sup>
1-Etil-3,5-dimetilbenceno <sup>11</sup>	Metilvinilbenceno <sup>4</sup>
1-Metoxihexano <sup>4</sup>	Naftaleno <sup>11</sup>
1-Metil-3-metiletil-benceno <sup>1</sup>	Propilbenceno <sup>10, 11, 14</sup>
	tert-Butilbenceno <sup>4</sup>
	Tolueno <sup>3, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14</sup>

---

**CETONAS**

---

1-Hidroxi-2-propanona <sup>4, 8, 11</sup>	3-Decen-2-ona <sup>11</sup>
1-Penten-3-ona <sup>15</sup>	3-Hexanona <sup>6, 12</sup>
2,3-Octadien-2-ona <sup>8</sup>	3-Hexen-2-ona <sup>11</sup>
2,3-Octanediona <sup>10, 14</sup>	3-Hidroxi-butan-2-ona (acetoin) <sup>2, 4, 7, 8, 11, 12, 13, 14</sup>
2,5-Octadien-2-ona <sup>8</sup>	3-Metil-2-butanona <sup>2, 4, 7</sup>
2,6 bis(1,1-dimetil)-2,5-ciclohexadiene-1,4-diona <sup>9</sup>	3-Metil-2-pentanona <sup>6, 12</sup>
2-Hexanona <sup>6, 8, 12, 13, 14</sup>	3-Nonen-2-ona <sup>11</sup>
2-Hidroxi-3-pentanona <sup>6</sup>	3-Octanona <sup>10</sup>
2-Metiloctan-3-ona <sup>2</sup>	3-Octen-2-ona <sup>1</sup>
2-Pentanona <sup>10, 14</sup>	3-Penten-2-ona <sup>11, 12</sup>
2-Propanona <sup>3, 4, 6, 7, 12, 13, 14</sup>	4-Heptanona <sup>11, 12, 14</sup>
2-Undecanona <sup>4</sup>	4-Hidroxi-4-metil-2-pentanona <sup>11</sup>

**Tabla II.6-** (Continuación)

4-Metil-2-heptona <sup>11</sup>	Butan-2-ona <sup>2, 7, 8, 12, 13, 14</sup>
4-Metil-2-pentanoa <sup>7</sup>	Cetona ramificada <sup>1</sup>
4-Metil-3-penten-2-ona <sup>11</sup>	Ciclohexanoa <sup>4, 11, 12</sup>
4-Octen-3-one <sup>3, 4, 7, 12</sup>	Heptan-2-ona <sup>2, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14</sup>
5-Etil-3-metil-5-hepten-2-ona <sup>13</sup>	Nonan-2-ona <sup>3, 9, 12, 14</sup>
5-Hidroxi-3-metil-3-hexona <sup>11</sup>	Octan-2-ona <sup>5, 6, 8, 10, 12, 14</sup>
6,10-Dimetil-(E)5,9-undecadien-2-ona <sup>9</sup>	Pentan-2,3-diona <sup>2, 4, 6, 8</sup>
6-Metil-5-hepten-2-ona <sup>4, 6, 7, 9, 12, 13</sup>	Pentan-2-ona <sup>1, 3, 4, 6, 7, 8, 12, 13, 14, 15</sup>
Butan-2,3-diona (Diacetil) <sup>2, 3, 6, 7, 8, 12, 13, 15</sup>	trans-Geranil-acetona <sup>5</sup>

---

### ACÍDOS CARBOXÍLICOS

---

2-Metilbutanoico <sup>9, 11, 14</sup>	Hexadecanoico <sup>5</sup>
2-Metilpropanoico <sup>3, 11</sup>	Hexanoico <sup>1, 4, 5, 11, 14</sup>
3-Metilbutanoico <sup>3, 9, 11, 14</sup>	Isohexanoico <sup>1</sup>
9,12-Octadecadienoico <sup>5</sup>	Isooctanoico <sup>1</sup>
9-Hexadecenoico <sup>5</sup>	Nonanoico <sup>5, 11, 14</sup>
9-Octadecenoico <sup>5</sup>	Octanoico <sup>1, 5, 11, 14</sup>
Acético <sup>1, 3, 4, 9, 11, 13, 14</sup>	Pentadecanoico <sup>2, 5</sup>
Benzoico <sup>11</sup>	Pentanoico <sup>1, 3, 4, 11</sup>
Butanoico <sup>1, 4, 9, 11, 14</sup>	Propanoico <sup>3, 4, 11</sup>
Decanoico <sup>8, 11, 14</sup>	Tetradecanoico <sup>11</sup>
Dodecanoico <sup>8, 11, 14</sup>	Undecanoico <sup>5</sup>
Heptanoico <sup>5, 11, 14</sup>	

---

### ÉSTERES

---

1-Penten-3-ol acetato <sup>12</sup>	Etil heptanoato <sup>3, 12</sup>
2-Metilpropil acetato <sup>10</sup>	Etil hexadecanoato <sup>2</sup>
3-Metilbutil acetato <sup>10</sup>	Etil hexanoato <sup>1, 4, 7, 12</sup>
Alquil ftalato <sup>2</sup>	Etil octanoato <sup>2, 4, 7, 12</sup>
Butil acetato <sup>6, 8, 10</sup>	Etil pentanoato <sup>3</sup>
Butil decanoato <sup>9</sup>	Etil propanoato <sup>3, 4, 12</sup>
Dietil ftalato <sup>9</sup>	Etil tetradecanoato <sup>9</sup>
Dimetil ftalato <sup>9</sup>	Hexil butirato <sup>1</sup>
Etil 1-metilbutanoato <sup>13</sup>	Linalil acetato <sup>1</sup>
Etil 2-metilbutanoato <sup>2, 4, 6, 7, 10, 12, 13</sup>	Metil 2-metilbutanoato <sup>4, 6, 7</sup>
Etil 2-metilpropanoato <sup>12</sup>	Metil 2-metilpropanoato <sup>4, 7, 13</sup>
Etil 3-metilbutanoato <sup>3, 4, 7, 10, 12, 13</sup>	Metil 3-hexenoato <sup>4</sup>
Etil acetato <sup>3, 4, 6, 7, 12, 13</sup>	Metil 3-metilbutanoato <sup>4, 7</sup>
Etil butanoato <sup>3, 4, 7, 13</sup>	Metil 3-octenoato <sup>4</sup>
Etil decanoato <sup>2, 4, 8, 9</sup>	Metil 4-decenoato <sup>4</sup>

**Tabla II.6-** (Continuación)

Metil 4-metilhexanoato <sup>4,7</sup>	Metil hexadecanoato <sup>5</sup>
Metil 4-metilpentanoato <sup>4</sup>	Metil hexanoato <sup>4,7,10,12,13</sup>
Metil 5-hexenoato <sup>4,7</sup>	Metil nonanoato <sup>4</sup>
Metil 6-metilheptanoato <sup>4</sup>	Metil octanoato <sup>4,7</sup>
Metil acetato <sup>4,13</sup>	Metil pentanoato <sup>4,7</sup>
Metil benzoato <sup>4</sup>	Metil propanoato <sup>4,7</sup>
Metil butanoato <sup>4,7,10,13</sup>	Pentil butanoato <sup>12</sup>
Metil carbamato <sup>1</sup>	Propil acetate <sup>3</sup>
Metil decanoato <sup>4</sup>	Propil decanoato <sup>9</sup>
Metil heptanoato <sup>4,7</sup>	Propil loctanoato <sup>9</sup>

---

**LACTONAS**

---

$\delta$ -Butirolactona <sup>1,3</sup>	$\gamma$ -Octalactona <sup>2</sup>
$\gamma$ -Butirolactona <sup>2,11</sup>	$\gamma$ -Pentalactona <sup>6</sup>
$\gamma$ -Hexalactona <sup>2,5,6</sup>	$\gamma$ -Valerolactona <sup>2</sup>
$\gamma$ -Nonalactona <sup>2,5</sup>	$\alpha$ -Lactona <sup>9</sup>

---

**COMPUESTOS AZUFRADOS**

---

3-(Metil-tio)propionaldehído <sup>9,15</sup>	Dimetil trisulfuro <sup>3,4,7,8,9,10,12,15</sup>
3-Metil-tio propanol <sup>2</sup>	Metanetiol <sup>9,15</sup>
Carbon disulfuro <sup>12</sup>	Metil 3-(metil-tio)propanoato <sup>4</sup>
Dimetil disulfuro <sup>3,4,6,7,8,9,10,12,13</sup>	Metil etildisulfuro <sup>3</sup>
Dimetil tetrasulfuro <sup>4,8,9</sup>	Metil n-pentil disulfuro <sup>3,12</sup>

---

**COMPUESTOS CLORADOS**

---

2,2-Dicloroetanol <sup>6,9</sup>	Tetracloroetano <sup>6,10</sup>
2-Cloronaftaleno <sup>2,13</sup>	Tricloroetano <sup>10</sup>
Diclorobenceno <sup>6</sup>	Triclorometano (Cloroformo) <sup>2,5,6,8,9,11,13</sup>
Diclorometano <sup>6,8</sup>	

---

**FURANOS**

---

2,2,4-Trimetil-2,5-dihidrofurano <sup>1</sup>	2-Pentilfurano <sup>4,7,8,9,10,13,14</sup>
2,5-Dimetiltetrahidrofurano <sup>1,13</sup>	4-Propil 2-metilfurano <sup>10</sup>
2-Butilfurano <sup>10</sup>	5-etildihidro-2(3H)-furanona <sup>9</sup>
2-Etilfurano <sup>4,6,8,10</sup>	Dihidro-5-pentil-2(3H)-furanona <sup>9</sup>
2-Metil-4,5-dihidrofurano <sup>1</sup>	Tetrahidrofurano <sup>8</sup>

**Tabla II.6-** (Continuación)

<b>COMPUESTOS NITROGENADOS</b>	
2,6-Dimetil 3-etilpirazina <sup>9</sup>	3-Vinilpiridina <sup>4</sup>
2,6-Dimetilpirazina <sup>4, 7, 9, 12, 13</sup>	Acetamida <sup>9</sup>
Pirazina <sup>4, 8</sup>	Isovaleramida <sup>1</sup>
Trimetilpirazina <sup>4, 12</sup>	Propanodiamida <sup>1</sup>
2-Metilpirazina <sup>4</sup>	3-Metilbutamina <sup>11</sup>
Pirrol <sup>4, 12, 13</sup>	Feniletilamina <sup>1</sup>
1-Metil-2-pirrolidinona <sup>5</sup>	
<b>MISCELÁNEOS</b>	
alfa-Pineno <sup>9, 10, 12</sup>	Butil hidroxitolueno (BHT) <sup>5, 9</sup>
beta-Pineno <sup>10, 12</sup>	Farnesol <sup>5</sup>
Acido 1,2-Bencene-di- carboxílico <sup>5, 11</sup>	Limoneno <sup>4, 6, 8, 9, 10, 11, 12</sup>
2,4,6-Trimetil-1,3,5-trioxano <sup>5</sup>	Pentiloxirano <sup>1</sup>
3- Careno <sup>9, 12</sup>	

cantidad se encuentran los ácidos carboxílicos, lactonas, compuestos con azufre y compuestos clorados. La mayoría de los compuestos volátiles encontrados en jamón curado derivan de la autoxidación de los ácidos grasos insaturados, aunque algunos compuestos pueden ser el resultado de la acción de microorganismos o de la degradación de Strecker de aminoácidos, y otros pueden tener su origen en la alimentación animal como algunas cadenas de alcanos (Ruiz et al., 2001).

### **Aldehídos**

Constituye una de las familias más importantes en el análisis cuantitativo de compuestos volátiles presentes en el jamón curado (Sabio et al., 1998; García et al., 1991; López et al., 1992). Los aldehídos tienen mucha importancia en el aroma de jamón curado debido a su bajo umbral de percepción (Shahidi et al., 1986).

Los aldehídos lineales como hexanal, heptanal, octanal, y nonanal provienen principalmente de la degradación oxidativa de los ácidos grasos oleico, linoleico, linolénico y araquidónico. El hexanal proviene de la oxidación del ácido linoleico o de la oxidación del ácido linolénico esterificado. Es de destacar que la grasa de cerdo tiene altos niveles de ácido linoleico (López et al., 1992).

Los aldehídos con un bajo número de átomos de carbonos (C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>) tienen un aroma fuerte e irritante. En cambio los aldehídos intermedios (C<sub>5</sub>-C<sub>9</sub>) tienen un olor descrito como verde, aceite, grasa y, por último los aldehídos C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub> tienen un olor a cítrico, cáscara de naranja (Forss, 1972).

Por otra parte, los aldehídos ramificados y aromáticos como 2-metil-butanal, 3-metil-butanal, 3-metil-2-butenal, 4-metil-2-pentenal, fenil-acetaldehído, pueden provenir de la degradación de Strecker de los aminoácidos (García et al., 1991; López et al., 1992). En el jamón

curado, ésta es probablemente la ruta más importante en la formación de aldehídos ramificados (García et al., 1991). Además, en el jamón existe en alto contenido de aminoácidos debido a la intensa proteólisis y los bajos valores de actividad de agua que facilitan la generación de aldehídos ramificados (Barbieri et al., 1992). Esta ruta de formación se ha confirmado al observarse que cuando aumenta el contenido de aldehídos ramificados disminuye la mayor parte de los  $\alpha$ -aminoácidos, incluyendo leucina y isoleucina, que son los precursores de 3-metil-butanal y 2-metil-butanal, respectivamente (Ruiz et al., 1999).

Los compuestos derivados de aminoácidos como 2-metil-butanal y 3-metil-butanal, 2 metil-propanal, tienen una importante contribución en el aroma de jamón curado (Hinrichsen y Pedersen, 1995). En jamón Serrano se ha descrito el aroma de 3-metil-butanal como a queso-verde, asociados con el olor a queso y con olor verde producido al cortar grasa. Durante el proceso de elaboración de jamón curado la concentración de estos aldehídos ramificados aumenta por lo cual se han propuesto como indicadores del proceso de maduración (Ruiz et al., 1999).

Sabio et al. (1998) compara los compuestos volátiles presentes en diferentes tipos de jamón curado. Todos los aldehídos identificados se encuentran en los seis tipos de jamón estudiados (Bayona y Córcega de Francia, Ibérico y Serrano de España, Parma y Light de Italia). En el jamón Ibérico se encuentra comparativamente una mayor cantidad de estos compuestos, a excepción de benzaldehído que se encuentra en mayor cantidad en el jamón de Córcega y de acetaldehído que se encuentra en mayor cantidad en el jamón Serrano. Este último compuesto no ha sido identificado por otros autores en el jamón Serrano (Flores et al., 1997a; Dirinck et al., 1997) pero sí en el jamón de Parma (Hinrichsen y Pedersen, 1995).

Al utilizar la técnica de SPME en la extracción de compuestos volátiles, el área de respuesta obtenida para el 3-metil-butanal solo alcanza el 1% del total (Ruiz et al., 2001). Este compuesto volátil ha sido descrito como uno de los que se encuentra en mayor proporción en jamón curado, representando el 26,3% del área total de los compuestos volátiles, cuando se utiliza la técnica de extracción purga y trampa (Ruiz et al., 1999). Hay que tener en cuenta que, el área obtenida en cada compuesto por las técnicas que utilizan materiales adsorbentes (purga y trampa, SPME) no reflejan necesariamente la proporción de dichos compuestos en el espacio de cabeza. Cada compuesto tiene una diferente estructura y exhibe diferente volatilidad y también diferentes propiedades físicas que afectan a los coeficientes de partición entre los materiales adsorbentes y los compuestos (Ruiz et al., 2001).

### **Alcoholes**

Los alcoholes son en la mayor parte productos de oxidación de los lípidos (Shahidi et al., 1986). Más de 16 alcoholes se han identificado como productos de la descomposición oxidativa de lípidos. Por ejemplo, 1-propanol y 1-butanol pueden derivar del ácido miristoleico, 1-pentanol del ácido linoleico, 1-hexanol puede ser formado a partir del ácido palmitoleico y ácido oleico y 1-octanol de la oxidación de oleico (Forss, 1972). Por otra parte, los alcoholes ramificados como 2-metil-propanol, 2-metil-butanol y 3-metil-butanol derivan de los aminoácidos (Ruiz et al., 1999).

El umbral de percepción de estos compuestos es más elevado que el de los otros compuestos carbonilos (aldehídos) y, por lo tanto, su influencia en el aroma es menor (Drumm y Spanier, 1991). Sin embargo, en carne de cerdo se considera que los alcoholes de cadena lineal producen ciertas notas verdes, a madera y a grasa-floral y tienen una contribución importante en el aroma de jamón (Barbieri et al., 1992). Por otra parte, los alcoholes

insaturados como 1-penten-3-ol y 1-octen-3-ol de alta potencia aromática se han encontrado en jamón Ibérico, Serrano, Parma, y Bayona (tabla II.6).

En el estudio de comparación de los compuestos volátiles en los distintos tipos de jamón (Sabio et al., 1998) se ha encontrado que la concentración de los alcoholes insaturados (1-penten-3-ol y 1-octen-3-ol) y de pentanol es mucho más alta en jamón de Córcega. Los alcoholes ramificados (2-metil-propanol, 2-metil-butanol, y 3-metil-butanol) y el etanol son más abundantes en el jamón Bayona y Serrano. Los alcoholes secundarios (2-pentanol y 2-heptanol) se encuentran en mayor proporción en jamón Serrano, y los alcoholes de cadenas media (hexanol y heptanol) son más abundantes en el jamón Ibérico. Por otra parte, el efecto del tiempo de proceso sobre la generación de los alcoholes es importante ya que Flores et al. (1997a) han encontrado que el jamón Serrano sometido a un proceso de curado largo se caracteriza por una alta concentración de 2-propanol en comparación con otros alcoholes. Los niveles de 2-metil-propanol, 1-butanol, 1-penten-3-ol, 2-pentanol y 1-hexanol se ven reducidos en el jamón que ha sido sometido a un largo proceso de curado.

Al utilizar la técnica de SPME en la extracción de compuestos volátiles del espacio de cabeza de jamón, se obtiene que el 2-propanol representa el mayor porcentaje del área de respuesta respecto de los otros alcoholes identificados (Ruiz et al., 1998). Con la técnica de destilación a vacío y trampa fría aplicada en la extracción de los compuestos volátiles presentes en jamón Ibérico (García et al 1991) se extrae una gran proporción de alcoholes siendo del 22,27% del área de respuesta total. El alcohol en mayor proporción es feniletanol (el porcentaje de este compuesto alcanza el 10,27% del área total) que se forma a partir del catabolismo de fenilalanina y es responsable de ciertas notas frutales.

En jamón Serrano solo tres alcoholes se han descrito con aromas específicos 1-penten-3-ol se ha descrito con aroma a cebolla-tostada, 3-

metil-1-butanol tiene un aroma penetrante a hierba, descrito como aroma verde y 3-metil-2-hexanol es definido como aroma a patata-trigo (Flores et al., 1998). También se ha descrito a 1-octen-3-ol como constituyente del aroma a jamón curado y ha sido definido como responsable de notas de setas, polvo (Carrapiso et al., 2002). En jamón Francés se ha correlacionado la concentración de 1-butanol con el aroma a jamón curado y a carne curada (Buscailhon et al., 1994).

### **Hidrocarburos Alifáticos**

Las cadenas de alcanos, alquenos y alcadienos pueden ser producidas por división de los hidroperóxidos generados durante la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados como linoléico y linolénico y araquidónico (Shahidi et al., 1986). Los alcanos y alquenos con más de 6 carbonos son productos típicos de la oxidación lipídica (Berdagué et al., 1991).

En general, los alcanos no contribuyen significativamente al aroma y sabor de la carne debido a que no poseen ningún poder aromático (Shahidi et al., 1986)

### **Hidrocarburos Aromáticos**

Estos compuestos provienen en muchos casos de la oxidación de los ácidos grasos, por ejemplo, benzaldehído que proviene del ácido linoleico (Forss, 1972). Los hidrocarburos aromáticos como *o*-xileno y *p*-xileno tienen características completamente diferentes que dan olores a caramelo y frutales, respectivamente (Shahidi et al., 1986). En jamón Serrano, estos compuestos (*m*- o *p*-) xileno poseen un aroma descrito como ahumado fenólico, mientras que *o*-xileno se describe como aroma a caramelo-frutal (Flores et al., 1997a)

### **Cetonas**

Estos compuestos se forman a partir de la esterificación de varios alcoholes y ácidos carboxílicos (Shahidi et al., 1986). En el jamón Ibérico se encuentran sólo algunos de estos compuestos al utilizar la técnica de purga y trampa (López et al., 1992). Sin embargo, en el jamón Ibérico se ha encontrado una alta proporción de 2-propanona, al utilizar la técnica SPME. La presencia de este compuesto representa el 7,0% del área total (Ruiz et al., 2001).

En el jamón Francés, la presencia de 2-butanona, 2-pentanona y 2-hexanona, se ha correlacionado con el aroma a jamón curado y la presencia de 2-hexanona y 2-heptanona se ha correlacionado con el aroma a carne curada (Buscailhon et al., 1994). También, en el jamón Francés se ha observado que 2-pentanona, aumenta en las etapas finales del proceso de maduración, y que 2-propanona representa el 36% del área total de los compuestos volátiles identificados en carne fresca (Buscailhon et al., 1993).

Se ha descrito que 3-hidroxi-2-butanona contribuye con ciertas notas a mantequilla en carne cocida (Shahidi et al., 1986), aunque, en el jamón Serrano es identificado como responsable del olor a fresa, y 2,3-butanediona es responsable de notas a mantequilla (Flores et al., 1997a).

### **Ácidos Carboxílicos**

Los ácidos carboxílicos provienen de la hidrólisis de triglicéridos y fosfolípidos. Las enzimas responsables de esta hidrólisis son activas durante el proceso de curado (Motilva et al., 1993).

En la extracción con dióxido de carbono supercrítico de compuestos volátiles de jamón curado se obtiene en el extracto un alto porcentaje de ácidos carboxílicos (32%) (Timón et al., 1998), ya que la extracción de ácidos grasos y triglicéridos mejora al utilizar fluidos a alta presión (Merkle y Larick, 1994). Sin embargo, al aplicar esta técnica en jamón curado el alto

contenido de estos compuestos interfiere en la identificación de otros compuestos volátiles (Timón et al., 1998), al tener algunos ácidos similares índices de retención que compuestos de interés como el hexanal y el 1-octen-3-ol.

El efecto de la técnica de extracción para la detección de ácidos carboxílicos en el jamón curado es muy importante. En jamón Ibérico se han identificado hasta 15 ácidos carboxílicos cuando se utiliza la técnica de extracción de dióxido de carbono supercrítico (Timón et al., 1998). En cambio, en el espacio de cabeza de jamón Ibérico, se identifican 4 ácidos carboxílicos cuando la extracción se realiza mediante SPME y con la fibra de polidimetilsiloxano (PDMS). Además, con esta fibra sólo el ácido acético representa el 8,4 % de área total (Ruiz et al., 1998). Por otra parte, la fibra de Carboxen/polidimetilsiloxano (Car/PDMS) extrae 10 ácidos carboxílicos que representan un porcentaje del área del 22,5% (Ruiz et al., 2001), la técnica de purga y trampa extrae 7 ácidos carboxílicos en jamón Ibérico (López et al., 1992), aunque, con la misma técnica Ruiz et al. (1999) no detecta ácidos carboxílicos en dicho jamón.

En jamón de Parma se han identificado en total 7 ácidos carboxílicos diferentes al utilizar la técnica de purga y trampa (Barbieri et al., 1992; Hinrichsen y Pedersen, 1995). En jamón Francés se encuentran 10 ácidos carboxílicos diferentes cuando se utiliza la técnica de extracción de destilación a vacío y trampa fría (Berdagué et al., 1991), pero cuando se utiliza la técnica de purga y trampa no se han identificado ácidos carboxílicos (Buscailhon et al., 1993).

### **Ésteres**

Estos compuestos contribuyen con ciertas notas frutales en los alimentos. Los ésteres se forman de la interacción de ácidos grasos libres y

alcoholes generados durante la oxidación lipídica en el tejido intramuscular (Shahidi et al., 1986).

Una gran cantidad de ésteres han sido identificados en jamón de Parma y son característicos del aroma de dicho jamón curado (Barbieri et al., 1992), pero se ha encontrado un porcentaje muy bajo de estos compuestos en el jamón curado español (García et al., 1991; López et al., 1992; Ruiz et al., 1998; 1999; 2001) y también se ha encontrado en bajo porcentaje en el jamón Francés (Berdagué et al., 1991; Buscailhon et al., 1993). Aunque en jamón Bayona y Serrano se ha encontrado que tienen una cantidad relativamente alta de etanol y también tiene altas cantidades de etil ésteres (Sabio et al., 1998). El efecto inhibitor de la oxidación lipídica que ejerce el nitrito es probablemente la razón de la baja concentración encontrado en jamón de origen Español y Francés (Flores et al., 1998).

En el espacio de cabeza de jamón Serrano se han encontrado ésteres de ácidos con  $C_1$ - $C_{10}$  que contribuyen con ciertas aromas frutales como metil-2-metil-propanoato, etil-butanoato, etil-2-metilbutanoato y se ha descrito con aroma dulce-caramelo. Por otra parte, el metil-hexanoato es el único éster encontrado en jamón Serrano que tiene aroma a carne cocida (Flores et al., 1998).

### **Lactonas**

Las lactonas resultan de la degradación de lípidos por la formación de compuestos cíclicos a partir de los correspondientes hidroxiaácidos que son sub-productos del metabolismo de los ácidos grasos (Forss, 1972).

En el jamón curado se ha identificado la presencia de algunas lactonas (tabla II.6). En el jamón Parma no se identifican estos compuestos mientras que en jamón Francés se observa que  $\gamma$ -pentalactona disminuye en el proceso (Buscailhon et al., 1993).

Las  $\gamma$ -lactonas tienen un bajo umbral de percepción (Ruiz et al., 2002) y se han asociado con el aroma a carne (Shahidi et al., 1986). Las lactonas con C<sub>7</sub>-C<sub>9</sub> predominan en el aroma de grasa de cerdo caliente (Forss, 1972).

### **Compuestos Azufrado**

Los compuestos volátiles que contienen azufre se forman a partir de aminoácidos azufrados como cisteína, cistina y metionina mediante la degradación de Strecker (Shahidi et al., 1986). Estos compuestos que contienen azufre son importantes en el aroma y sabor de la carne porque tienen un bajo umbral de percepción (Chang y Petersen., 1977; Drumm y Spanier, 1991). El compuesto dimetil disulfuro posee un aroma definido como a “piés”, pero cuando el proceso de curado es largo la concentración de este compuesto disminuye (Flores et al., 1997a). El metional (3-metil-tio-propanalaldehído) es considerado como una sustancia aromática (aroma a patata cocida) importante en el olor de carne debido a su bajo umbral de percepción (Ruiz et al., 2002).

### **Compuestos clorados**

En el jamón Parma no se han detectado compuestos clorados (Barbieri et al., 1992; Hinrichsen y Pedersen, 1995; Bolzoni et al., 1996). En el jamón Serrano sólo se han detectado tres compuestos clorados diferentes (2-cloronaftaleno, 2-diclorometano, triclorometano (Flores et al., 1997a; Dirinck et al., 1997). El origen de estos compuestos es probablemente por residuos de pesticidas ingeridos por los cerdos (Buscaillon et al., 1993). También, se ha encontrado triclorometano (cloroformo) en alta concentración en jamón Ibérico al utilizar la técnica de SPME. Sin embargo, la presencia de este compuesto se ha descrito como una contaminación de laboratorio (Ruiz et al., 1998).

### **Furanos**

Estos compuestos se forman a partir de la oxidación de ácidos grasos y contribuyen al olor a carne cocinada (Shahidi et al., 1986).

Se ha descrito que el compuesto 2-pentil-furano es un producto de la oxidación de ácido linoleico (Ruiz et al., 2002). Este compuesto se ha identificado en jamón Ibérico (Ruiz et al., 1998; 1999; 2001), en jamón Serrano (Flores et al., 1997a) y en jamón de Parma (Barbieri et al., 1992; Bolzoni et al., 1996). En jamón Serrano este compuesto ha sido definido como aroma a jamón (Flores et al., 1997a).

### **Compuestos Nitrogenados**

En estos compuestos destacan las pirazinas por su poder aromático. Las pirazinas son productos de la reacción de Maillard que ocurre principalmente cuando la carne es cocinada (Mottran y Edwards, 1983; Mottran, 1985; Mottran, 1998). La temperatura en el proceso de jamón curado no favorece la formación de estos compuestos, que normalmente se encuentran en carnes cocinadas (Shahidi et al., 1986), ya que durante la fabricación del jamón curado las temperaturas usadas son bajas (<30° C). El proceso de deshidratación puede favorecer esta reacción, pero solo se produce una pequeña cantidad de pirazinas (Sabio et al., 1998).

En los estudios realizados para identificar compuestos volátiles en jamón curado se han identificado sólo cinco pirazinas diferentes (ver tabla II.6). Estos compuestos no se encuentran en estudios realizados en jamón Ibérico, ni tampoco se identifican en estudios realizados en jamón Francés. En jamón Serrano se han identificado sólo dos; metilpirazina y 2,6-dimetilpirazina (Flores et al., 1997a).

Las pirazinas son consideradas como un componente clave en los alimentos por impartir ciertas notas de aroma a frutos secos y tostado (Barbieri et al., 1992). En jamón Serrano la metilpirazina se ha asociado con

aromas a frutos secos y en el caso de 2,6 dimetilpirazina con aroma a frutos secos tostados (Flores et al., 1997a). La nota aromática de estos compuestos es muy importante en la percepción total, ya que la mayoría de estos compuestos nitrogenados tiene un bajo umbral de percepción (Ruiz et al., 2002).

### **Terpenos**

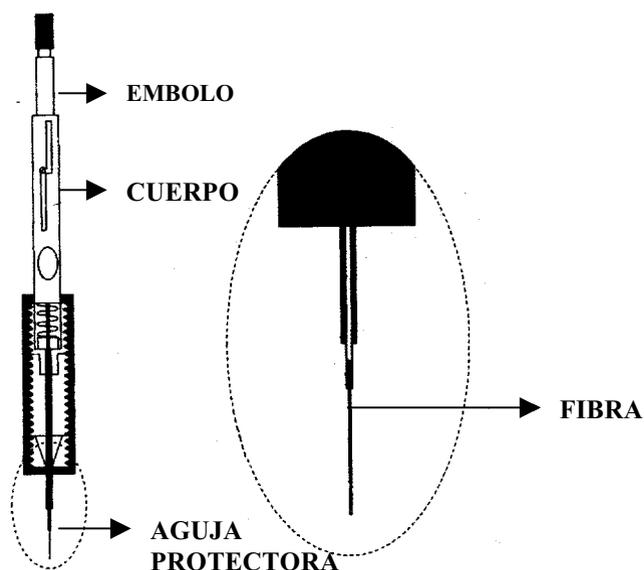
La presencia de limoneno y otros terpenos es usual en jamón curado, y se debe a que estos compuestos son constituyentes de la fracción insaponificable de la grasa vegetal. Estos compuestos provienen de la alimentación y son acumulados en la grasa del animal (Sabio et al., 1998). Estos compuestos se encuentran en mayor proporción en los jamones curados de Bayona y de Córcega, y su origen se debe probablemente a la aplicación de pimienta negra en la superficie de estos jamones franceses durante su fabricación.

## **II.4.- LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME) PARA EL ANÁLISIS DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES**

La microextracción en fase sólida (SPME) es una técnica relativamente nueva y versátil que permite obtener y concentrar compuestos volátiles desde el espacio de cabeza (Arthur y Pawliszyn, 1990). La adsorción de compuestos volátiles desde el espacio de cabeza se realiza al exponer la fibra de SPME en el espacio de cabeza donde los compuestos responsables del aroma y sabor son adsorbidos por la fibra de SPME y posteriormente son liberados en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases para su correspondiente separación y análisis. La desorción térmica elimina completamente los compuestos orgánicos adsorbidos y permite la

inmediata utilización de la fibra (Zhang y Pawliszn, 1993; Zhang et al., 1994).

La unidad de SPME está compuesta por un émbolo, un cuerpo y una aguja protectora (figura II.5). El émbolo permite exponer la fibra que se encuentra protegida en la aguja protectora. La exposición de dicha fibra permite que los compuestos volátiles sean adsorbidos desde el espacio de cabeza así como la desorción térmica de dichos compuestos en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases permiten su análisis. El cuerpo contiene un indicador que controla la profundidad de la inyección tanto en el espacio de cabeza como en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases. La aguja contiene la fibra de SPME, que consiste en una fibra de sílice recubierta por una capa de fase estacionaria selectiva.



**Figura II.5.-** Diagrama de la unidad de SPME (Zhang et al., 1994).

Los compuestos volátiles adsorbidos por la fibra son desorbidos en el cromatógrafo de gases. Cuando aumenta la temperatura, el coeficiente de partición entre la fibra / gas disminuye y la habilidad de la fibra para retener los compuestos adsorbidos decrece rápidamente. La velocidad de flujo del gas portador, constante en el inyector del cromatógrafo de gases, también ayuda a desorber los compuestos. Los compuestos volátiles y semi-volátiles son desorbidos en fracción de segundos cuando la temperatura se encuentra entre 150°C y 250°C (Zhang et al., 1994).

Esta técnica ha sido inicialmente desarrollada para adsorber compuestos volátiles desde soluciones acuosas (Arthur y Pawliszyn, 1990), pero su uso actual se ha extendido a la adsorción de compuestos volátiles desde el espacio de cabeza de multitud de alimentos (vinos, café, zumo de naranja, queso, frutas, etc) (tabla II.7). Sin embargo, las aplicaciones de la técnica de SPME para el análisis de compuestos volátiles en carne y productos cárnicos son muy escasas. Solo existen algunos estudios relacionados con los compuestos volátiles presentes en carne de pavo cocinada (Brunton et al., 2000; 2001), carne de cerdo cocinada (Elmore et al., 2000; Estévez et al., 2003), y jamón curado (Ruiz et al., 1998; 2001). El objeto del estudio y las condiciones (tipo de fibra) se detallan en la tabla II.7.

#### **II.4.1.- Aspectos teóricos de la adsorción de los compuestos volátiles por la fibra de SPME**

Cuando la fibra de SPME es expuesta para la adsorción de los compuestos volátiles, existen procesos de equilibrio de partición entre las fases (Zhang y Pawliszyn, 1993), es decir, entre la fase líquida, (esta fase contiene la solución de compuesto volátil), la fase gas (que corresponde al espacio de cabeza) y la fase sólida (es decir, la fibra de SPME).

**Tabla II.7.-** Análisis de compuestos volátiles desde el espacio de cabeza de alimentos, utilizando la técnica de SPME

MATRIZ	FIBRA	ESTUDIO	REFERENCIA
Café Té	Poliamida 170 µm	Determinación de cafeína en bebidas	Hawthorne et al. (1992)
Café	PDMS 100 µm PDMS 7 µm	Caracterización de compuestos volátiles	Bicchi et al. (1997)
Café	Car/PDMS 75 µm Cw/DVB 65 µm PA 85 µm PDMS 100 µm PDMS/DVB 65 µm	Comparación de los compuestos volátiles adsorbidos por las diferentes fibras	Roberts et al. (2000)
Café	Cw/DVD 65 µm PDMS 100 µm	Evaluación y comparación de diferentes fibras	Costa Freitas et al. (2001)
Bebida cola	PA 85 µm PDMS 100 µm	Comparación de métodos de extracción de compuestos volátiles	Elmore et al. (1997)
Productos destilados de maíz	Car /PDMS 75µm	Caracterización de compuestos volátiles	Biswas y Staff (2001)
Vino	Cw/DVB 65 µm	Método para analizar compuestos ilegales (metil-isotiocianato)	Gandini y Riguzzy (1997)
Vino	Cw/DVB 65 µm PDMS 100 µm	Análisis de diacetilo	Hayasaka y Bartowsky (1999)
Vino	Cw/DVB 65 µm	Método de análisis de benzotiazol	Bellavia et al. (2000)
Cerveza	PA 85 µm	Análisis de alcoholes y ésteres	Jelen et al. (1998)

Tabla II.7.- (Continuación)

MATRIZ	FIBRA	ESTUDIO	REFERENCIA
Cerveza	Car/PDMS 75 µm	Análisis de dimetil disulfuro	Scarlata y Ebeler (1999)
Zumo de naranja	PA 85 µm PDMS 100 µm	Desarrollo de un método cualitativo para determinar la cantidad de volátiles responsables del flavor	Steffen y Pawliszyn (1996)
Zumo de naranja	PDMS 100 µm	Análisis cualitativo y cuantitativo de compuestos volátiles	Jia et al. (1998)
Manzana	PDMS 100 µm	Análisis cuantitativo y cualitativo de compuestos volátiles	Song et al. (1997)
Frambuesa	PDMS 100 µm	Evolución cuantitativa y cualitativa de compuestos volátiles y antocianinos	De Aencos et al. (2000)
Banana	PDMS 100 µm	Determinación de la importancia del sustrato y las enzimas en la formación de ésteres durante el almacenamiento	Wyllie y Fellman (2000)
Zumo de tomate	Cw/DVB 65 µm	Identificación de compuestos volátiles y optimización de parámetros para el proceso de blanqueamiento térmico	Servili et al. (2000)
Tomate, Fresa	Cw/DVB 65 µm PDMS 100 µm PDMS/DVB 65 µm	Análisis de compuestos volátiles	Song et al. (1998)
Aceite de vegetales	Cw/DVB 65 µm DVB/Car/PDMS 50/30 µm PA 85 µm PDMS 100 µm	Desarrollo de un procedimiento para determinar compuestos volátiles formados durante la peroxidación de ácidos grasos	Jelen et al. (2000)

Tabla II.7.- (Continuación)

MATRIZ	FIBRA	ESTUDIO	REFERENCIA
Soja	DVB/Car/PDMS 50/30 $\mu\text{m}$ PDMS 100 $\mu\text{m}$	Identificación de compuestos volátiles	Boué et al. (2003)
Extracto de vainilla	Cw/DVB 65 $\mu\text{m}$ PA 85 $\mu\text{m}$ PDMS 100 $\mu\text{m}$	Método cualitativo para medir compuestos volátiles	Sostaric et al. (2000)
Queso	PA 85 $\mu\text{m}$ PDMS 100 $\mu\text{m}$	Extracción e identificación de compuestos volátiles	Chin et al. (1996)
Queso	Car/PDMS 75 $\mu\text{m}$ Cw/DVB 65 $\mu\text{m}$ PA 85 $\mu\text{m}$ PDMS 100 $\mu\text{m}$ PDMS/DVB 65 $\mu\text{m}$	Estudio combinado de SPME y Cromatografía Olfatómica	Dufour et al. (2001)
Carne de pavo	Car /PDMS 75 $\mu\text{m}$ Cw/DVB 65 $\mu\text{m}$ PDMS/DVB 65 $\mu\text{m}$	Medida cuantitativa de la cantidad de hexanal y pentanal	Brunton et al. (2000)
Carne de pavo	Car//PDMS 85 $\mu\text{m}$ Car/PDMS 75 $\mu\text{m}$ DVB/Car 50/30 $\mu\text{m}$ PDMS/DVB 65 $\mu\text{m}$	Efecto de la temperatura y la presión en la adsorción de compuestos volátiles	Brunton et al. (2001)
Cerdo Ibérico y magro	DVB/Car/PDMS 50/30 $\mu\text{m}$	Análisis de compuestos volátiles en carne cocinada y refrigerada	Estévez et al. (2003)
Jamón Ibérico	PDMS 100 $\mu\text{m}$	Análisis de compuestos volátiles	Ruiz et al. (1998)
Jamón curado	Car/PDMS 75 $\mu\text{m}$	Nueva idea para la extracción de compuestos volátiles	Ruiz et al. (2001)

Cuando las fases se encuentran en equilibrio, la cantidad total de compuesto volátil ( $C_0V_2$ ) es igual a la suma de las cantidades de volátiles presente en la fibra, en el espacio de cabeza y en la solución (Ec. 5).

$$C_0V_2 = C_1^\infty V_1 + C_2^\infty V_2 + C_3^\infty V_3 \quad \text{Ec. 5}$$

donde:

$C_0$  : Concentración de volátil inicial en la solución acuosa ( $\text{mol L}^{-1}$ )

$C_1^\infty$ : Concentración en equilibrio de compuesto volátil en la fibra ( $\text{mol L}^{-1}$ )

$C_2^\infty$ : Concentración en equilibrio de compuesto volátil en la solución acuosa ( $\text{mol L}^{-1}$ )

$C_3^\infty$ : Concentración en equilibrio de compuesto volátil en el espacio de cabeza ( $\text{mol L}^{-1}$ )

$V_1$ : Volumen de la fibra (L)

$V_2$ : Volumen de la solución acuosa (L)

$V_3$ : Volumen del espacio de cabeza (L)

Si se define un coeficiente de partición entre la fibra de SPME y el espacio de cabeza como:

$$K_1 = \frac{C_1^\infty}{C_3^\infty} \quad \text{Ec.6}$$

Y el coeficiente de partición entre el espacio de cabeza y la solución acuosa como:

$$K_2 = \frac{C_3^\infty}{C_2^\infty} \quad \text{Ec.7}$$

La cantidad adsorbida por la fibra ( $M_1$ ) es:

$$M_1 = C_1^\infty V_1 = \frac{C_0 V_1 V_2 K_1 K_2}{K_1 K_2 V_1 + K_2 V_3 + V_2} \quad \text{Ec.8}$$

El potencial químico del compuesto volátil en el espacio de cabeza se puede expresar como:

$$\mu_3 = \mu^0_{(T)} + RT \ln(P_3^V/P^0) \quad \text{Ec.9}$$

donde:

$\mu_3$ : Potencial químico del compuesto volátil en el espacio de cabeza (kJ/mol)

$\mu^0_{(T)}$ : Potencial químico del compuesto volátil a la presión estándar  $P^0$  ( $P^0=1 \text{ atm}$ ) y temperatura absoluta

$P_3^V$ : presión de vapor del compuesto volátil en la fase vapor (atm)

De igual forma, el potencial químico del compuesto volátil en la fibra y en la fase acuosa puede ser expresado como:

$$\mu_1 = \mu^0_{(T)} + RT \ln(P_1^V/P^0) \quad \text{Ec.10}$$

$$\mu_2 = \mu^0_{(T)} + RT \ln(P_2^V/P^0) \quad \text{Ec.11}$$

donde:

$\mu_1$ : Potencial químico del compuesto volátil en la fibra (kJ/mol)

$\mu_2$ : Potencial químico del compuesto volátil en la solución acuosa (kJ/mol)

$P_1^V$ : presión de vapor del compuesto volátil que está en equilibrio con el compuesto volátil en la fibra (atm)

$P_2^V$ : presión de vapor del compuesto volátil que está en equilibrio con el compuesto volátil en la solución acuosa (atm)

De acuerdo a la ley de Henry:

$$P_1^V = K_F C_1^\infty \quad \text{Ec.12}$$

$$P_2^V = K_H C_2^\infty \quad \text{Ec.13}$$

donde:

$K_F$ : Constante de Henry del compuesto volátil en la fibra

$K_H$ : Constante de Henry del compuesto volátil en la solución acuosa

Cuando las tres fases se encuentran en equilibrio, el potencial químico de las tres fases es idéntico

$$\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 \quad \text{Ec.14}$$

A partir de las ecuaciones que define el potencial químico en cada fase (Ec.9, Ec.10, Ec.11) y la ecuación de equilibrio químico (Ec.14), se obtiene:

$$P_1^V = P_2^V = P_3^V \quad \text{Ec.15}$$

Si se considera que el compuesto volátil se comporta como un gas ideal, entonces es válida la ecuación general de los gases ideales:

$$P_3^V V_3 = N_v RT \quad \text{Ec.16}$$

donde:

$N_v$ : Número de moles de compuesto volátil en el espacio de cabeza

A partir de la ecuación anterior (Ec.16), se obtiene:

$$P_3^V = C_3^\infty RT \quad \text{Ec.17}$$

De las ecuaciones Ec.12, Ec.13, Ec.15 y Ec.17 es posible obtener los coeficientes de partición en función de las constantes de Henry:

$$K_1 = \frac{C_1^\infty}{C_3^\infty} = \frac{RT}{K_F} \quad \text{Ec.18}$$

$$K_1 = \frac{C_1^\infty}{C_3^\infty} = \frac{RT}{K_F} \quad \text{Ec.19}$$

El coeficiente de partición entre la fibra y la solución acuosa puede ser expresado como:

$$K_{\text{fibra-agua}} = \frac{K_H}{K_F} = K_1 K_2 \quad \text{Ec.20}$$

donde:

$K_{\text{fibra-agua}}$ : Coeficiente de partición entre la fibra y la solución acuosa

Por tanto, la cantidad adsorbida por la fibra ( $M_1$ , Ec.8) puede ser expresada en función del coeficiente de partición entre la fibra y la solución acuosa, de la siguiente forma:

$$M_1 = \frac{C_0 V_1 V_2 K_{\text{fibra - agua}}}{K_{\text{fibra - agua}} V_1 + K_2 V_3 + V_2} \quad \text{Ec.21}$$

La cantidad adsorbida por la fibra se puede calcular a partir de la concentración inicial de compuesto volátil, del coeficiente de partición entre la fibra y agua, el coeficiente de partición entre la fibra y aire, y el volumen de espacio de cabeza, volumen de la fibra y volumen de la solución acuosa.

#### II.4.2.- Optimización de las condiciones de operación

La velocidad de la extracción es controlada por el fenómeno de transporte de masa de los compuestos volátiles desde la matriz a la fibra de SPME. Varios factores incrementan la sensibilidad de esta técnica de extracción, entre ellos se puede mencionar la temperatura de análisis, características de la matriz, tiempo de exposición, fuerza iónica de la matriz, estructura del compuesto volátil, y polaridad de la fibra. Por todo ello, en la aplicación de esta técnica de extracción y concentración de compuestos volátiles se deben tener en cuenta las condiciones de operación.

Se considera que la extracción con la fibra de SPME es completa cuando la concentración de compuesto volátil alcanza el equilibrio entre la matriz de ensayo y la fibra (Roberts et al., 2000). Sin embargo, el tiempo de equilibrio depende del tipo de compuesto volátil, de la matriz, de las condiciones de agitación y de la temperatura.

Para la cuantificación de los compuestos volátiles no se requiere que exista equilibrio entre la fibra y el espacio de cabeza, pero sí se deben realizar en las mismas condiciones la adsorción de los compuestos volátiles desde los patrones y en cada ensayo (Jelen et al., 1998).

En el análisis cuantitativo de compuestos volátiles utilizando la fibra de SPME se requiere una buena reproducibilidad entre los ensayos y debe existir una respuesta lineal entre el compuesto volátil adsorbido por la fibra y la concentración del compuesto volátil en el espacio de cabeza (Brunton et al., 2000). En este sentido, al utilizar la técnica de SPME en el análisis de compuestos volátiles del zumo de naranja, se han encontrado bajos coeficientes de variación, y una correlación lineal entre la concentración de dichos compuestos y el área de respuesta. Por tanto, la técnica de SPME es adecuada para el análisis cuantitativo y cualitativo de compuestos volátiles presentes en el zumo de naranja (Jia et al., 1998).

En el análisis de alimentos, donde los compuestos tienen afinidades diferentes por la fibra y se encuentran en concentraciones diferentes, es posible que la mayoría de los compuestos no se encuentren en el intervalo lineal, debido a la alta sensibilidad de la fibra de SPME. Una alternativa para solucionar este problema es la dilución de la matriz o la reducción del tiempo de adsorción (Roberts et al., 2000).

Algunos compuestos volátiles que tienen alta afinidad por la fibra, es decir, el coeficiente de partición  $K_1$  muy alto, son altamente adsorbidos por la fibra y pueden reducir la adsorción de otros compuestos. Este fenómeno de competición ocurre cuando la concentración excede el límite superior del intervalo lineal. Górecki et al. (1999) observan este fenómeno de competición al utilizar las fibras PDMS/DVB y Caw/DVB. Este efecto es semejante en ambas fibras, donde se extrae más 4-metil-2-pentanona, si la solución contiene solo esta cetona. La cantidad adsorbida por la fibra disminuye cuando la solución contiene 4-metil-2-pentanona y benceno, ya que la constante de afinidad del benceno por las fibras es mayor que la constante de afinidad de 4-metil-2-pentanona por las fibras.

Para evitar que ocurra este fenómeno de competición se puede reducir el tiempo de extracción. De esta manera, se reduce la posibilidad de

sobrecargar la fibra, especialmente cuando se analizan juntos compuestos de baja y alta afinidad (Roberts et al., 2000), como ocurre en los alimentos.

La posición de la fibra en el puerto de inyección, es decir, la profundidad a la que es inyectada la fibra para su desorción en el puerto de inyección del cromatógrafo tiene un impacto significativo en el proceso de desorción (Arthur y Pawliszyn, 1990). Además, el tiempo necesario para la desorción de los compuestos volátiles en el cromatógrafo depende de la temperatura del inyector, debido a que la afinidad entre el compuesto volátil y la fibra disminuye con la temperatura.

#### **II.4.3.- Selección de la fibra de SPME**

La selección de una fibra de SPME adecuada resulta de gran importancia para establecer las condiciones de operación para la extracción y análisis de compuestos volátiles.

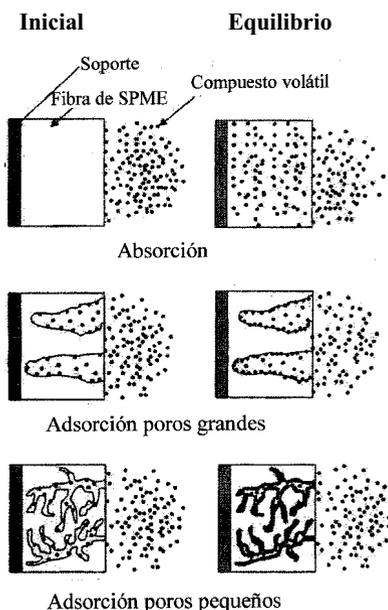
La selección de la fibra recubierta de SPME es función de la polaridad del compuesto y de su peso molecular. Compuestos volátiles o de bajo peso molecular generalmente requieren una fibra recubierta con 100  $\mu\text{m}$  de polidimetilsiloxano (PDMS). Compuestos semivolátiles o de peso molecular más alto se extraen más eficientemente con una fibra de 30  $\mu\text{m}$  de PDMS o de 7  $\mu\text{m}$  de PDMS. Para extraer analitos muy polares en muestras polares es recomendable usar una fibra recubierta con 85  $\mu\text{m}$  de poliacrilato (PA) (Zhang et al, 1994). Analitos más polares como los alcoholes y las aminas, son adsorbidos más eficientemente y liberados más rápidamente con la fibra de 65  $\mu\text{m}$  de polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB). Para el análisis de compuestos volátiles a nivel de trazas se recomienda el uso de 75  $\mu\text{m}$  carboxen/polidimetilsiloxano (Car/PDMS) y para un intervalo de

compuestos ( $C_3$ - $C_{20}$ ) se recomienda la fibra de 50/30 divinilbenzeno/carboxen en PDMS (DVB/Car/PDMS) (Pillonel et al., 2002).

Dufour et al. (2001) evalúa la extracción de compuestos volátiles de queso desde el espacio de cabeza con diferentes fibras. Los compuestos volátiles extraídos por las fibras incluyen ácidos grasos, lactonas, compuestos carbonilo y ésteres. La fibra de Car/PDMS 75  $\mu$ m extrae la mayor cantidad de compuestos volátiles desde el espacio de cabeza, seguido en orden decreciente por las fibras de PDMS/DVB 65  $\mu$ m, carbowax/polidimetilsiloxano (Cw/PDMS) 65  $\mu$ m, PA 85  $\mu$ m y PDMS 100  $\mu$ m. Las fibras bi-polares PDMS/DVB y, en menor grado, la fibra bi-polar Car/PDMS, mostraron la mayor selectividad, es decir, el mayor número de compuestos adsorbidos. Las fibras con polaridad simple (PA, PDMS, Cw/PDMS) extraen un número inferior de compuestos. Así pues, las fibras bi-polares son capaces de extraer una variedad más amplia de compuestos respecto de las fibras de polaridad simple.

Górecki et al. (1998) identifica dos tipos de fibra según el proceso de extracción de los compuestos. En el primer grupo se encuentran las fibras de PDMS y PA, que extraen los compuestos volátiles vía absorción. La fibra de PDMS es un líquido muy viscoso que parece un sólido. La fibra de PA es un sólido cristalino que se convierte en líquido a temperaturas de desorción. Las fibras de PDMS/DVB, Cw/DVB, y Car constituyen el otro grupo de fibras que en la primera fase de la extracción se comportan como un sólido poroso, extrayendo los compuestos vía adsorción. Los fundamentos de la adsorción y absorción son diferentes, la figura II.6, muestra el proceso de extracción por absorción y adsorción al utilizar las fibras de SPME en la etapa inicial y en la etapa de equilibrio.

El compuesto volátil inicialmente es atraído por la superficie de la fibra. El coeficiente de difusión determina si los compuestos migran al interior o se mantienen en la superficie de la fibra. La difusión de los



**Figura II.6.-** Extracción de compuestos volátiles por la fibra de SPME vía absorción y adsorción. (Górecki et al., 1998).

compuestos volátiles en la fibra de PDMS es relativamente rápida y esta fibra extrae compuestos volátiles vía absorción. Los coeficientes de difusión de la fibra de PA son bajos, pero todavía lo bastante grande para que el mecanismo de extracción sea la absorción.

Por otra parte, en las fibras DVB y Car los coeficientes de difusión de los compuestos volátiles son muy pequeños y el tiempo de análisis con la fibra de SPME es breve. A efectos de análisis el proceso de extracción de estas fibras es la adsorción ya que los compuestos volátiles permanecen sobre la superficie de fibra (Górecki et al., 1998).

Otro factor que afecta la eficiencia en la adsorción de la fibra de SPME es el tamaño del compuesto a extraer. Compuestos volátiles de bajo peso molecular se extraen mejor utilizando fibras porosas como Car o DVB. Un claro ejemplo es la extracción de ácidos grasos de cadena corta presentes

en el espacio de cabeza. Estos compuestos son adsorbidos eficientemente por la fibra de Car/PDMS, pero esta extracción disminuye cuando la cadena de ácido graso aumenta. Por otra parte, las fibras PA, PDMS, PDMS/DVB y Cw/DVB alcanzan una adsorción del ácido decanoico muy similar demostrando que la eficiencia de adsorción de estas fibras aumenta con la longitud de la cadena (Dufour et al., 2001).

Brunton et al. (2000) evaluaron la adsorción cuantitativa de hexanal presente en la carne de pavo. Dichos autores encontraron que la fibra Car/PDMS es mucho más sensible que las Cw/PDMS y PDMS/DVB. Sin embargo, al evaluar las mezclas de aldehídos (C<sub>5</sub>-C<sub>9</sub>) utilizando diferentes fibras (Car/PDMS y PDMS/DVB), el área de respuesta de cada aldehído en forma individual es muy similar al área de respuesta obtenida en la mezcla de aldehídos. Por otra parte, al utilizar la fibra Cw/PDMS, el área obtenida es mucho menor que la obtenida por las otras dos fibras, tanto con la mezcla de aldehídos, como con cada aldehído en forma individual.

#### **II.4.4.- Factores que afectan a la adsorción de compuestos volátiles por la fibra de SPME**

La fibra de SPME está compuesta por un soporte y por una fibra de sílice recubierta con una capa de una fase estacionaria selectiva. Cuando la fibra de SPME es expuesta para el análisis ocurren procesos de equilibrio de partición entre la fibra de SPME y el espacio de cabeza. El tiempo requerido para alcanzar dicho equilibrio y la cantidad de compuesto volátil adsorbida por la fibra de SPME se ve afectada por factores tales como la presencia de sal, agitación, temperatura y tipo de fibra (Jelen et al., 1998; Jia et al., 1998; MacGillivray et al., 1994). En el caso del tipo de fibra ya se ha descrito el efecto que tienen los distintos recubrimientos (apartado II.4.3).

#### II.4.4.1.- Efecto de la fuerza iónica

La presencia de electrolitos puede influenciar la adsorción de la fibra de SPME, cambiando las propiedades de la superficie del líquido y disminuyendo la solubilidad de compuestos hidrofóbicos en la fase acuosa (Yang y Peppard, 1994). En la mayoría de los compuestos estudiados, se ha observado que la adsorción de la fibra de SPME aumenta con el aumento de la fuerza iónica.

Jelen et al. (1998) estudia el efecto de la concentración de sal sobre la adsorción de compuestos volátiles desde el espacio de cabeza. La fibra de SPME de PA adsorbe desde el espacio de cabeza más alcoholes y ésteres presentes en la cerveza cuando la concentración de cloruro de sodio aumenta. Además, la adición de cloruro de sodio a la cerveza permite una disminución en el límite de detección, es decir, la fibra de SPME adsorbe una mayor cantidad de compuesto volátil y, por lo tanto, esta práctica se puede utilizar para analizar compuestos de interés como ésteres que se encuentran presentes en trazas.

En la adsorción con la fibra de PDMS 100  $\mu\text{m}$ , se observa que la adición de cloruro de sodio en solución tiene un efecto positivo sobre la extracción de hidrocarburos aromáticos (beceno, tolueno, etilbenceno, *p*- y *m*-xileno) desde el espacio de cabeza de soluciones acuosas (MacGillivray et al., 1994). Dependiendo del tipo de compuesto, la adsorción puede aumentar con la concentración de cloruro de sodio (Yang y Peppard, 1994). Sin embargo, se ha observado que con otros compuestos volátiles (*cis*-3- hexenil acetato, etil acetato, geranial), la adsorción aumenta inicialmente con la concentración de sal y posteriormente la adsorción se estabiliza. En el caso de etil hexanoato, ácido hexanoico y triacetina, se ha observado que la adsorción aumenta inicialmente con la concentración de cloruro de sodio y luego esta adsorción disminuye con el incremento de dicha concentración.

En otros casos (el limoneno, o la anetola y la  $\beta$ -ionona), se ha observado que la adsorción en la fibra de SPME decrece con la concentración de sal (Yang y Peppard, 1994).

#### **II.4.4.2.- Efecto de la temperatura**

La temperatura disminuye el tiempo requerido para alcanzar el equilibrio entre el espacio de cabeza y la fibra de SPME pero, a su vez, disminuye la cantidad de volátil adsorbida por la fibra de SPME desde el espacio de cabeza. Al aumentar la temperatura, aumenta la energía cinética de las partículas produciendo un aumento en el coeficiente de partición entre el espacio de cabeza y la solución acuosa ( $K_2$ ). Sin embargo, el proceso de adsorción de los compuestos volátiles por la fibra de SPME es exotérmico, por lo que el coeficiente de partición entre la fibra y el espacio de cabeza ( $K_1$ ) disminuye. Esto se traduce en una disminución de la cantidad adsorbida por la fibra desde el espacio de cabeza cuando la temperatura aumenta (Jia et al., 1998).

Este efecto se ha descrito por MacGillivray et al. (1994) utilizando la fibra de PDMS de 100  $\mu\text{m}$ . Se observa que la cantidad de compuesto volátil adsorbida disminuye al aumentar la temperatura desde 22,5° a 40 °C. La temperatura más baja favorece el proceso de adsorción, aunque el efecto de la adsorción por la fibra a una temperatura inferior es mayor que el incremento de la concentración del compuesto volátil en la fase vapor por efecto del incremento de la temperatura de extracción a 40 °C (MacGillivray et al., 1994).

Jia et al. (1998) en el análisis de compuestos volátiles presentes en zumo de naranja, y utilizando fibras de SPME de PDMS de 100  $\mu\text{m}$ , observan que el área total de respuesta disminuye con el aumento de la temperatura de análisis desde 25 °C a 80 °C. Además, con el aumento de la

temperatura disminuye el tiempo necesario para que se alcance el equilibrio entre la fibra y el espacio de cabeza, ya que la energía cinética de los compuestos volátiles es mayor.

#### **II.4.4.3.- Efecto de la agitación**

El tiempo de equilibrio entre los compuestos volátiles y la fibra de SPME se puede acortar mediante la agitación de la solución acuosa. La velocidad de extracción está controlada por la velocidad de transporte de masa de los volátiles desde la solución acuosa a la fibra (Zhang y Pawliszyn, 1993). Los perfiles de extracción de los compuestos volátiles desde el espacio de cabeza se ven drásticamente afectados por efecto de la velocidad de agitación de la solución (Louch et al., 1992). Se observa que a medida que disminuye la velocidad de agitación, aumenta el tiempo necesario para que se alcance el equilibrio entre la fibra y el espacio de cabeza.

#### **II.4.5.- Uso de la técnica de SPME en carne y productos cárnicos**

Los estudios realizados con la técnica de SPME en carne y productos cárnicos se han orientado al análisis de los productos de la oxidación lipídica y al estudio de los compuestos volátiles responsables del aroma y sabor. Esta técnica de extracción ha sido utilizada como una técnica alternativa para detectar oxidación lipídica en carne precocida (Nielsen et al., 1997). Al utilizar la técnica de SPME con la fibra de PDMS 100  $\mu\text{m}$  obtienen un buen coeficiente de correlación (0,98) entre sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y hexanal.

Brunton et al. (2000) han evaluado diferentes fibras de SPME para medir cuantitativamente hexanal en carne cocida de pavo. La fibra PDMS/DVB resulta más efectiva en términos de linealidad y

reproducibilidad. Los valores de los límites de detección obtenidos para las fibras Car/PDMS, PDMS/DVB y Cw/DVB son 2, 7 y 12 ng hexanal/g de músculo respectivamente, esto indica que la fibra Car/PDMS tiene una mayor sensibilidad por hexanal.

Para analizar compuestos volátiles presentes en el espacio de cabeza de jamón curado se han utilizado las fibras de PDMS de 100µm (Ruiz et al., 1998) y de Car/PDMS (Ruiz et al., 2001). Con esta técnica de SPME es posible obtener una variedad de compuestos volátiles con diferentes pesos moleculares.

Recientemente, Estévez et al. (2003) han utilizado la fibra de DVB/Car/PDMS para analizar la generación de compuestos volátiles de carne de cerdo refrigerada y cocinada. Goodridge et al. (2003) ha estudiado la interacción entre hexanal y miofibrillas de pollo con la fibra PDMS. En este estudio los resultados se expresan como porcentaje de hexanal que disminuye debido a la adición de las miofibrillas.

#### **II.4.6.- Uso de la técnica de SPME en el estudio de las interacciones entre los compuestos volátiles y las proteínas**

La técnica de SPME se ha utilizado en alimentos, principalmente en la identificación y cuantificación de compuestos volátiles presentes en el espacio de cabeza. Estos compuestos volátiles migran desde la matriz del alimento y generalmente se encuentran en equilibrio químico. Sin embargo, hasta el momento son todavía escasas las publicaciones relacionadas con el estudio de la interacción entre los compuestos volátiles y las proteínas utilizando la técnica de SPME. El estudio de la interacción entre compuestos volátiles que contienen azufre (bisulfuros) y la ovoalbúmina se realiza utilizando la fibra Car/PDMS de 65 µm (Adams et al., 2001). En primer lugar, al utilizar la técnica de SPME para medir compuestos volátiles

presentes en el espacio de cabeza de una solución de ovoalbúmina se obtiene una reproducibilidad muy buena con un coeficiente de variación muy bajo. En el estudio de la interacción, se obtiene que el porcentaje de recuperación de los compuestos volátiles desde el espacio de cabeza es muy similar en presencia de la proteína a pH 6,7 y en el control. Sin embargo, a pH 8,0 esta diferencia es significativamente mayor, ya que al aumentar el pH aumenta también la interacción. Al desnaturalizar la ovoalbúmina por calor disminuye el porcentaje de recuperación de los compuestos volátiles porque la interacción aumenta. Los autores proponen una interacción de tipo irreversible, siendo las reacciones de intercambio entre grupos sulfuro de la proteína y los grupos bisulfuro de los compuestos las responsables de la disminución de la concentración en el espacio de cabeza.

Jung y Ebeler (2003) utilizaron la fibra de SPME para estudiar la interacción entre cetonas y BSA. Los resultados indican que la interacción con BSA es mayor con 2-nonanona (45%) comparada con la interacción con 2-heptanona (29%). También estudian la interacción entre la  $\beta$ -lactoglobulina y algunos compuestos volátiles utilizando la fibra de SPME. El porcentaje de reducción desde el espacio de cabeza de hexanal, heptanona, etil-heptanona e isoamilacetato en presencia de  $\beta$ -lactoglobulina alcanza un 30%, 20%, 20% y 5%, respectivamente. Sin embargo, en estos estudios no se determinan los parámetros de interacción.

Una de las aplicaciones más recientes, es el trabajo realizado por Goodridge et al. (2003) que estudia la interacción entre la miofibrilla de pollo y el hexanal, utilizando la fibra de PDMS 100  $\mu$ m. Los autores concluyen que la técnica de SPME es un método más sensible que el TBARS para el estudio en las etapas iniciales de la oxidación lipídica.



Se plantean los siguientes objetivos de investigación:

- 1.- Seleccionar las condiciones óptimas de operación de la microextracción en fase sólida para el análisis de compuestos volátiles representativos del aroma del jamón curado.
- 2.- Identificar y cuantificar los compuestos volátiles presentes en el espacio de cabeza del jamón curado utilizando la técnica de micro-extracción en fase sólida.
- 3.- Estudiar la interacción de compuestos representativos del aroma del jamón curado con componentes de la matriz proteica de la carne: dipéptidos (carnosina y anserina) y proteínas sarcoplásmicas (mioglobina).
- 4.- Estudiar el efecto del pH, y la adición de agentes de curado sobre la interacción entre los compuestos aromáticos del jamón curado con componentes de la matriz proteica de la carne.



Con el fin de llevar a efecto los objetivos propuestos, se plantea el siguiente plan de trabajo:

1.- Optimización de la técnica de microextracción en fase sólida (SPME) para el análisis de los compuestos volátiles presentes en el espacio de cabeza del jamón curado.

1.1.- Estudio de los factores que afectan la extracción de los compuestos volátiles por SPME.

Se estudian los factores que afectan a la extracción como: tiempo de contacto, pH, fuerza iónica, fibras.

1.2.- Análisis de los compuestos extraídos por SPME.

Los compuestos volátiles extraídos por la técnica de SPME se analizan por cromatografía de gases y se identifican utilizando un espectrómetro de masas (MS). Además, se cuantifican los compuestos extraídos utilizando para ello un detector de ionización de llama (FID).

2.- Estudio de la interacción entre los compuestos volátiles y los compuestos proteicos solubles presentes en jamón curado.

2.1.- Optimización de la técnica de SPME para el estudio de las interacciones.

Los estudios de interacción se llevan a cabo mediante la técnica SPME y análisis de la concentración de volátil retenida por CG-FID. Las interacciones se estudian mediante la ecuación de Scatchard para el cálculo de la constante de interacción (K) y el número de sitios de unión (n).

2.2.- Estudio de la interacción entre compuestos volátiles y péptidos.

Entre los compuestos volátiles identificados en el espacio de

cabeza de jamón curado, se seleccionan 6 basándose en su estructura química y en su poder aromático y se escogen dos péptidos (carnosina y anserina) presentes en jamón curado.

2.3.- Estudio de la interacción entre compuestos volátiles y mioglobina.

En este estudio se analizan los mismos compuestos volátiles que en el apartado anterior y como proteína se selecciona mioglobina representativo de las proteínas sarcoplásmicas.

3.- Efecto de los factores tecnológicos en la interacción entre compuestos volátiles y la matriz proteica.

3.1.- Efecto de los agentes de curado.

En este estudio se utilizan los mismos compuestos volátiles, péptidos y proteína ensayados en los apartados anteriores pero, en este caso, se estudia el efecto de los agentes de curado (sal, glucosa, nitrato, nitrito y ácido ascórbico) en la interacción.

3.2.- Efecto de mezclas de agentes de curado simulando las etapas del proceso de curado.

En este estudio se utilizan los mismos compuestos volátiles, péptidos y proteínas ensayados en los apartados anteriores pero en este caso se estudia el efecto del conjunto de las condiciones de proceso sobre la interacción.

## **VI.1.- PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA DE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME) PARA EL ANÁLISIS DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES**

Para poner a punto la técnica de SPME se utiliza el compuesto volátil hexanal, se selecciona la posición de la fibra y el tiempo necesario para la desorción en el puerto de inyección. Además, se realizan las curvas de calibrado correspondientes para poder determinar la concentración de compuesto volátil adsorbido por la fibra y la existente en el espacio de cabeza.

### **V.1.1.- Compuesto volátil**

En un vial de 10 mL y tapa de rosca con septos de PTFE silicona (Supelco, Bellefonte, PA, USA) se introducen 5 mL de tampón fosfato 50 mM a pH 6 y se inyectan 0.25  $\mu$ L de hexanal (Fluka Chemika, Buchs, Suiza), obteniéndose una concentración de 50 ppm. La disolución se mantiene a 30 °C en un calefactor de bloques (JP, Selecta, Barcelona, España) durante 15 horas para que alcance el equilibrio entre la fase líquida y la fase de vapor.

### **V.1.2.- Fibra de SPME**

Se estudian tres fibras cubiertas con PDMS de 100  $\mu$ m, PDMS de 7  $\mu$ m y PA de 85  $\mu$ m, obtenidas de Supelco (Bellefonte, PA, USA).

Antes de su uso cada una de las fibras es acondicionada en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases a 220 °C tal como indica el fabricante (Supelco, Bellefonte, PA, USA). La fibra de PDMS de 100  $\mu$ m es

acondicionada durante 1 hora, la fibra de PDMS de 7  $\mu\text{m}$  es acondicionada durante 4 horas y la fibra de PA es acondicionada durante 5 horas.

### **V.1.3.- Extracción de los compuestos volátiles con la fibra de SPME**

La fibra del SPME se inyecta en el vial que contiene el compuesto a extraer previamente equilibrado (apartado V.1.1). La fibra se expone al espacio de cabeza durante 30 min a 30  $^{\circ}\text{C}$ , para que la fibra y el espacio de cabeza alcancen el equilibrio. Posteriormente, el compuesto volátil es desorbido en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases para su cuantificación.

### **V.1.4.- Cromatografía de gases**

La detección y análisis del compuesto volátil se realiza en un cromatógrafo de gases marca, Fisons Instruments Serie 8000 CG (Milán, Italia), con detector de ionización de llama (FID) y con una columna DB-624 de longitud 60 m, diámetro interno de 0,32 mm y película de 1,8  $\mu\text{m}$  (J&W Scientific, Folsom, USA). El gas portador es helio a una velocidad lineal de 20,49  $\text{cm s}^{-1}$ , medida a una temperatura de 110  $^{\circ}\text{C}$ . La temperatura del detector e inyector es de 240  $^{\circ}\text{C}$  y 220  $^{\circ}\text{C}$ , respectivamente.

La inyección de la fibra de SPME se realiza manualmente, la fibra se mantiene en el puerto de inyección durante 5 min. En el programa de temperatura, el horno se mantiene durante 5 min a 70  $^{\circ}\text{C}$ , luego se realiza un gradiente lineal de temperatura de 10  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  hasta alcanzar 220  $^{\circ}\text{C}$ , temperatura que se mantiene durante 5 min, siendo el tiempo total del cromatograma de 25 min.

Se calcula el contenido de compuesto volátil a partir del área del FID y se expresa en unidades de área.

### **V.1.5.- Concentración de compuesto volátil adsorbido por la fibra**

Para determinar la concentración del compuesto volátil adsorbido por la fibra de SPME, se realiza una curva de calibrado. Se prepara una disolución patrón de 1000 ppm de dicho compuesto en metanol. Esta disolución patrón se diluye a diferentes concentraciones de 50, 100 200, 500, 700 ppm con metanol. 1  $\mu\text{L}$  de cada una de estas disoluciones diluidas se inyecta por triplicado en el cromatógrafo de gases y se determina el área de respuesta como se indica en el apartado V.1.4. Se representa el área frente a los ng de compuesto volátil inyectado.

La cantidad de compuesto volátil adsorbida por la fibra se determina a partir de la pendiente de la recta y expresa en ng de compuesto volátil.

Estas curvas de calibrado se realizan para cada compuesto volátil: 2-metil-butanal, 3-metil-butanal, hexanal, octanal, 2-pentanona, metional.

### **V.1.6.- Concentración del compuesto volátil en el espacio de cabeza**

Para determinar la concentración del compuesto volátil en el espacio de cabeza se preparan disoluciones del compuesto volátil de 50 ppm de hexanal, como se indica en el apartado V.1.1. De cada una de las disoluciones se retira 10, 40, 60, 80, 100  $\mu\text{L}$  del espacio de cabeza utilizando una jeringa gastight (Hamilton, Reno, Nevada, USA) y se inyectan por triplicado en el cromatógrafo de gases (apartado V.1.4). Se representa el área frente al volumen de espacio de cabeza inyectado.

La pendiente obtenida nos permite estimar la cantidad de compuesto volátil en un volumen de espacio de cabeza dado. Una vez obtenida el área y mediante la pendiente de la recta del apartado V.1.5, se puede determinar la concentración existente de compuesto expresada en ng.

Estas curvas de calibrado se realizan para cada compuesto volátil: 2-metil-butanal, 3-metil-butanal, hexanal, octanal, 2-pentanona, metional.

#### **V.1.7.- Posición de la fibra de SPME en el puerto de inyección**

La determinación de la posición óptima en el puerto de inyección se realiza exponiendo la fibra de SPME a una disolución de 50 ppm de hexanal previamente equilibrada (apartado V.1.1). La fibra con el compuesto volátil se desorbe en el puerto de inyección a 220 °C en las posiciones 2,5, 3,0, 3,5 y 4,0 para determinar la posición en la que se obtiene un área de hexanal máxima.

Se calcula la cantidad de compuesto volátil adsorbida por la fibra a partir del área del FID, y se expresa en ng de compuesto volátil adsorbido por la fibra utilizando la curva de calibrado del apartado V.1.5.

#### **V.1.8.- Tiempo de desorción de la fibra de SPME**

El estudio para establecer el tiempo necesario para la desorción de los compuestos volátiles de la fibra de SPME en el puerto de inyección se realiza manteniendo la fibra en el puerto de inyección a distintos tiempos (2, 3 y 5 min). Posteriormente, se vuelve a inyectar la misma fibra durante 5 min para analizar la cantidad de volátil que no fue desorbido durante la primera inyección (Jelen et al., 1998).

Se calcula la cantidad de compuesto volátil adsorbida por la fibra a partir del área del FID, y se expresa como porcentaje del compuesto volátil desorbido.

## **V.2.- OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME) PARA EL ANÁLISIS DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES PRESENTES EN EL ESPACIO DE CABEZA DEL JAMÓN CURADO**

### **V.2.1.- Preparación de la muestra**

La muestra de jamón curado seleccionada consistió en un jamón de 12 meses de curado y procesado de acuerdo a la metodología tradicional. El proceso de curado consistió en una etapa de salado (12 días a 3 °C), etapa de post-salado (50 días a 4 °C), y etapa de curado-secado (primera fase, 60 días a 12 °C; segunda fase 60 días a 18 °C; tercera fase 30 días a 30 °C; cuarta fase 150 días a 15 °C). Se corta el jamón en la parte central, de forma perpendicular al hueso. Esta porción está compuesta fundamentalmente por los músculos *Biceps femoris*, *Semitendinosus* y *Semimembranosus*. La muestra de jamón se divide en porciones de 50 g, que son envasadas a vacío y almacenadas a -20 °C hasta el momento del análisis.

### **V.2.2.- Fibra de SPME**

La extracción de los compuestos volátiles se realiza usando diversas fibras de SPME (Supelco, Bellefonte, PA, USA): PDMS de 100 µm, PDMS de 7 µm, PA de 85 µm, Car/PDMS de 75 µm, DVB/Car/PDMS de 50/30 µm. Las fibras son acondicionadas previamente en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases a 220 °C. Las fibras de PDMS y PA son acondicionadas según el procedimiento descrito en el apartado V.1.2. La fibra Car/PDMS es acondicionada en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases a 220 °C durante 0,5 horas y la fibra DVB/Car/PDMS es acondicionada durante 4 horas.

### **V.2.3.- Procedimiento**

Se introducen en un vial de 10 mL, 3 g de jamón curado cortado en cubos de 2 mm, y se cierra el vial con tapa de rosca con septos de PTFE silicona (Supelco, Bellefonte, PA, USA). El vial se mantiene a 30 °C en un calefactor de bloques (JP Selecta, Barcelona, España), durante 1,5 horas para equilibrar el espacio de cabeza con los compuestos volátiles.

La fibra de SPME se expone al espacio de cabeza del vial durante 0,5, 1,5, 3, 5, y 17 horas, manteniéndolo a una temperatura de 30 °C. Los compuestos adsorbidos por las fibras Car/PDMS y DVB/Car/PDMS son cuantificados e identificados mediante análisis cromatográfico usando detectores de ionización de llama y selectivo de masas, respectivamente.

### **V.2.4.- Identificación de los compuestos volátiles**

Los compuestos volátiles adsorbidos por la fibra son desorbidos en el puerto de inyección de un cromatógrafo de gases HP 5890 series II de Hewlett Packard equipado con un detector selectivo de masas HP 5972 (Palo Alto, CA, USA). La desorción se realiza manteniendo la fibra en el puerto de inyección durante 6 min a 220 °C con la válvula de purga abierta (modo splitless). Los compuestos son separados en una columna capilar DB-624 de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 1,4 µm de película (J&W Scientific, Falsom, CA, USA). El gas portador es helio con una velocidad lineal de 23,7 cm s<sup>-1</sup>.

El programa de temperatura empieza cuando la fibra es insertada, manteniendo la temperatura del horno a 38 °C durante 13 min, luego se realiza un primer gradiente lineal de temperatura de 4 °C min<sup>-1</sup> hasta alcanzar 150 °C. Posteriormente, se realiza el segundo gradiente lineal de temperatura de 10 °C min<sup>-1</sup> hasta alcanzar 210 °C y se mantiene a esta temperatura

durante 5 min más. El tiempo total del cromatograma es de 52 min. La línea de transferencia al espectrómetro de masas se mantiene a 240 °C. Los espectros de masas se obtienen por impacto electrónico a 70 ev. Los espectros de los compuestos volátiles se obtienen cubriendo el intervalo de masa de 25 a 400 amu.

Los compuestos volátiles individuales son identificados mediante el espectro de masas por comparación con los contenidos en la librería NIST'98. La identificación se realiza además por comparación con los índices de Kovats (KI) (Kovats, 1965) de sustancias patrones cuando se encuentran disponibles, y por último, se realiza la comparación con valores de índices de Kovats (KI) previamente publicados (Flores et al., 1997a).

#### **V.2.5.- Cuantificación de los compuestos volátiles**

La cuantificación de los compuestos volátiles se realiza en un cromatógrafo de gases, Fisons Instruments Serie 8000 CG (Milán, Italia), con detector de ionización de llama (FID) y con una columna DB-624 de longitud 60 m, diámetro interno de 0,32 mm y película de 1,8  $\mu\text{m}$  (J&W Scientific, Folsom, USA). El gas portador es helio a una velocidad lineal de 20,49  $\text{cm s}^{-1}$ , medida a una temperatura de 110 °C. El programa de temperatura del GC/FID es el mismo que el utilizado en el GC/MS (apartado V.2.4). La temperatura del detector e inyector se mantiene a 240 °C y 220 °C, respectivamente. Los compuestos volátiles adsorbidos por la fibra son desorbidos en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases manteniendo la fibra en el puerto de inyección a 220 °C durante 5 min.

Se calcula el contenido de cada compuesto volátil en el jamón curado a partir del área del FID y se expresa en unidades de área. Cada muestra se analiza por triplicado. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar del área de las tres réplicas analizadas para cada

tiempo de exposición. Los índices de Kováts (KI) de cada uno de los compuestos volátiles también son calculados (Girard, 1996).

### **V.3.- ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES Y LOS COMPUESTOS PROTEICOS SOLUBLES PRESENTES EN JAMÓN CURADO MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME)**

#### **V.3.1.- Optimización de la técnica de SPME para el estudio de la interacción**

Para optimizar la técnica de SPME al objeto de estudiar la interacción se selecciona la fibra y el tiempo necesario para la extracción del compuesto volátil. También se determina la linealidad de detección de las fibras y el efecto del pH sobre la adsorción de los compuestos volátiles.

##### **V.3.1.1.- Preparación de la disolución de compuesto volátil**

Se utilizan los siguientes compuestos volátiles puros: 2-metil-butanal, 3-metil-butanal, hexanal, octanal, 2-pentanona y 3-metil-tio-propanal (metional), todos provienen de Fluka Chemika (Buchs, Suiza).

Se prepara una disolución stock que contiene 10000 ppm de cada compuesto volátil en agua, a excepción de octanal y metional que son preparados en etanol. Cada compuesto volátil es adicionado a un vial que contiene 5 mL de tampón fosfato 50 mM a pH 6,0 resultando una concentración final del compuesto volátil de 50 ppm. El vial utilizado es de 10 mL y tapa de rosca con septos de PTFE silicona (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Las disoluciones se mantienen a una temperatura de 30 °C en un

calefactor de bloques (JP Selecta, Barcelona, España) durante 15 horas para que alcancen el equilibrio.

### **V.3.1.2.- Cuantificación de los compuestos volátiles**

La detección y análisis de los compuestos volátiles se realiza en un cromatógrafo de gases, Fisons Instruments Serie 8000 CG (Milán, Italia), con detector de ionización de llama (FID) y con una columna DB-624 de longitud 60 m, diámetro interno de 0,32 mm y película de 1,8  $\mu\text{m}$  (J&W Scientific, Folsom, USA). El gas portador es helio a una velocidad lineal de 20,49  $\text{cm s}^{-1}$ , medida a una temperatura de 110  $^{\circ}\text{C}$ . La temperatura del detector e inyector es de 240  $^{\circ}\text{C}$  y 220  $^{\circ}\text{C}$ , respectivamente.

La inyección de la fibra de SPME se realiza manualmente. En primer lugar, la fibra se mantiene en el puerto de inyección durante 5 min. En el programa de temperatura, el horno se mantiene durante 5 min a 70  $^{\circ}\text{C}$ , luego se realiza un gradiente lineal de temperatura de 10  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  hasta alcanzar 220  $^{\circ}\text{C}$ , temperatura que se mantiene durante 5 min, siendo el tiempo total del cromatograma de 25 min.

La cantidad de compuesto volátil adsorbida por la fibra se calcula a partir del área del FID y se expresa en ng de compuesto adsorbido por la fibra utilizando la curva de calibrado del apartado V.1.5. Todos los ensayos se realizan por triplicado.

### **V.3.1.3.- SPME**

La extracción de los compuestos volátiles se realiza utilizando diferentes fibras de SPME: PDMS de 100  $\mu\text{m}$ , PDMS de 7 de  $\mu\text{m}$ , PA de 85  $\mu\text{m}$ , Car/PDMS de 75  $\mu\text{m}$ , DVB/Car/PDM de 50/30  $\mu\text{m}$ .

La extracción de cada compuesto volátil desde el espacio de cabeza, se realiza con una fibra determinada, según los resultados que se obtengan del tiempo de equilibrio y linealidad.

#### **V.3.1.4.- Afinidad de las fibras**

La determinación de la afinidad de la fibra por los compuestos seleccionados se realiza preparando diferentes disoluciones de 50 ppm de cada compuesto volátil en tampón fosfato 50 mM a pH 6, según el procedimiento descrito en el apartado V.3.1.1. El espacio de cabeza de cada una de estas disoluciones se pone en contacto con cada una de las fibras durante 30 min para la adsorción de los compuestos volátiles. La fibra con el volátil atrapado se inyecta en el cromatógrafo de gases y se determina el área del compuesto volátil obtenida con cada una de las fibras (apartado V.3.1.2).

#### **V.3.1.5.- Tiempo de equilibrio**

El espacio de cabeza de cada una de las disoluciones de 50 ppm de cada compuesto volátil preparadas según se describen en el apartado V.3.1.1, se pone en contacto durante 0, 5, 10, 20, 30, 40 y 60 min, con la fibra seleccionada para cada compuesto volátil (apartado V.3.1.4.). La fibra con el volátil atrapado se inyecta en el cromatógrafo de gases y se determina el área del compuesto tal como se indica en el apartado V.3.1.2.

#### **V.3.1.6.- Linealidad de detección**

Se preparan disoluciones con concentraciones entre 20 y 200 ppm de cada compuesto volátil, tal y como se indica en el apartado V.3.1.1. El espacio de cabeza de cada una de estas disoluciones se pone en contacto con

la fibra de SPME seleccionada (apartado V.3.1.4) durante el tiempo determinado en el apartado anterior (V.3.1.5, ver condiciones en la tabla V.1) El contenido de compuesto volátil atrapado por la fibra, se desorbe en el cromatógrafo de gases para su análisis y se determina el área obtenida en cada caso, tal como se indica en el apartado V.3.1.2.

**Tabla V.1.-** Condiciones de operación seleccionadas para cada compuesto volátil.

Compuesto volátil	Fibra de SPME		Tiempo de análisis (min)
	Fase selectiva	Tamaño ( $\mu\text{m}$ )	
2-Metil-butanal	PDMS	100	10,00
3-Metil-butanal	Car/PDMS	75	0,33
Hexanal	PDMS	100	30,00
Octanal	PDMS	7	20,00
2-Pentanona	Car/PDMS	75	1,00
Metional	Car/PDMS	75	30,00

### V.3.1.7.- Efecto del pH en la adsorción de la fibra SPME

Se preparan disoluciones con una concentración de 50 ppm de cada compuesto volátil a pH 5,0, 5,5, 6,0, y 6,5, tal y como se indica en el apartado V.3.1.1. El espacio de cabeza de cada una de estas disoluciones, se pone en contacto con la fibra de SPME en las condiciones indicadas en la tabla V.1 para cada compuesto volátil. El contenido de compuesto volátil atrapado por la fibra, se desorbe en el cromatógrafo de gases para su análisis y se determina el área obtenida en cada caso, tal como se indica en el apartado V.3.1.2.

### **V.3.8.- Efecto de la concentración de cloruro de sodio en la adsorción de la fibra de SPME**

Se preparan disoluciones con una concentración de 50 ppm del compuesto volátil a pH 6,0, como lo indica el apartado V.3.1.1. En presencia de 20, 40, 60, 80 y 100 g/L de NaCl. Dichas disoluciones se mantienen a 30°C durante 15 horas hasta alcanzar el equilibrio. El espacio de cabeza de cada una de estas disoluciones se pone en contacto con la fibra de SPME en las condiciones indicadas en la tabla V.1 para cada compuesto volátil. El contenido de compuesto volátil atrapado por la fibra, se desorbe en el cromatógrafo de gases para su análisis y se determina el área obtenida en cada caso, tal como se indica en el apartado V.3.1.2.

### **V.3.1.9.- Coeficiente de partición**

#### **V.3.1.9.1.-Coeficiente de partición fibra / aire ( $K_1$ )**

Se determina el coeficiente de partición de la fibra de acuerdo al método de Zhang y Pawliszyn (1993):

$$K_1 = \frac{A_F V_G}{A_G V_1} \quad \text{Ec.23}$$

donde:

$A_F$ : Área de respuesta obtenida al inyectar la fibra con el compuesto volátil extraído desde el espacio de cabeza

$A_G$ : Área de respuesta de la inyección directa de compuesto volátil de un volumen de espacio de cabeza

$V_1$ : Volumen de la fibra (L)

$V_G$ : Volumen del espacio de cabeza (L)

Para el cálculo de este coeficiente de partición, la fibra es expuesta en el espacio de cabeza durante 30 min a 30 °C de una disolución preparada como se indica en el apartado V.3.1.1, obteniendo el valor de  $A_F$ . Los valores de  $A_G$  y  $V_G$  se obtienen del apartado V.1.6, y el  $V_1$  se calcula como se indica a continuación.

#### V.3.1.9.1.1.- Cálculo del volumen de la fibra

El volumen de la fibra se calcula como el volumen de un cilindro considerando la longitud de la fibra de 1 cm y el radio total de la fibra, es decir, el radio de sílice fundida (55  $\mu\text{m}$ ) y el radio de la o las fases selectivas que la constituyen indicado por el fabricante (Supelco, Bellefonte, PA, USA), tabla V.2.

Así pues, el volumen de la fibra se puede calcular a partir de la siguiente ecuación:

$$V_1 = \frac{\pi \cdot [r_1 + r_2]^2 \cdot \ell}{1 \times 10^9} \quad \text{Ec.22}$$

donde:

$r_1$ : Radio de la fibra de sílice (m)

$r_2$ : Radio de la fase selectiva (m)

$\ell$ : Longitud de la fibra de SPME (m)

**Tabla V.2.-** Radio de las fases selectivas de la fibra de SPME

<b>Fibra de SPME</b>	<b>Radio de la fase selectiva (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
PDMS	100
PDMS	7
PA	85
DVB/Car/PDMS	80
Car/PDMS	75

**V.3.1.9.2.- Coeficiente de partición aire / agua ( $K_2$ )**

El coeficiente de partición aire / agua de cada compuesto se determina a partir de la concentración en la fase aire, dividido por la concentración en la fase acuosa. La determinación se realiza usando la disolución indicada en el apartado V.3.1.1.

$$K_2 = \frac{A_{T3}V_2}{A_{T2}V_3} \quad \text{Ec.24}$$

donde

$A_{T2}$ : Área de respuesta del volumen total de la disolución acuosa

$A_{T3}$ : Área de respuesta del volumen total del espacio de cabeza

$V_2$ : Volumen de la disolución acuosa (L)

$V_3$ : Volumen del espacio de cabeza (L)

El valor de  $A_{T2}$  se obtiene de la siguiente ecuación

$$A_T = A_{T2} + A_{T3} \quad \text{Ec.25}$$

donde:

$A_T$ : Área de respuesta total

El área de respuesta total ( $A_T$ ) se obtiene a partir de una curva de calibrado obtenida en el apartado V.1.5 en la que se expresa el área de respuesta del cromatógrafo frente a la concentración de compuesto volátil. Como la cantidad inicialmente añadida de volátil es conocida, se puede determinar el área de respuesta total del cromatógrafo.

El área de respuesta del volumen total del espacio de cabeza ( $A_{T3}$ ) se obtiene a partir de la curva de calibrado obtenida en el apartado V.1.6, en la que se expresa el área de respuesta del cromatógrafo frente al volumen del espacio de cabeza.

### **V.3.2.- Interacción entre compuestos volátiles y proteicos**

#### **V.3.2.1.- Preparación de las muestras**

##### **V.3.2.1.1.- Disolución de los compuestos proteicos**

Se preparan las disoluciones de péptidos y proteínas utilizadas en el estudio de la interacción en tampón fosfato 50 mM a diferentes pH, 5,0, 5,5, 6,0, y 6,5. Los péptidos utilizados son L-carnosina ( $\beta$ -Ala-His), L-anserina ( $\beta$ -Ala-1-metil-His), y la proteína seleccionada es la mioglobina de músculo de caballo. Todos provienen de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO. USA). Las concentraciones de carnosina, anserina y mioglobina utilizadas en las disoluciones son de  $4 \text{ g L}^{-1}$ ,  $1 \text{ g L}^{-1}$  y  $4 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente. En el cálculo de la molaridad de la disolución de mioglobina se utiliza el peso molecular de 17000 (Carnegie et al., 1985).

**V.3.2.1.1.1.- Análisis de mioglobina**

Las concentraciones de oximioglobina y metamioglobina presentes en la disolución de mioglobina preparada se determinan mediante el método desarrollado por Krzywichi (1982). La absorbancia de la disolución de mioglobina se mide en un espectrofotómetro UV 2101 PC (Shimadzu Inc. Columbia, MD), a 572, 565, 545 y 525 nm y se realiza un blanco a 730 nm.

Las fracciones relativas de mioglobina, oximioglobina, y metamioglobina se obtienen de las siguientes ecuaciones (Krzywichi, 1982).

$$[\text{Mio}] = \frac{C_{\text{Mio}}}{C_T} = 0,369R_1 + 1,14R_2 - 0,941R_3 + 0,015 \quad \text{Ec.26}$$

$$[\text{Ox}] = \frac{C_{\text{Ox}}}{C_T} = 0,882R_1 - 1,267R_2 + 0,809R_3 - 0,361 \quad \text{Ec.27}$$

$$[\text{Met}] = \frac{C_{\text{Met}}}{C_T} = -2,514R_1 + 0,777R_2 + 0,8R_3 + 1,098 \quad \text{Ec.28}$$

Los términos  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  son las razones de absorbancias entre  $A^{572}/A^{525}$ ,  $A^{565}/A^{525}$ ,  $A^{545}/A^{525}$ , respectivamente.

donde:

[Mio]: Fracción relativa de mioglobina

[Ox]: Fracción relativa de oximioglobina

[Met]: Fracción relativa de metamioglobina

$C_T$ : Concentración total de mioglobina ( $\text{mmol L}^{-1}$ )

$C_{\text{Mio}}$ : Concentración de mioglobina ( $\text{mmol L}^{-1}$ )

$C_{Ox}$ : Concentración de oximioglobina ( $\text{mmol L}^{-1}$ )

$C_{Met}$ : Concentración de metamioglobina ( $\text{mmol L}^{-1}$ )

La concentración total de mioglobina en sus diferentes formas se obtiene a partir de la siguiente ecuación:

$$C_T = 0,132A^{525} \quad \text{Ec.29}$$

donde:

$C_T$ : Concentración total de mioglobina ( $\text{mmol L}^{-1}$ )

$A^{525}$ : Absorbancia medida a 525 nm

#### **V.3.2.1.2.- Disolución de compuesto volátil**

Se utilizan los siguientes compuestos volátiles puros: 2-metil-butanal, 3-metil-butanal, hexanal, octanal, 2-pentanona, y 3-metil-tio-propanal (metional). Todos provienen de Fluka Chemika (Buchs, Suiza).

Se preparan disoluciones stock que contienen 10000 ppm de cada compuesto volátil en agua, a excepción de octanal y metional que son preparados en etanol. Cada compuesto volátil es adicionado a un vial que contiene 5 mL de la disolución de péptido o proteína (apartado V.3.2.1.1). El vial es de 10 mL y de tapa de rosca con septos de PTFE silicona (Supelco, Bellefonte, PA, USA). La concentración final del compuesto volátil es de 50 ppm. La disolución se mantiene a 30 °C durante 15 horas para que alcance el equilibrio. Además, se prepara una disolución en las mismas condiciones pero en ausencia del péptido y/o proteína que sirve como control.

### **V.3.2.2.- Efecto del pH**

La cantidad de compuesto volátil en el espacio de cabeza de las disoluciones preparadas en el apartado V.3.2.1.2 con peptido y/o proteína se determina por SPME en las condiciones óptimas para cada compuesto según la tabla V.1. El contenido de compuesto volátil atrapado por la fibra, se desorbe en el cromatógrafo de gases (apartado V.3.1.2) para su análisis y se cuantifica el área.

Todos los ensayos se realizan por triplicado. Los resultados son expresados como porcentaje de compuesto volátil libre a cada pH respecto del obtenido en ausencia del péptido y/o proteína en la disolución.

### **V.3.2.3.- Parámetros de interacción**

#### **V.3.2.3.1.- Preparación de la muestra**

Se preparan disoluciones con concentraciones que varían entre 20 y 180 ppm de cada compuesto volátil en presencia y ausencia del péptido o la proteína, según el procedimiento descrito en el apartado V.3.2.1.2. Estas disoluciones se ponen en contacto con la fibra de SPME en las condiciones indicadas en la tabla V.1, para cada compuesto volátil. El pH de la disolución se selecciona a partir de los resultados del apartado anterior (V.3.2.2), que es aquél para el que la interacción es mayor (Tabla V.3). Una vez alcanzado el equilibrio (15 horas a 30 °C), se pone en contacto el espacio de cabeza de cada una de estas soluciones, con la fibra de SPME. El contenido de compuesto volátil es atrapado por la fibra, y analizado por cromatografía de gases (apartado V.3.1.2).

**Tabla V.3.-** Condiciones de pH seleccionado para el estudio de interacción entre los compuestos proteicos solubles y los compuestos volátiles.

Compuesto proteico	Compuesto volátil	pH
Carnosina	2-Metil-butanal	6,5
	3-Metil-butanal	6,5
	Hexanal	6,5
	Octanal	6,5
	Metional	6,5
Anserina	2-Metil-butanal	6,0
	Hexanal	6,5
Mioglobina	2-Metil-butanal	6,0

#### V.3.2.3.2.- Cálculo de los parámetros de interacción

La interacción no-covalente y reversible entre proteínas y compuestos volátiles puede ser representada por la ecuación de Scatchard (apartado II.1.3).

$$v/L = nK - vK \quad \text{Ec.1}$$

La concentración de ligando libre (L) se calcula utilizando la ecuación de O'Keefe et al. (1991a; 1991b)

$$L = (P / C) \times O \quad \text{Ec.30}$$

donde:

- P: Concentración de compuesto volátil en el espacio de cabeza de la disolución tampón que contiene proteína ( $\text{mol L}^{-1}$ )
- C: Concentración de compuesto volátil en el espacio de cabeza de la

disolución libre de proteína ( $\text{mol L}^{-1}$ )

O: Concentración inicial de compuesto volátil adicionado en la disolución ( $\text{mol L}^{-1}$ )

Para obtener los valores de C y P es necesario calcular el coeficiente de partición entra la fibra de SPME y el espacio de cabeza ( $K_1$ ). Este coeficiente está definido según la Ec.6 (apartado II.4.1)

$$K_1 = \frac{C_1^\infty}{C_3^\infty} \quad \text{Ec.6}$$

donde:

$C_1^\infty$ : Concentración en equilibrio de volátil en la fibra ( $\text{mol L}^{-1}$ )

$C_3^\infty$ : Concentración en equilibrio de volátil en el espacio de cabeza ( $\text{mol L}^{-1}$ )

La ecuación anterior puede ser expresada en función del volumen y las cantidades de compuesto volátil presente en la fibra y en el espacio de cabeza, como se expresa a continuación:

$$K_1 = \frac{\frac{M_1}{V_1}}{\frac{M_3}{V_3}} = \frac{M_1}{V_1} \cdot \frac{V_3}{M_3} \quad \text{Ec.31}$$

donde:

$M_1$ : Cantidad de compuesto volátil adsorbida por la fibra (mol)

$M_3$ : Cantidad total de compuesto volátil presente en el espacio de cabeza (mol)

$V_1$ : Volumen de la fibra (L)

$V_3$ : Volumen del espacio de cabeza (L)

A partir del desarrollo anterior se puede definir un coeficiente de partición aparente ( $K_1'$ )

$$K_1' = K_1 \cdot \frac{V_1}{V_3} = \frac{M_1}{M_3} \quad \text{Ec.32}$$

Además, con la curva de calibrado que relaciona la cantidad de cada compuesto volátil con el área de respuesta del cromatógrafo de gases (apartado V.1.5) se obtiene que:

$$A_D = m_C \cdot P_D \quad \text{Ec.33}$$

donde

$A_D$ : área de respuesta de la disolución inyectada

$m_C$ : pendiente de la recta que relaciona la cantidad de compuesto volátil con el área de respuesta

$P_D$ : peso del compuesto volátil en la disolución inyectada

Por otra parte, a partir de inyecciones en el cromatógrafo de gases de diferentes volúmenes de espacio de cabeza en equilibrio con una disolución de 50 ppm de compuesto volátil (apartado V.1.6), se obtiene la siguiente ecuación:

$$A_{G50} = m_V \cdot V_G \quad \text{Ec.33}$$

donde:

$A_{G50}$ : Área de respuesta de la inyección directa de compuesto volátil de un volumen de espacio de cabeza, cuando la solución contiene 50 ppm de compuesto volátil

$m_V$ : Pendiente de la recta que relaciona el volumen del espacio de cabeza del compuesto volátil con el área de respuesta

$V_G$ : Volumen del espacio de cabeza inyectado

Con las ecuaciones anteriormente descritas es posible calcular el valor del coeficiente de partición aparente ( $K_1'$ ). Este coeficiente se calcula a partir de la curva de calibrado y el área de respuesta de la fibra al adsorber el compuesto volátil desde el espacio de cabeza cuando la disolución contiene 50 ppm, según la ecuación.

$$K_1' = \frac{M_1}{M_3} = \frac{\frac{A_{F50}}{m_C}}{\frac{m_V \cdot V_3}{m_C}} = \frac{A_{F50}}{m_V \cdot V_3} \quad \text{Ec.35}$$

donde:

$A_{F50}$ : Área de respuesta de la fibra al adsorber el compuesto volátil desde el espacio de cabeza cuando la disolución contiene 50 ppm.

A partir del valor calculado de  $K_1'$  y el área de respuesta de la fibra de SPME, se puede obtener la cantidad total de compuesto volátil en el espacio de cabeza (desde la Ec.32), que es:

$$M_3 = \frac{M_1}{K_1'} \quad \text{Ec.36}$$

La cantidad adsorbida por la fibra ( $M_1$ ) se obtiene a partir de la curva de calibrado (Ec.33), de manera que se puede expresar de la siguiente forma:

$$M_1 = \frac{A_x}{m_c} \quad \text{Ec.37}$$

donde

$A_x$ : Área de respuesta de la fibra al adsorber el compuesto volátil desde el espacio de cabeza, cuando la disolución contiene  $x$  ppm

Así, la cantidad total de compuesto volátil en el espacio de cabeza es:

$$M_3 = \frac{A_x}{m_c \cdot K_1} \quad \text{Ec.38}$$

La concentración del compuesto volátil en el espacio de cabeza se calcula con la siguiente ecuación:

$$C_3 = \frac{M_3}{V_3} = \frac{A_x}{m_c \cdot K_1 \cdot V_3} \quad \text{Ec.39}$$

El valor de  $C$  se obtiene de la ecuación anterior cuando la disolución se encuentra libre de péptido o proteína. El valor de  $P$  se obtiene cuando la disolución contiene la proteína o el péptido.

Estos valores de  $C$  y  $P$  se utilizan para el cálculo de la concentración de ligando libre ( $L$ ) a través de la ecuación ya definida por O' Keefe et al. (1991a; 1991b) (Ec.30).

$$L = (P / C) \times O \quad \text{Ec.30}$$

También se calcula el número de moles de ligando (compuesto volátil) unido por mol de proteína ( $v$ ), utilizando la siguiente ecuación.

$$v = \frac{(C - P / C) \times O}{C_p} \quad \text{Ec.40}$$

donde:

$C_p$ : Concentración molar de proteína ( $\text{mol L}^{-1}$ )

La extracción del compuesto volátil mediante SPME del espacio de cabeza de distintas concentraciones iniciales en ausencia y presencia de proteína lleva a la obtención de pares de valores de  $v$  y  $L$  que son representados utilizando la ecuación de Scatchard (Ec.1, apartado II.1.3).

$$v/L = nK - vK \quad \text{Ec.1}$$

Al representar,  $(v/L)$  en función de  $(v)$ . Se obtiene una línea recta, donde la constante intrínseca de unión ( $K$ ) es la pendiente y el número de sitios de unión ( $n$ ) se obtiene de la intersección con la abscisa.

También es posible obtener los parámetros de interacción a partir de la ecuación de dobles recíprocos (Ec.2):

$$1/v = 1/n + 1/nKL \quad \text{Ec.2}$$

Estos parámetros se obtienen al representar  $(1/v)$  en función de  $(1/L)$ . Se obtiene una línea recta, donde la pendiente es el inverso del número de sitios de unión por la constante intrínseca de unión  $(1/nK)$  y de la intersección con la abscisa se obtiene el inverso del número de sitios de unión  $(1/n)$ .

#### **V.3.2.4.- Análisis estadístico**

El efecto del pH en la interacción entre péptidos, proteínas y compuestos volátiles se estudia por análisis de varianza (ANOVA) usando el programa estadístico Statgraphics plus v 2.0. Las medias son comparadas usando la diferencia mínima significativa de Fischer ( $p < 0,05$ )

### **V.4.- ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS AGENTES DE CURADO EN LA INTERACCIÓN ENTRE COMPUESTOS VOLÁTILES Y PROTEICOS SOLUBLES PRESENTES EN EL JAMÓN CURADO**

#### **V.4.1.- Selección de la concentración de los compuestos volátiles en la disolución**

La concentración de los compuestos volátiles en la disolución se selecciona en función del coeficiente de partición fibra / aire y el área de respuesta obtenida en el análisis de los compuestos volátiles presentes en el espacio de cabeza de jamón curado (apartado V.2.3) bajo las mismas condiciones de operación.

El cálculo de la concentración de cada compuesto volátil en el espacio de cabeza se calcula a partir del área de respuesta de la fibra de Car/PDMS en el espacio de cabeza de jamón curado durante 30 min a 30 °C.

Con dichas áreas de respuesta es posible calcular la cantidad de compuesto volátil adsorbido por la fibra de SPME con la ecuación descrita en el apartado V.3.2.3.2.

$$M_1 = \frac{A_F}{m_c} \quad \text{Ec.33}$$

Una vez calculada la cantidad de compuesto volátil adsorbida por la fibra se puede obtener la cantidad de compuesto volátil en el espacio de cabeza con el coeficiente de partición (apartado V.3.2.3.2).

$$M_3 = \frac{M_1 \cdot V_3}{V_1 \cdot K_1} \quad \text{Ec.31}$$

Y, por último, se calcula la concentración de compuesto volátil presente en el espacio de cabeza (apartado V.3.2.3.2).

$$C_3^\infty = \frac{M_3}{V_3} \quad \text{Ec.39}$$

## **V.4.2.- Determinación de los parámetros de operación**

### **V.4.2.1.- Disolución de compuesto volátil**

Se prepara la disolución stock que contiene la mezcla de compuestos volátiles a partir de disoluciones iniciales en etanol de cada uno de los compuestos volátiles puros: 2-metil-butanal, 3-metil-butanal, hexanal, octanal, 2-pentanona y 3-metil-tio-propanal (metional) (Fluka Chemika, Buchs, Suiza). Con estas disoluciones iniciales se prepara la disolución stock

en etanol con la concentración indicada en la tabla V.4. Una cantidad apropiada de la disolución (2  $\mu$ L) se inyecta en el vial 10 mL y tapa de rosca con septos de PTFE silicona (Supelco, Bellefonte, PA, USA) que contiene 5 mL de tampón fosfato 50 mM a pH 6,0 con o sin compuesto proteico hasta conseguir una concentración final indicada en la tabla V.4.

#### V.4.2.2.- Fibra de SPME

La extracción de los compuestos volátiles se realiza utilizando la fibra Car/PDMS de 75  $\mu$ m. Esta fibra es acondicionada según el procedimiento descrito en el apartado V.2.2.

**Tabla V.4.-** Concentración de las disoluciones stock y finales de compuestos volátiles para el estudio del efecto e los agentes de curado.

Compuesto volátil	Concentración (ppm)		
	Inicial	Disolución Stock	Final en el vial
2-metil-butanal	50000	5000	2
3-metil-butanal	50000	5000	2
Hexanal	25000	2500	1
Octanal	25000	2500	1
2-pentanona	25000	2500	1
Metional	125000	12500	5

#### V.4.2.3.- Tiempo de contacto

La fibra es expuesta en el espacio de cabeza de la disolución que contiene la mezcla de compuestos volátiles a 30 °C durante 30 min.

#### **V.4.2.4.- Linealidad de detección de la fibra de SPME**

Con el fin de detectar la existencia de un efecto de competición de los compuestos volátiles por la fibra, se verifica la linealidad de respuesta de cada uno de los compuestos volátiles. Para ello, se preparan disoluciones con concentraciones de 1, 2, 5, y 10 ppm de cada compuesto volátil, según el procedimiento descrito en el apartado V.3.1.1 y se mantienen a 30° C durante 15 horas hasta alcanzar el equilibrio. El espacio de cabeza de cada una de estas disoluciones se pone en contacto con la fibra de SPME (Car/PDMS de 75  $\mu\text{m}$ ) durante 30 min. El contenido de cada compuesto volátil atrapado por la fibra, se desorbe en el cromatógrafo de gases para su análisis y se determina el área según el apartado V.4.2.5.

#### **V.4.2.5.- Análisis de los compuestos volátiles por cromatografía de gases cuantificación**

La detección y análisis de los compuestos volátiles se realiza en el cromatógrafo de gases, indicado en el apartado V.3.1.2 bajo las condiciones indicadas en dicho apartado.

En el programa de temperatura, el horno se mantiene a 38 °C durante 6 min, luego se realiza un primer gradiente lineal de temperatura de 6 °C  $\text{min}^{-1}$  hasta alcanzar 105 °C. Posteriormente se realiza un segundo gradiente lineal de temperatura de 15 °C  $\text{min}^{-1}$  hasta alcanzar 220° C, temperatura que se mantiene durante 5 min, siendo el tiempo total del cromatograma de 27 min.

La cantidad de los compuestos volátiles adsorbida por la fibra se calcula a partir del área del FID y se determina el porcentaje de compuesto volátil que interacciona con el péptido o la proteína, según la siguiente ecuación:

$$I = \frac{A_{AC} - A_{AC+P}}{A_{AC}} \cdot 100 \quad \text{Ec.41}$$

donde:

I: Porcentaje de interacción

$A_{AC}$ : Área de respuesta mediante SPME de la disolución de volátiles en presencia de agentes de curado

$A_{AC+P}$ : Área de respuesta mediante SPME de la disolución de volátiles en presencia de agentes de curado y compuesto proteico

Todos los análisis se realizan por triplicado y los resultados se expresan como el porcentaje de interacción junto con el coeficiente de varianza (CV).

### **V.4.3.- Efecto de los agentes de curado en la interacción entre compuestos volátiles y compuestos proteicos**

#### **V.4.3.1.- Preparación de las muestras**

La preparación de la disolución de compuestos volátiles y proteicos se realiza como se describe en el apartado V.3.2.1, excepto que el tampón fosfato de la disolución de compuestos proteicos contiene concentraciones individuales de los siguientes agentes de curado:

- cloruro de sodio (0, 20, 40, 60, 80 g L<sup>-1</sup>)
- nitrato de potasio (0, 100, 200, 400 mg de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> L<sup>-1</sup>)
- nitrito de sodio (0, 50, 100 mg de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> L<sup>-1</sup>)
- ácido ascórbico (0, 250, 500 mg L<sup>-1</sup>)
- glucosa (0, 0,25, 0,5, 1 g L<sup>-1</sup>)

#### **V.4.3.2.- Interacción entre compuestos volátiles y proteicos en presencia de los agentes de curado**

Para estudiar el efecto de los agentes de curado en la interacción entre péptidos o proteína y compuestos volátiles, se prepara una disolución de tampón fosfato 50 mM a pH 6,0 que contiene los péptidos o la proteína descrita en el apartado V.3.2.1.1. La misma disolución se prepara en ausencia del compuesto proteico y se utiliza como blanco.

En un vial de 10 mL y tapa de rosca con septos de PTFE silicona, se introducen 5 mL de la disolución con o sin compuesto proteico con las respectivas concentraciones de cada agente de curado (apartado 4.3.1). En esta disolución se inyectan 2  $\mu$ L de la mezcla de disolución stock de compuestos volátiles (apartado V.4.2.1, tabla V.4), y se mantienen a 30 °C durante 15 horas hasta alcanzar el equilibrio. El espacio de cabeza de cada una de estas disoluciones se pone en contacto con la fibra de SPME (Car/PDMS 75  $\mu$ m) a 30 °C durante 30 min. El contenido de compuesto volátil atrapado por la fibra, se desorbe en el cromatógrafo de gases para su análisis y se cuantifica el área obtenida según el apartado V.4.2.5.

Los resultados son expresados como porcentaje de compuesto volátil que interacciona con el péptido o la proteína (ver apartado V.4.2.5).

#### **V.4.3.3.- Interacción entre los compuestos volátiles y proteicos en presencia de mezclas de agentes de curado**

El efecto de la mezcla de los agentes de curado se estudia preparando mezclas de agentes de curado a determinados pH, simulando las etapas características del proceso de curado (tabla V.5). Estas etapas corresponden a las condiciones que se encuentran en el músculo *Biceps femoris* (Rico et al., 1991). La etapa I corresponde a la etapa final de post

salado. Las etapas II y III corresponden a las etapas situadas a la mitad y al final del proceso de curado, respectivamente.

Para estudiar el efecto de la mezcla de agentes de curado en la interacción entre péptidos o proteína y compuestos volátiles, se prepara una disolución en tampón fosfato 50 mM que contiene los péptidos o la proteína descrita en el apartado V.3.2.1.1, al respectivo pH. La misma disolución se prepara en ausencia del compuesto proteico y se utiliza como blanco.

En un vial de 10 mL y tapa rosca con septos de PTFE silicona, se introducen 5 mL de la disolución con o sin compuesto proteico (V.3.2.1.1) con la respectiva concentración de la mezcla de los agentes curado (tabla V.5). En esta disolución se inyectan 2  $\mu$ L de la mezcla de disolución stock de compuestos volátiles (apartado V.4.2.1, tabla V.4) y se mantiene a 30° C durante 15 horas hasta alcanzar el equilibrio. El espacio de cabeza de cada una de estas disoluciones se pone en contacto con la fibra de SPME (Car/PDMS 75  $\mu$ m) a 30 °C durante 30 min. El contenido de los compuestos volátiles atrapado por la fibra, se desorbe en el cromatógrafo de gases para su análisis y se cuantifica el área obtenida según el apartado V.4.2.5.

Los resultados son expresados como porcentaje de compuesto volátil que interacciona con el péptido o con la proteína (ver apartado V.4.2.5).

**Tabla V.5.-** Combinación de los agentes de curado y pH correspondientes a las distintas etapas de la fabricación de jamón curado.

Etapa	pH	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> mg Kg <sup>-1</sup>	NaCl (%)	Ac.Ascorb. mg Kg <sup>-1</sup>	Glucosa mg Kg <sup>-1</sup>
I	5,5	400	8	500	1000
II	6,0	250	6	300	500
III	6,5	100	6	100	200



## VI.1.- PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA DE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME) PARA EL ANÁLISIS DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES

### VI.1.1.- Compuesto volátil adsorbido por la fibra

En primer lugar, se determina la relación que existe entre la cantidad de cada compuesto volátil y el área de respuesta del cromatógrafo de gases. En la tabla VI.1 se relaciona las pendientes de las curvas y sus coeficientes de regresión lineal obtenidas para cada compuesto volátil. Posteriormente, se calcula con esta pendiente la cantidad de compuesto volátil adsorbido por la fibra.

**Tabla VI.1.-** Valores de la pendiente que relaciona la cantidad de compuesto volátil (ng) y el área de respuesta del cromatógrafo, y sus respectivos coeficientes de regresión lineal.

Compuesto volátil	Pendiente	Coefficiente de regresión
2-Metil-butanal	17832	0,995
3-Metil-butanal	24406	0,998
Hexanal	31722	0,995
Octanal	30007	0,998
2-Pentanona	19931	0,999
Metional	4811	0,996

**VI.1.2.- Compuesto volátil en el espacio de cabeza**

Una vez alcanzado el equilibrio entre la solución de compuesto volátil (50 ppm, pH 6,0) y el espacio de cabeza, es posible obtener una relación entre el volumen del espacio de cabeza y el área de respuesta del cromatógrafo de gases (tabla VI.2). Posteriormente, esta relación se utiliza para calcular la concentración de cada compuesto volátil en el espacio de cabeza.

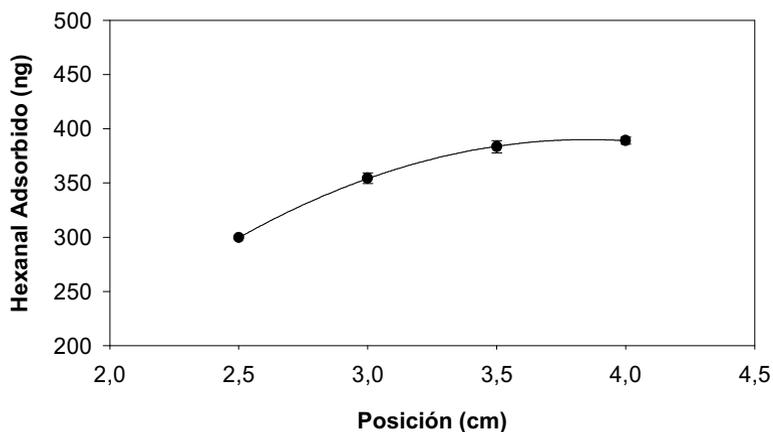
**Tabla VI.2.-** Valores de la pendiente que relaciona el volumen de espacio de cabeza ( $\mu\text{L}$ ) y el área de respuesta del cromatógrafo, y sus respectivos coeficientes de regresión lineal

<b>Compuesto volátil</b>	<b>Pendiente</b>	<b>Coefficiente de regresión</b>
2-Metil-butanal	11351	0,991
3-Metil-butanal	12850	0,987
Hexanal	10737	0,986
Octanal	3984	0,989
2-Pentanona	4665	0,998
Metional	4,6	0,983

Es de destacar la baja pendiente del compuesto metional debido a que además de producir poca respuesta en el detector (ver tabla VI.1), dicho compuesto es muy soluble en agua (coeficiente aire / agua:  $1,95 \times 10^{-5}$ , ver tabla VI.7) y, por tanto, su concentración en el espacio de cabeza es muy baja.

### VI.1.3.- Condiciones de operación

El primer paso consiste en determinar la posición adecuada de la unidad de SPME en el puerto de inyección con el fin de controlar la profundidad de inyección en el cromatógrafo de gases. El mayor valor de respuesta se obtiene en la posición 3,5 del soporte de SPME durante la desorción (figura VI.1), con esta posición el extremo de la fibra de SPME se encuentra en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases a 5 cm. Esta longitud corresponde a la recomendada en la inyección en el cromatógrafo de gases marca Fisons. Así pues, se utiliza la posición 3,5 en la desorción de la fibra en el puerto de inyección del cromatógrafo para los posteriores análisis. Por otra parte, con el incremento del tiempo de desorción en el puerto de inyección, el porcentaje desorbido de hexanal se mantiene alrededor de 99% (tabla VI.3). Esto concuerda con lo descrito por Zhang et al. (1994) que indica que los compuestos son desorbidos en fracción de segundos cuando la temperatura del inyector se encuentra entre 150 y 250 °C, ya que dichas temperaturas producen una disminución en el coeficiente de partición fibra / aire y los compuestos volátiles son desorbidos rápidamente.



**Figura VI.1.-** Efecto de la posición del soporte de SPME en el puerto de inyección sobre el área del hexanal adsorbido.

**Tabla VI.3.-** Variación de la desorción de la fibra de SPME con el tiempo de desorción.

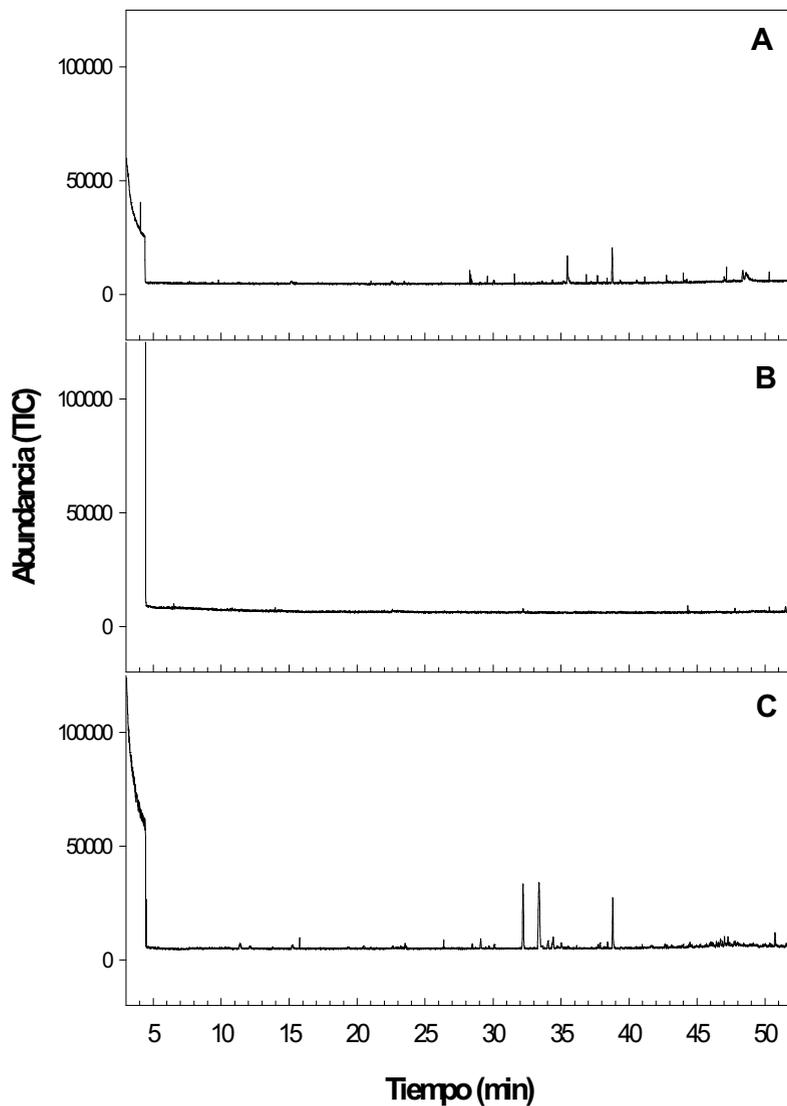
Tiempo (min)	Desorción (%)
2	99,04
3	99,14
5	99,23

## **VI.2.- OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME) PARA EL ANÁLISIS DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES PRESENTES EN EL ESPACIO DE CABEZA DEL JAMÓN CURADO**

### **VI.2.1.- Selección de la fibra de SPME**

La naturaleza de los compuestos extraídos utilizando la técnica de SPME depende del tipo de fibra utilizada debido a la diferente afinidad de los compuestos volátiles. En la figura VI.2 es posible observar el cromatograma CG-MS obtenido al exponer las fibras de SPME de polaridad simple (PDMS y PA), en el espacio de cabeza de jamón curado. Los compuestos volátiles del jamón presentes en dicho espacio de cabeza tienen muy poca afinidad por estas fibras. Sólo los compuestos asignados con los números 43, 47, 64 (ver tabla VI.4) son extraídos por la fibra de PDMS de 100  $\mu\text{m}$ . Por otra parte, en las figuras VI.3 y VI.4 se observan los cromatogramas obtenidos al utilizar las fibras bi-polares de Car/PDMS y de DVB/Car/PDMS, respectivamente, en la extracción de compuestos volátiles desde el espacio de cabeza de jamón curado. Con estas fibras el número de picos obtenidos es muy superior a los obtenidos con las otras fibras de polaridad simple.

Zhang et al. (1994) y Steffen y Pawliszyn (1996) han recomendado el empleo de la fibra de PA para extraer compuestos más polares. Sin embargo, ningún compuesto se extrae con esta fibra desde el espacio de cabeza de jamón curado (figura VI.2). Por otra parte, la fibra de PA ha sido utilizada para el análisis de compuestos volátiles del espacio de cabeza de queso encontrando gran cantidad de compuestos sobre todo ácidos carboxílicos (Chin et al., 1996). Además, esta fibra ha sido utilizada para el



**Figura VI.2.-** Cromatogramas obtenidos por CG-MS después de mantener las fibras de SPME durante 5 horas a 30 °C en el espacio de cabeza de jamón curado: (A), PA de 85  $\mu\text{m}$ ; (B), PDMS de 7  $\mu\text{m}$ ; (C), PDMS de 100  $\mu\text{m}$ .

análisis de alcoholes y ésteres en cerveza (Jelen et al., 1998).

La fibra de PDMS de 100  $\mu\text{m}$  solo extrae tres compuestos volátiles desde el espacio de cabeza de jamón curado (figura VI.2). Estos resultados contrastan con los obtenidos por Ruiz et al. (1998) donde han sido identificados un gran número de compuestos volátiles con la fibra de SPME desde el espacio de cabeza de jamón Ibérico, aunque en estos estudios la temperaturas fueron superiores (40 y 60  $^{\circ}\text{C}$ ) a la empleada en nuestro caso (30  $^{\circ}\text{C}$ ).

La fibra de Car/PDMS se ha utilizado en productos cárnicos para estudiar la generación de compuestos volátiles durante la oxidación lipídica de carne de pavo cocinada (Brunton et al., 2000), y para la extracción e identificación de una gran variedad de compuestos volátiles desde el espacio de cabeza de jamón Ibérico (Ruiz et al., 2001). Por otra parte, la fibra de DVB/Car/PDMS se ha utilizado en el estudio de compuestos volátiles en carne de cerdo cocinada y refrigerada (Estévez et al., 2003) y en aceites vegetales (Jelen et al., 2000)

Las fibras bi-polares de Car/PDMS y DVB/Car/PDMS (figuras VI.3 y VI.4) extraen una amplia variedad de compuestos volátiles, lo cual concuerdan con los resultados obtenidos por Clark et al. (1997) y Dufour et al. (2001), donde las fibras bi-polares extraen una mayor variedad de compuestos volátiles que las fibras de polaridad simple. Sin embargo, en jamón Ibérico se han identificado un número similar de compuestos volátiles con las fibras de PDMS (Ruiz et al., 1998) y Car/PDMS (Ruiz et al., 2001).

En resumen, las fibras Car/PDMS y DVB/Car/PDMS son seleccionadas para el estudio de los compuestos volátiles presentes en el espacio de cabeza de jamón debido al alto número de compuestos extraídos a 30  $^{\circ}\text{C}$ . La selección de esta temperatura tiene la ventaja adicional de evitar la generación de productos de oxidación favorecidos por la acción de la temperatura.

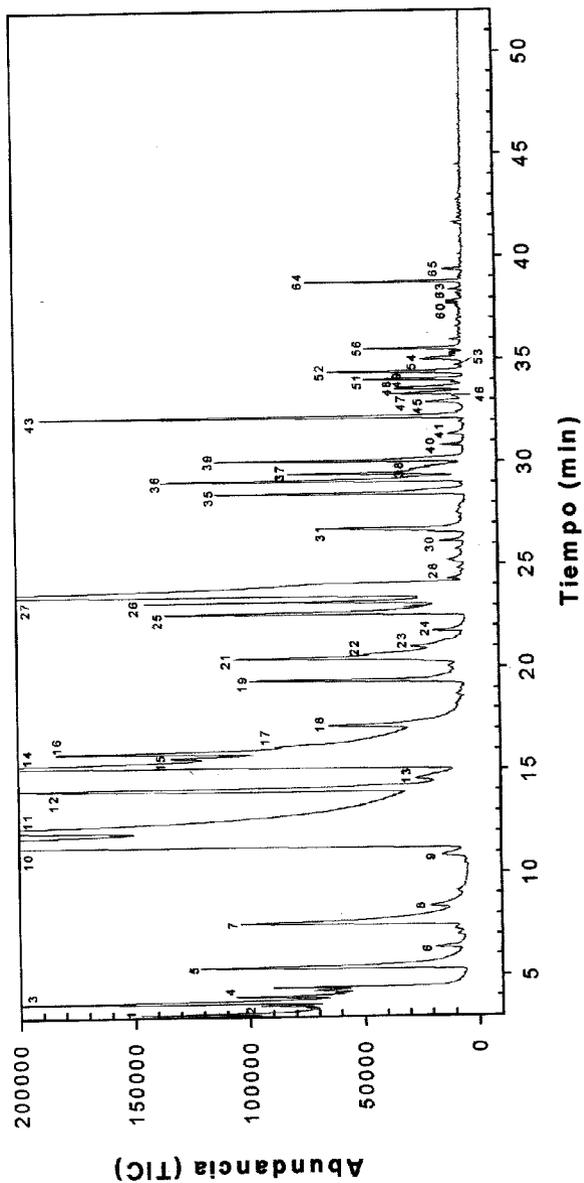
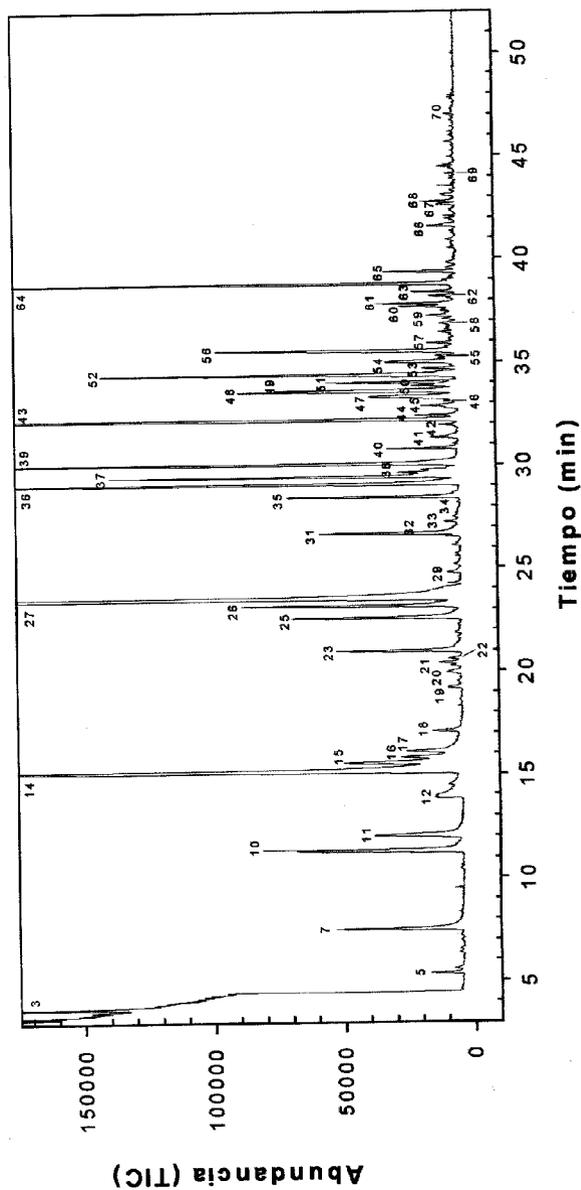


Figura VI.3.- Cromatograma obtenido por CG/MS después de mantener la fibra de SPME (Car/PDMS de 75  $\mu\text{m}$ ) durante 5 h a 30  $^{\circ}\text{C}$  en el espacio de cabeza de jamón curado. Los números representan los compuestos identificados que se muestran en la tabla VI.4.



**Figura VI.4.-** Cromatograma obtenido CG/MS después de mantener la fibra de SPME (DBV/Car/PDMS de 75  $\mu\text{m}$ ) durante 5 h a 30  $^{\circ}\text{C}$  en el espacio de cabeza de jamón curado. Los números representan los compuestos identificados que se muestran en la tabla VI.4.

### **VI.2.2.- Identificación y cuantificación de compuestos volátiles**

Los compuestos volátiles extraídos con las fibras de Car/PDMS y DVB/Car/PDMS son identificados y cuantificados por CG/MS como se muestra en la tabla VI.4. En esta tabla se presenta el índice de Kovats (KI), el área promedio y el porcentaje de área obtenido para cada compuesto volátil.

Sesenta compuestos se extraen e identifican con la fibra de DVB/Car/PDMS, mientras que con la fibra Car/PDMS solo se extraen 41 de estos compuestos. Por otra parte, se extraen únicamente 10 compuestos con la fibra de Car/PDMS siendo todos ellos de peso molecular bajo. Todos los compuestos volátiles extraídos con ambas fibras han sido identificados previamente en jamón curado, excepto la 2-metil-1-hepten-3-ona, que se ha identificado de forma tentativa.

La fibra de DVB/Car/PDMS extrae desde el espacio de cabeza de jamón curado, 13 aldehídos (36%), 11 alcoholes (14%), 12 cetonas (30%), 12 alcanos (11%), 5 ácidos (5%), 2 pirazinas (0,9%), 1 furano (0,6%) y 4 compuestos de estructura química desconocida (1,5%). De todos ellos, destacan 6 compuestos, que representan más del 50% del área total, y que son hexanal (18%), 2-pentanona (10%), 2-propanona (8%), un hidrocarburo ramificado (BCH) (7%) (el pico 43 en la tabla VI.4), 2-butoxi-etanol (5%) y 2-heptanona (4,5%). Por otra parte, cuando se utiliza la fibra Car/PDMS para extraer compuestos volátiles del espacio de cabeza de jamón curado se obtienen 11 aldehídos (54%), 17 alcoholes (15%), 11 cetonas (21%), 4 alcanos (3%), 5 ácidos (6%), 1 éster (0,4%), 1 pirazina (0,3%) y 1 furano (0,2%). De todos ellos, destacan 7 compuestos, que constituyen más del 65%

**Tabla VI.4.-** Compuestos volátiles extraídos después de mantener las fibras SPME (DVB/Car/PDMS y Car/PDMS) en el espacio de cabeza de jamón curado durante 5 h a 30 °C.

No <sup>a</sup>	Compuesto	KI <sup>b</sup>	RI <sup>c</sup>	DVB/Car/PDMS		Car/PDMS	
				Area <sup>d</sup>	% <sup>e</sup>	Area	%
1	Etanol	566	c	--	--	1,58	0,26
2	Propanal	572	c	--	--	1,43	0,24
3	2-Propanona	575	c	16,99	7,63	12,27	2,03
4	Metil acetato	583	c	--	--	2,57	0,43
5	2-Metil-propanal	600	a	0,53	0,24	13,04	2,16
6	1-Propanol	615	a	--	--	1,17	0,19
7	2-Butanona	633	a	3,36	1,51	16,07	2,66
8	2-Butanol	646	b	--	--	2,25	0,37
9	2-Metil-propanol	684	a	--	--	1,74	0,29
10	3-Metil-butanal	692	a	5,59	2,52	119,72	19,80
11	2-Metil-butanal	702	a	3,32	1,49	107,04	17,70
12	Ácido acético	722	a	1,68	0,76	23,97	3,97
13	1-Butanol	729	a	--	--	4,25	0,70
14	2-Pentanona	736	a	21,72	9,77	46,60	7,70
15	Pentanal	741	a	4,29	1,93	13,89	2,30
16	1-Penten-3-ol	744	a	2,00	0,90	23,22	3,84
17	2,3-Pentanodiona	746	a	1,81	0,82	24,28	4,02
18	2-Pentanol	758	a	0,62	0,28	9,74	1,61
19	3-Hidroxi-2-butanona	781	a	0,38	0,17	7,84	1,30
20	Tolueno	789	a	0,53	0,24	--	--
21	3-Metil-1-butanol	794	a	0,53	0,24	10,00	1,66
22	2-Metil-1-butanol	796	a	0,30	0,14	5,43	0,90
23	Octano	800	a	2,90	1,31	3,90	0,64
24	Ácido propanoico	813	a	--	--	0,86	0,14
25	1-Pentanol	826	a	4,10	1,85	13,73	2,27
26	2-Hexanona	836	a	5,30	2,38	7,56	1,25
27	Hexanal	841	a	40,64	18,27	56,65	9,37
28	2-Hexanol	853	a	--	--	0,61	0,10
29	Metil-pirazina	861	a	0,33	0,15	--	--
30	2,3-Butanodiol	882	a	--	--	0,52	0,09

**Tabla VI.4.-** (Continuación).

No <sup>a</sup>	Compuesto	KI <sup>b</sup>	RI <sup>c</sup>	DVB/Car/PDMS		Car/PDMS	
				Area <sup>d</sup>	% <sup>e</sup>	Area	%
31	Ácido butanoico	891	a	2,69	1,21	5,51	0,91
32	<i>m- o p</i> -DiMetil benceno	892	a	0,16	0,07	--	--
33	Nonano	900	a	0,24	0,11	--	--
34	<i>o</i> -Xileno	918	a	0,06	0,03	--	--
35	1-Hexanol	920	a	3,38	1,52	7,45	1,23
36	2-Heptanona	936	a	10,02	4,50	9,36	1,54
37	Heptanal	942	a	7,26	3,27	4,42	0,73
38	2,6-DiMetil-pirazina	947	a	1,38	0,62	1,95	0,32
39	2-Butoxi-etanol	955	a	11,48	5,16	6,71	1,11
40	3-Metil-tio-propanal (metional)	970	a	0,71	0,32	0,49	0,08
41	Ácido pentanoico	980	a	0,78	0,35	0,48	0,08
42	Desconocido (41, 55, 70, 83) <sup>†</sup>	991	c	0,51	0,23	--	--
43	BCH*	996	c	15,27	6,87	9,56	1,58
44	Decano	1000	a	0,86	0,39	--	--
45	2-Pentil-furano	1010	b	1,19	0,54	1,28	0,21
46	Benzaldehído	1018	a	0,21	0,10	0,23	0,04
47	Butirolactona	1020	a	2,78	1,25	1,75	0,29
48	1-Heptanol	1026	a	2,96	1,33	1,27	0,21
49	1-Octen-3-ol	1028	a	3,17	1,42	1,41	0,23
50	2-Metil-1-hepten-3-ona	1032	c	0,91	0,41	--	--
51	2-Octanona	1037	a	2,71	1,22	2,25	0,37
52	Octanal	1045	a	8,19	3,68	3,60	0,60
53	BCH*	1051	c	0,65	0,29	0,14	0,02
54	BCH*	1058	c	2,26	1,02	1,43	0,24
55	BCH*	1065	c	0,48	0,22	--	--
56	Ácido hexanoico	1071	a	5,74	2,58	2,13	0,35
57	2-Etil-1-hexanol	1080	a	0,64	0,29	--	--
58	Undecano	1100	a	0,59	0,26	--	--
59	Benceno-acetaldehído	1109	c	0,86	0,39	--	--
60	1-Octanol	1120	a	1,12	0,50	0,41	0,07
61	Desconocido (41, 57, 70, 98) <sup>†</sup>	1123	c	1,61	0,73	--	--
62	Desconocido (43, 71, 99) <sup>†</sup>	1133	c	0,55	0,25	--	--
63	2-Nonanona	1139	a	0,87	0,39	0,25	0,04

**Tabla VI.4.-** (Continuación).

No <sup>a</sup> Compuesto	KI <sup>b</sup>	RI <sup>c</sup>	DVB/Car/PDMS		Car/PDMS	
			Area <sup>d</sup>	% <sup>e</sup>	Area	%
64 Nonanal	1148	a	8,84	3,98	2,79	0,46
65 5-Etilidihidro2(3H)-furanona	1162	c	1,14	0,51	0,45	0,07
66 Desconocido (41, 55, 70, 83, 97) <sup>†</sup>	1222	c	0,70	0,32	--	--
67 Decanal	1256	a	0,37	0,17	--	--
68 Ácido octanoico	1260	a	0,49	0,22	--	--
69 Tridecano	1300	a	0,16	0,07	--	--
70 Undecanal	1405	a	0,16	0,07	--	--

<sup>a</sup> Número de pico correspondiente a las figures VI.3 y VI.4.

<sup>b</sup> KI; Índice de Kovats calculado para la columna capilar DB-624 (J&W Scientific, longitud de 30 m, diámetro interno de 0.25 mm, grosor de película 1.4 µm), las condiciones cromatográficas están detalladas en apartado V.2.4

<sup>c</sup> RI; Fiabilidad de la identificación: **a**, el espectro de masas y tiempo de retención idéntico con una muestra auténtica; **b**, el espectro de masas e índice de Kovats de la bibliografía de acuerdo; **c**, identificación tentativa por espectro de masas.

<sup>d</sup> Resultados expresados como la media del área de la corriente total de iones (TIC) de tres replicadas.

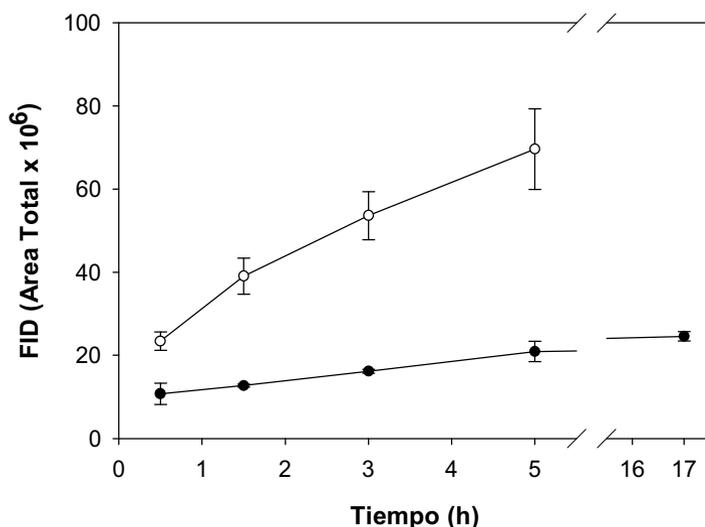
<sup>e</sup> Porcentaje del área de TIC.

<sup>†</sup> Ion predominante del espectro de masas entre paréntesis.

\*BCH, Hidrocarburo ramificado.

del área total extraída por la fibra, y que son 3-metil-butanal (19,8%), 2-metil-butanal (17,7%), hexanal (9%), 2-pentanona (7,7%), 2,3-pentanodiona (4%), ácido acético (4%) y 1-penten-3-ol (4%).

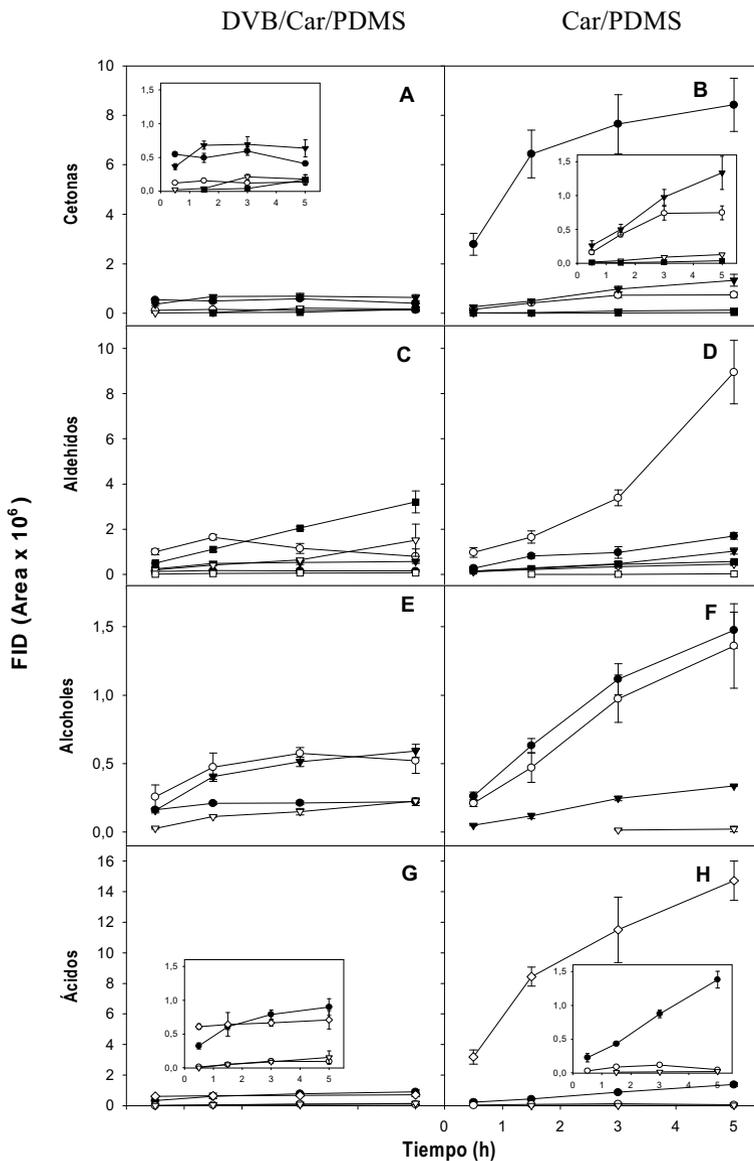
El perfil de adsorción de los compuestos volátiles extraídos desde el espacio de cabeza de jamón curado se realiza con ambas fibras manteniendo el vial a una temperatura constante de 30 °C (figura VI.5). Conforme aumenta el tiempo de exposición en el espacio de cabeza, aumenta también



**Figura VI.5.-** Perfil de adsorción total de los compuestos volátiles con diferentes fibras de SPME: DBV/Car/PDMS (●);Car/PDMS(○).

la extracción de compuestos volátiles. La fibra de Car/PDMS extrae 2-3 veces más compuestos volátiles que la fibra de DVB/Car/PDMS. Estos resultados coinciden con los presentados por Dufour et al. (2001) que extraen mayor cantidad de compuestos volátiles del espacio de cabeza de queso con la fibra de Car/PDMS que con otras fibras.

La figura VI.6 muestra el perfil de adsorción de los diferentes grupos de compuestos volátiles (cetonas, aldehídos, alcoholes y ácidos) usando las fibras de DVB/Car/PDMS y de Car/PDMS. La fibra de Car/PDMS muestra mayor afinidad con 2-pentanona (figura VI.6B), hexanal (figura VI.6D), 1-pentanol, 1-hexanol (figura VI.6F) y ácido acético (figura VI.6H), mientras que las concentraciones de estos compuestos extraídos por la fibra de DVB/Car/PDMS son comparativamente inferiores. Por otra parte, la fibra de DVB/Car/PDMS adsorbe comparativamente más compuestos de peso



**Figura VI.6.-** Perfil de adsorción de varios grupos de compuestos volátiles con diferentes fibras de SPME: (A, B), cetonas; (C, D), aldehídos; (E, F), alcoholes; (G, H), ácidos. Los símbolos representan el número de carbono de los compuestos: C2, (◇); C5, (●); C6, (○); C7, (▼); C8, (▽); C9, (■); C10, (□).

molecular alto (2-octanona, 2-nonanona (figura VI.6A), heptanol y octanol (figura VI.6E), ácido hexanoico y ácido octanoico (figura VI.6G) que la fibra de Car/PDMS.

La fibra DVB/Car/PDMS tiene mayor afinidad por los compuestos de peso molecular medio y alto, mientras que la fibra de Car/PDMS tiene mayor afinidad por los compuestos de peso molecular bajo (figuras VI.3 y VI.4). Estos resultados son semejantes a los obtenidos por Dufour et al. (2001) y por Shirey (2000) en la extracción de compuestos volátiles con la fibra de Car/PDMS. Además, los resultados obtenidos por Elmore et al. (2000) también indican que la fase de "Car" es más efectiva que la fase de DVB en la extracción de compuestos volátiles de bajo peso molecular y, que la fibra de DVB/Car/PDMS es efectiva en el análisis de compuestos de peso molecular alto.

En algunos compuestos volátiles el área sigue aumentando hasta las 5 horas de exposición de la fibra Car/PDMS en el espacio de cabeza de jamón curado (figura VI.6). Estos compuestos son: 2-pentanona, 2-heptanona y 2-hexanona (figuras VI.6B), hexanal (figura VI.6D), 1-pentanol y 1-hexanol, (figura VI.6F), los ácidos acético y pentanoico (figura VI.6H). Por otra parte, las áreas de respuesta de algunos compuestos con la fibra de DVB/Car/PDMS también siguen aumentando a las 5 horas. Estos compuestos son: octanal, nonanal, decanal (figura VI.6C), 1-octanol (figura VI.6E) y ácido octanoico (figura VI.6G).

El aumento de hexanal y nonanal (figura VI.6C) puede deberse a la oxidación de la muestra durante el largo tiempo de incubación. Sin embargo, la cantidad de hexanal adsorbida por la fibra de DVB/Car/PDMS disminuye cuando la incubación es de 3 y 5 horas. Esta disminución en la adsorción de la fibra se explicaría por el fenómeno de competición que se produce debido a una alta afinidad por otros compuestos volátiles que reducen la adsorción de estos compuestos (Roberts et al., 2000). En este caso la adsorción de

octanal y nonanal competiría por la adsorción de hexanal. De hecho, el coeficiente de partición obtenido para octanal (coeficiente fibra /aire = 47019) con la fibra de DVB/Car/PDMS es 4 veces mayor que el coeficiente de partición obtenido para hexanal (coeficiente fibra /aire = 12322) (ver tabla VI.7). Además, la fibra de DVB/Car/PDMS tiene más afinidad por los compuestos de peso molecular alto, de manera que el octanal y nonanal se unirían preferentemente a la fibra disminuyendo la cantidad de hexanal adsorbida por esta fibra.

La selectividad de las fibras por los compuestos volátiles es diferente. La fibra Car/PDMS extrae una mayor cantidad de compuestos que la fibra de DVB/Car/PDMS (tabla VI.4). En resumen, ambas fibras extraen mayoritariamente hexanal y 2-pentanona. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Ruiz et al. (1998) que extrajeron una alta proporción de hexanal y 3-metil-butanal desde el espacio de cabeza de jamón Ibérico al utilizar la fibra de PDMS de 100  $\mu\text{m}$ . Por otra parte, el análisis de hexanal con la fibra de SPME, se ha utilizado como una técnica alternativa para detectar la oxidación lipídica de carne de cerdo precocinada (Nielsen et al., 1997).

En general, los principales compuestos que se extraen con ambas fibras son básicamente los mismos que los encontrados en jamón Serrano (Flores et al., 1997a), jamón francés (Berdagué et al., 1991) y en jamón de Parma (Barbieri., et al 1992), aunque es importante destacar la ausencia de ésteres que están presentes en altas cantidades en el jamón de Parma (Barbieri., et al 1992).

Ruiz et al. (2001) tampoco identifican ésteres en jamón Ibérico con la fibra de Car/PDMS. La ausencia de estos compuestos al utilizar la fibra de SPME se puede atribuir a una baja concentración de los mismos debido al efecto inhibitor que ejerce el nitrito sobre la oxidación lipídica (Flores et al., 1998).

La técnica de extracción SPME permite extraer una gran cantidad de compuestos que se han relacionado con el aroma a jamón curado. Sin embargo, el aroma típico de jamón curado no se ha podido atribuir a ningún compuesto específico sino a un gran número de compuestos volátiles que se encuentran en las proporciones apropiadas (Barbieri et al., 1992; Flores et al., 1997a). Estos compuestos, al parecer, son formados por la oxidación de lípidos, excepto aquellos compuestos que contienen azufre, alcoholes y aldehídos ramificados y pirazinas que provienen de la degradación de Strecker de aminoácidos.

En resumen, el área total obtenida en la adsorción se ve afectada fuertemente por la fibra seleccionada como por el tiempo de extracción (figura VI.6). Aunque el efecto del tiempo de exposición es más importante con la fibra Car/PDMS que con la fibra de DVB/Car/PDMS. Por lo tanto, el tiempo óptimo para la extracción debe ser el tiempo requerido para alcanzar el equilibrio. En este caso, la mayoría de compuestos extraídos con la fibra de DVB/Car/PDMS alcanzan el equilibrio después de 3 h de exposición, aunque, se debe tener en cuenta el efecto de competición que se ve favorecido cuando el tiempo de exposición de la fibra es mayor. Los compuestos extraídos con la fibra de Car/PDMS requieren al menos 5 h para alcanzar el equilibrio. En resumen, cuando el objetivo es la extracción completa de los compuestos volátiles presentes en la matriz del alimento, deber realizarse una extracción exhaustiva con la fibra de SPME para obtener las cantidades máximas de compuestos (Roberts et al., 2000).

### **VI.3.- OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME) PARA EL ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE COMPUESTOS VOLÁTILES Y PROTEICOS SOLUBLES PRESENTES EN JAMÓN CURADO**

Los compuestos volátiles seleccionados para realizar el estudio de interacción con compuestos proteicos son: 2-metil-butanal, 3-metil-butanal, hexanal, octanal, 2-pentanona y metional. La selección de estos seis compuestos está basada en su presencia y contribución al aroma del jamón curado. Los seis compuestos seleccionados se extraen desde el espacio de cabeza de jamón curado con la técnica de SPME (ver apartado anterior), y todos ellos presentan notas aromáticas que contribuyen al aroma del jamón curado (Hinrichsen y Pedersen, 1995; Carrapiso et al., 2002; Buscailhon et al., 1994). Además, se seleccionan hexanal, 3-metil-butanal, 2-metil-butanal y 2-pentanona, porque se han extraído en una alta proporción con la fibra de SPME desde el espacio de cabeza de jamón curado. Como se mencionado en el apartado VI.2.2, la fibra de DVB/Car/PDMS extrae mayoritariamente hexanal y 2-pentanona que representan el 18% y 10% del área, respectivamente. En la extracción con la fibra de Car/PDMS los compuestos 3-metil-butanal, y 2-metil-butanal se extraen en una gran proporción y representan el 19,8% y 17,7% del área, respectivamente. Los otros dos compuestos, octanal y metional, se seleccionan debido a su importante contribución al aroma a jamón curado tal y como se ha determinado por métodos olfatométricos (Carrapiso et al., 2002).

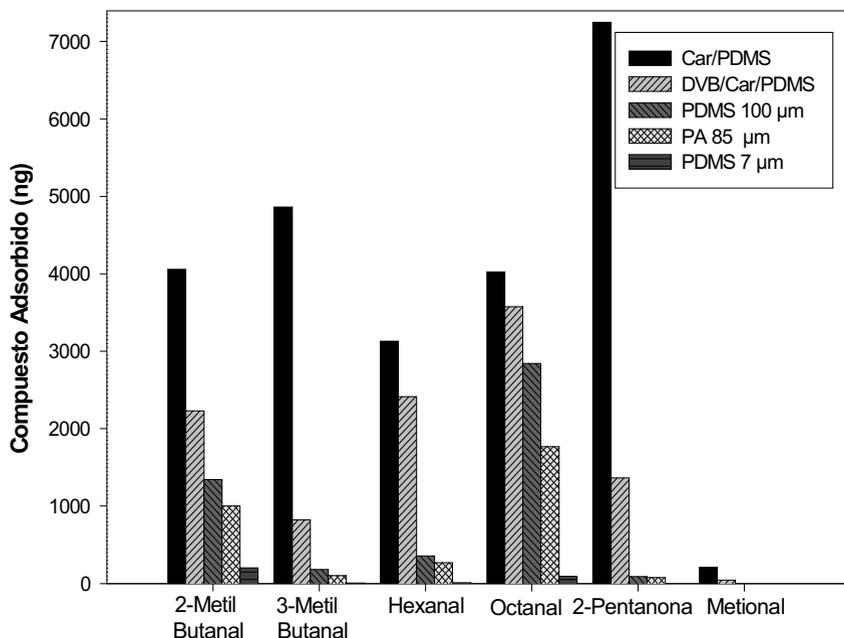
Una vez seleccionados los compuestos volátiles, se requiere optimizar las condiciones de operación como la selección de la fibra de SPME más apropiada, el tiempo exposición de la fibra en el espacio de

cabeza y verificación del intervalo lineal de respuesta de la fibra respecto de la concentración de cada compuesto volátil.

### **VI.3.1.- Selección de la fibra de SPME**

La selección de la fibra más apropiada se realiza estudiando la afinidad de cada compuesto con las diferentes fibras (figura VI.7). La fibra de Car/PDMS presenta la mayor afinidad por todos los compuestos seleccionados, le siguen en orden decreciente en afinidad las fibras de DVB/Car/PDMS, PDMS 100 de  $\mu\text{m}$ , PA de 85  $\mu\text{m}$  y PDMS 7 de  $\mu\text{m}$ . La fibra de PDMS 7  $\mu\text{m}$  es la que tiene la menor afinidad para todos los compuestos estudiados.

La fibra de DVB/Car/PDMS es muy poco útil en los estudios posteriores de interacción debido a su baja durabilidad. Por otra parte, la utilización de la fibra de Car/PDMS puede producir saturaciones en el cromatógrafo al tener alta afinidad por algunos compuestos. A pesar de ello, la fibra de Car/PDMS se selecciona para extraer 3-metil-butanal, 2-pentanona y metional, ya que la fibra de DVB/Car/PDMS presenta una baja durabilidad, en este caso es muy importante controlar el tiempo de exposición para evitar saturaciones. Para extraer octanal, se selecciona la fibra de PDMS de 7  $\mu\text{m}$  debido a que con esta fibra se logra un menor error en las experiencias. Por último, la fibra de PDMS de 100  $\mu\text{m}$  se selecciona para extraer 2-metil-butanal y hexanal.

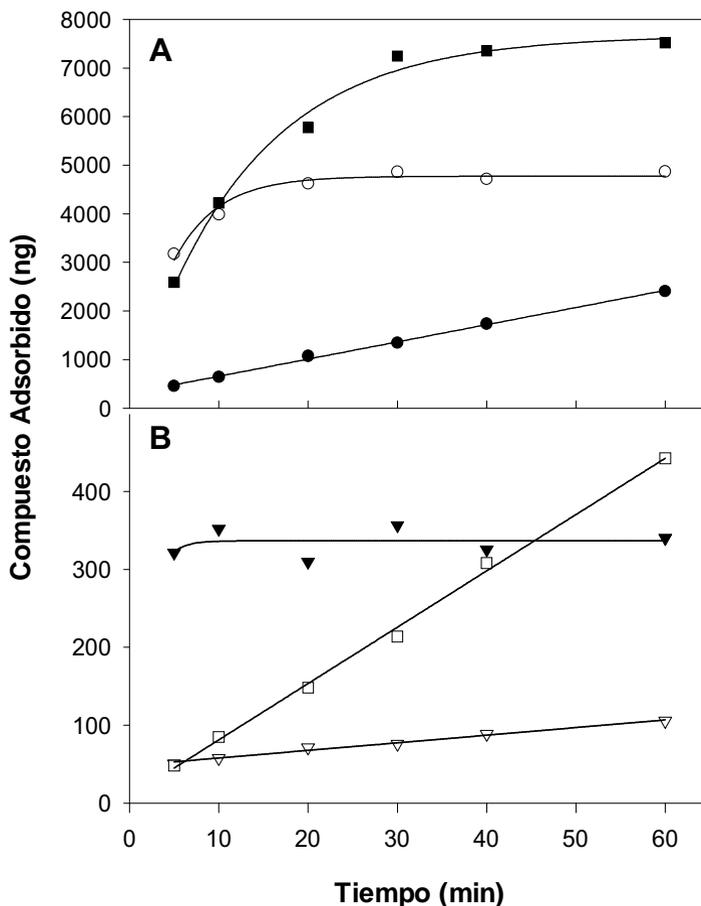


**Figura VI.7.-** Afinidad de las diferentes fibras. Los resultados se expresan como ng de compuesto adsorbido por la fibra después de 30 min de exposición en el espacio de cabeza de una solución que contiene 50 ppm de compuesto volátil en 50 mM de tampón fosfato, a pH 6,0.

### VI.3.2.- Selección del tiempo de contacto de las fibras de SPME

La selección del tiempo de contacto de la fibra de SPME con el compuesto volátil se determina analizando la cantidad de compuesto volátil adsorbida por la fibra cuando varía el tiempo de exposición de la fibra en el espacio de cabeza (figura VI.8).

En la tabla VI.5 se resumen las condiciones de operación seleccionadas. En el caso de hexanal, el tiempo de contacto seleccionado entre la fibra y el espacio de cabeza permite que el compuesto volátil alcance



**Figura VI.8.-** Efecto del tiempo de contacto en la adsorción del compuesto volátil por la fibra de SPME. Los resultados se expresan en ng de compuesto adsorbido por la fibra (seleccionada en el apartado VI.3.1) después de ser expuesta en el espacio de cabeza de una solución que contiene 50 ppm de compuesto volátil en tampón fosfato 50 mM, a pH 6,0: (A) 2-metil-butanal, (●); 3-metil-butanal, (○); 2-pentanona, (■); (B) hexanal, (▼); octanal, (▽); metional, (□).

el equilibrio entre estas dos fases (espacio de cabeza y fibra de SPME). Por otra parte, el tiempo de contacto seleccionado para los otros compuestos volátiles estudiados es menor que el requerido para que el compuesto volátil presente en la fibra de SPME se encuentre en equilibrio con el espacio de cabeza. Lo cual significa que pequeñas variaciones en el tiempo de contacto pueden producir grandes variaciones de la cantidad de compuesto adsorbido y por ello, es necesario controlar exactamente el tiempo de contacto.

Estos resultados también pueden ser expresados como el porcentaje de compuesto volátil extraído por la fibra de SPME respecto de la cantidad total de compuesto volátil presente en el vial. En la tabla VI.6 se observa que todos los compuestos se extraen en un bajo porcentaje entre el 0,1% y 3% del total presente en el vial. Es de destacar que la 2-pentanona se extrae en un mayor porcentaje que los otros compuestos y que el octanal es el compuesto que se extrae en menor proporción.

**Tabla VI.5.-** Condiciones de operación seleccionadas para cada compuesto volátil.

Compuesto volátil	Fibra de SPME		Tiempo (min)
	Fase Selectiva	Tamaño ( $\mu\text{m}$ )	
2-Metil-butanal	PDMS	100	10.00
3-Metil-butanal	Car/PDMS	75	0.33
Hexanal	PDMS	100	30.00
Octanal	PDMS	7	20.00
2-Pentanona	Car/PDMS	75	1.00
Metional	Car/PDMS	75	30.00

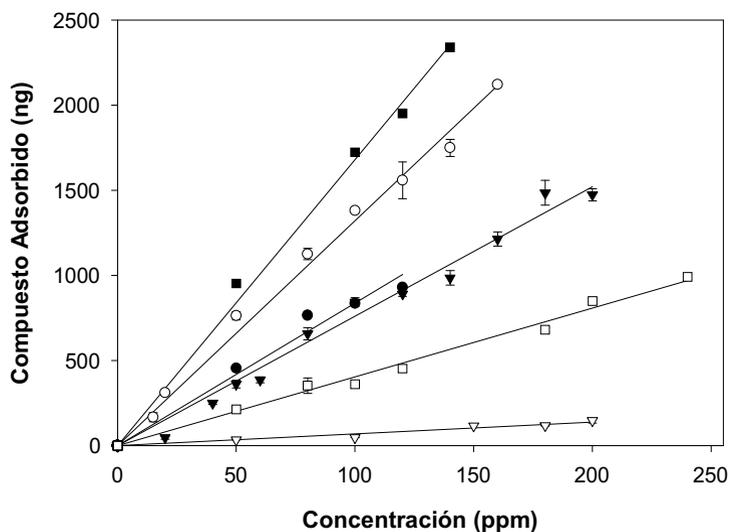
**Tabla.VI.6.-** Porcentaje de compuesto volátil extraído por la fibra respecto de la cantidad presente en el vial.

Tiempo (min)	2-Metil-butanol		3-Metil-butanol		Hexanol		Octanol		2-Pentanona		Metional	
	PDMS (100 µm)	Car/PDMS (75 µm)	PDMS (100 µm)	Car/PDMS (75 µm)	PDMS (100 µm)	Car/PDMS (100 µm)	PDMS (7 µm)	Car/PDMS (100 µm)	PDMS (100 µm)	Car/PDMS (100 µm)	PDMS (75 µm)	Car/PDMS (75 µm)
0,33		0,2801										
1				0,395								
5	0,1810	1,2693	0,1286	0,0202					1,0369			0,0193
10	0,2545	1,5920	0,1408	0,0231					1,6889			0,0339
20	0,4282	1,8476	0,1239	0,0285					2,3103			0,0593
30	0,5374	1,9446	0,1426	0,0303					2,8991			0,0856
40	0,6949	1,8853	0,1302	0,0355					2,9415			0,1232
60	0,9616	1,9480	0,1361	0,0422					3,0100			0,1771

### VI.3.3.- Determinación del intervalo lineal de detección

El intervalo lineal de detección de cada compuesto volátil en las condiciones previamente seleccionadas (tabla VI.5) se encuentra en la figura VI.9.

En las condiciones de operación seleccionadas, la técnica SPME puede ser aplicada para cuantificar cambios de la concentración del compuesto volátil comprendido entre los valores de 20 a 150 ppm para los 6 compuestos volátiles estudiados.



**Figura VI.9.-** Intervalo lineal de detección: 2-metil-butanal, (●); 3-metil-butanal, (○); hexanal, (▼); octanal, (▽); 2-pentanona, (■); metional, (□).

#### **VI.3.4.- Determinación de los coeficientes de partición**

La cantidad de compuesto volátil adsorbida por la fibra de SPME se ve influenciada por el coeficiente de partición entre el espacio de cabeza y la matriz, así como por el coeficiente entre la fibra y el espacio de cabeza (Jung y Ebeler, 2003). Los coeficientes de partición también determinan cual es la fibra apropiada para analizar cada compuesto responsable del aroma. Para todos los compuestos y las fibras estudiadas se observa que el coeficiente de partición aire / agua es mucho menor que los valores obtenidos para el coeficiente de partición fibra / aire (tabla VI.7). Por tanto, las fibras desplazan el equilibrio hacia ellas al tener mayor afinidad.

Los coeficientes de partición pueden explicar por que el metional es adsorbido por las cinco fibras en cantidades muy bajas (figura VI.7), ya que este compuesto tiene un alto coeficiente de partición fibra / aire, sin embargo, el coeficiente de partición aire / agua es muy bajo, es decir, el metional se distribuye preferentemente en la fase acuosa.

Los compuestos 2-metil-butanal y 3-metil-butanal tienen coeficientes de partición aire / agua muy altos, y con la fibra de Car/PDMS dichos compuestos tienen coeficientes de partición fibra / aire moderados (tabla VI.7). Por tanto, estos compuestos están presentes en el espacio de cabeza en altas concentraciones. Además, la cantidad extraída de 2-metil-butanal con la fibra de Car/PDMS es levemente inferior a la cantidad extraída de 3-metil-butanal con esta fibra (figura VI.7), debido a que el coeficiente de partición fibra / aire es levemente inferior para 2-metil-butanal (tabla VI.7). La diferencia en la cantidad adsorbida por estos compuestos con la fibra de DVB/Car/PDMS (figura VI.7) se debe a que el coeficiente de partición fibra / aire es 2,5 veces mayor para 2-metil-butanal que para 3-metil-butanal (tabla VI.7). Por otra parte, los valores de los coeficientes de partición obtenidos para estos compuesto indican que son muy volátiles y

Tabla VI.7.- Coeficientes de partición para cada compuesto volátil.

Compuesto Volátil	Coeficiente aire/agua (K <sub>2</sub> ) (30° C)	Coeficiente fibra/aire (K <sub>1</sub> ) (30° C, 30 min)				
		Car/PDMS	DVD/Car/PDMS	PDMS 100µm	PA	PDMS 7µm
2-Metil-butanol	1.31 x 10 <sup>-2</sup>	12008	6122	2796	2560	2618
3-Metil-butanol	1.08 x 10 <sup>-2</sup>	17392	2734	458	317	105
Hexanol	6.96 x 10 <sup>-3</sup>	17233	12322	1378	1285	282
Octanol	2.67 x 10 <sup>-3</sup>	57118	47019	28383	21632	5950
2-Pentanona	4.73 x 10 <sup>-3</sup>	58327	10173	511	523	-
Metional	1.95 x 10 <sup>-5</sup>	414321	81948	2821	8497	6343

tiene una afinidad moderada por la fibra de Car/PDMS permitiendo que 2-metil-butanal y 3-metil-butanal sean extraídos en gran proporción con esta fibra desde el espacio de cabeza de jamón curado (tabla VI.4). En resumen, la fibra de Car/PDMS se selecciona para analizar 3-metil-butanal, con un tiempo exposición corto para evitar saturar el cromatógrafo de gases. La fibra de PDMS de 100  $\mu\text{m}$  se selecciona para la extracción de 2-metil-butanal, aunque, el tiempo de exposición de la fibra es mayor porque el coeficiente de partición para esta fibra es bajo (tabla VI.7).

El coeficiente de partición aire / agua de la 2-pentanona presenta un valor medio (tabla VI.7), es decir, este compuesto tiene una volatilidad media. Sin embargo, el valor obtenido para el coeficiente de partición fibra / aire con la fibra de Car /PDMS es muy alto (tabla VI.7), existiendo una alta afinidad de la fibra de Car/PDMS por 2-pentanona. Estos resultados concuerdan con el porcentaje de compuesto volátil extraído por la fibra desde el vial (tabla VI.6) donde el mayor porcentaje de extracción se obtiene con 2-pentanona al utilizar la fibra de Car/PDMS. Por otra parte, en el espacio de cabeza de jamón curado se extrae 2-pentanona en una alta proporción (tabla VI.4, figura VI.6) debido a la afinidad que tiene este compuesto por la fibra de Car/PDMS.

El coeficiente de partición fibra / aire obtenido para el hexanal con la fibra de Car/PDMS es superior al obtenido con la fibra de DVB/Car/PDMS (tabla VI.7) lo cual explica la mayor área de respuesta del hexanal al utilizar la fibra de Car/PDMS desde el espacio de cabeza de jamón curado (figura VI.6).

Existen muy pocos estudios sobre los coeficientes los de partición entre las fibras de SPME y el espacio de cabeza. El valor del coeficiente de partición fibra / aire obtenido para el 3-metil-butanal con la fibra de PDMS de 100  $\mu\text{m}$  a 30°C es ligeramente superior al obtenido por Roberts et al. (2000) (coeficiente = 270). En cambio, en la extracción de hexanal con la

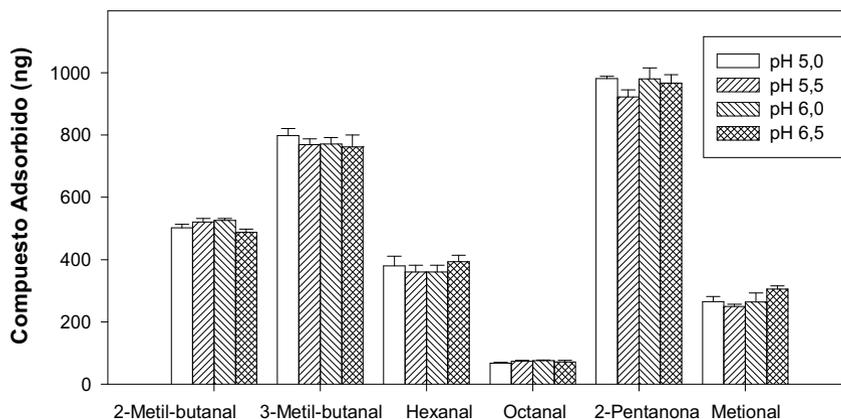
fibra de PDMS de 100  $\mu\text{m}$  se obtiene un coeficiente de partición fibra / aire inferior al encontrado por Song et al. (1998) (coeficiente = 8640), ya que este coeficiente fué calculado a 23 °C. Por otra parte, se ha descrito que la temperatura afecta la afinidad de la fibra por el compuesto volátil de manera que una menor temperatura favorece la afinidad (Jia et al., 1998; MacGillivray et al., 1994). La diferencia en el valor del coeficiente de partición fibra / aire obtenido para hexanal con la fibra de PDMS de 100  $\mu\text{m}$  se explica por la diferencia en la temperatura utilizada. En el presente ensayo la temperatura utilizada es mayor (30 °C), y dado que a una mayor temperatura la afinidad por la fibra disminuye, se refleja en una disminución del coeficiente de partición fibra / aire.

## VI.4.- ESTUDIO DE FACTORES QUE AFECTAN LA ADSORCIÓN DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES

### VI.4.1.- Efecto del pH

El pH afecta la interacción entre proteínas y compuestos volátiles (Kinsella, 1990; Jouenne y Crouzet, 2000; Adams et al., 2001; van Ruth y Villeneuve, 2002). Inicialmente, es importante determinar si el pH tiene un efecto sobre la extracción de los compuestos volátiles (figura VI.10) en las condiciones de operación seleccionadas (tabla VI.5).

En la figura VI.10 se observa que el pH no tiene un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) sobre la adsorción de los compuestos volátiles desde el espacio de cabeza, en el intervalo de pH estudiado (5,0-6,5). Lo cual coincide con lo indicado por MacGillivray et al. (1994), que determinan que el pH no es un factor que afecte la adsorción de los compuestos volátiles al utilizar la técnica de SPME.



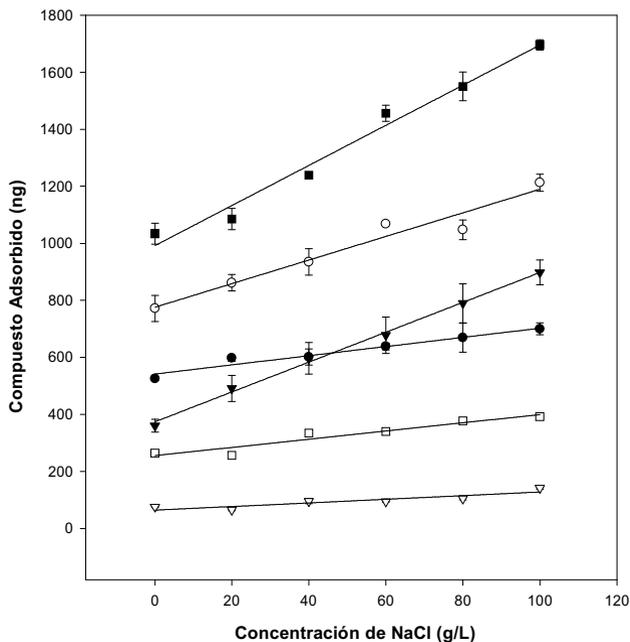
**Figura VI.10.-** Efecto del pH en la adsorción de cada compuesto volátil. Los resultados se expresan como ng de compuesto volátil adsorbido desde el espacio de cabeza de una solución que contiene 50 ppm de compuesto volátil en 50 mM de tampón fosfato.

#### **VI.4.2.- Efecto de la concentración de cloruro sódico**

Uno de los factores que afecta a la adsorción, es la presencia de sales en la solución acuosa (Yang y Peppard, 1994). En la figura VI.11 se observa que cuando incrementa la concentración de cloruro de sodio en la solución también aumenta en forma lineal la cantidad de compuesto volátil adsorbido por la fibra desde el espacio de cabeza, en las condiciones de operación previamente seleccionadas (tabla VI.5).

El efecto de la concentración de sal sobre la adsorción es mayor con 2-pentanona y hexanal en los que se observan mayores pendientes.

El efecto de la concentración de cloruro de sodio sobre el aumento de la adsorción de los compuestos volátiles en el espacio de cabeza por la fibra de SPME ha sido observado en la mayoría de los compuestos estudiados por Yang y Peppard (1994) y en los estudios realizados por Jelen et al. (1998).



**Figura VI.11.-** Efecto de la concentración de NaCl en la adsorción de cada compuesto volátil: Los resultados se expresan como ng de compuesto volátil adsorbido desde el espacio de cabeza de una solución que contiene 50 ppm de compuesto volátil en 50 mM de tampón fosfato, a pH 6,0: 2-metil-butanal, (●); 3-metil-butanal, (○); hexanal, (▼); octanal, (▽); 2-pentanona, (■); metional, (□).

## **VI.5.- ESTUDIO DE INTERACCIÓN ENTRE COMPUESTOS VOLÁTILES Y PROTEICOS**

Las proteínas influyen en la percepción del aroma (Fischer y Widder, 1997), de esta manera el estudio de la interacción entre proteínas compuestos volátiles responsables del aroma es importante para modular el aroma y mejorar las propiedades sensoriales de los productos cárnicos.

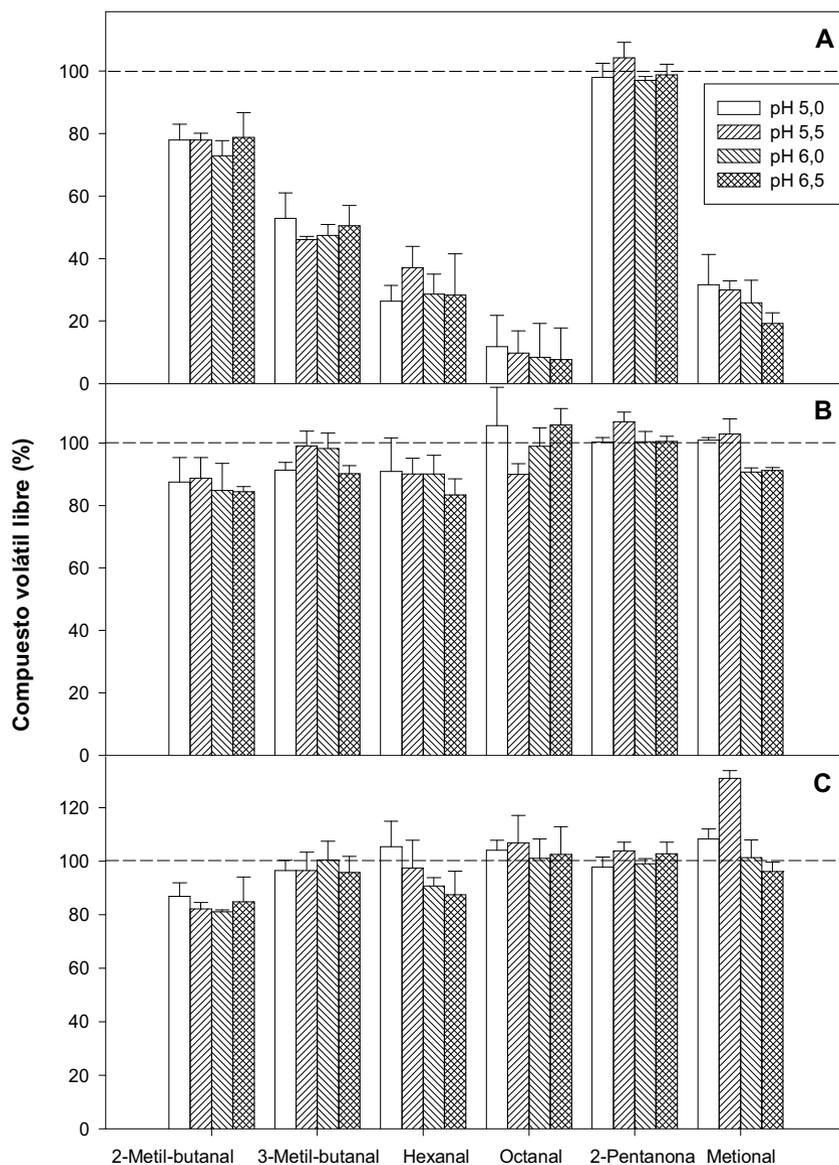
### **VI.5.1.- Efecto del pH**

El pH es un factor que puede modificar la conformación de la proteína y ejercer una influencia considerable sobre la interacción con los compuestos volátiles (Kinsella, 1990; Jouenne y Crouzet, 2000).

La interacción de la carnosina con los compuestos volátiles estudiados es notable excepto con 2-pentanona que no presenta interacción (reducción del porcentaje de compuesto volátil libre) a todos los pH estudiados (figura VI.12A). Los demás compuestos volátiles interaccionan con carnosina y en forma especialmente acusada el octanal.

Los porcentajes de hexanal y metional libre presentes en el espacio de cabeza en presencia de carnosina son afectados por el pH. El porcentaje de hexanal libre en presencia de carnosina es significativamente ( $p < 0,05$ ) menor a pH 5,0, 6,0, y 6,5 que a pH 5,5. En el caso de metional, el porcentaje de compuesto volátil libre es significativamente ( $p < 0,05$ ) más bajo a pH 6,0 y 6,5 que a pH 5,0 y 5,5. Si el porcentaje de compuesto volátil baja en la solución significa que a dicho pH existe una interacción más elevada.

Por otra parte, la anserina muestra interacción con 2-metil-butanal, 3-metil-butanal, hexanal y metional (figura VI.12B), la reducción con estos compuestos en presencia de anserina alcanza aproximadamente el 10-20%



**Figura VI.12.-** Efecto del pH en la interacción entre el compuesto volátil y el compuesto proteico: (A) carnosina; (B) anserina; (C) mioglobina. Los resultados se expresan como porcentaje de compuesto volátil libre respecto de la solución en ausencia del compuesto proteico a su respectivo pH.

del compuesto volátil libre en el espacio de cabeza. Además, el efecto del pH es significativo solamente en la interacción de anserina con metional y 3-metil-butanal. El porcentaje de metional libre en presencia de anserina es significativamente ( $p < 0,05$ ) menor a pH 6,0 y 6,5 que a pH 5,0 y 5,5. En el caso de 3-metil-butanal, el compuesto volátil libre es inferior a pH 5,0 y 6,5 que a 5,5 y 6,0.

La estructura de los aminoácidos y péptidos es importante en la interacción de los compuestos volátiles. Zhou y Decker (1999a; 1999b) estudian la interacción de una variedad de aminoácidos y péptidos del músculo esquelético con compuestos volátiles que son productos de la oxidación lipídica. Ellos sugieren que el nitrógeno del grupo imidazol, y no el grupo  $\beta$ -amino, es el sitio de reacción principal de la histidina contenida en los dipéptidos. Sin embargo, nuestros resultados indican que el comportamiento de la interacción es diferente entre la carnosina y la anserina. Como ambos dipéptidos contienen el grupo imidazol, las diferencias observadas se deberían a diferencias en la afinidad por la presencia del grupo metilo en el anillo de la anserina.

Zhou y Decker (1999b) observan que el hexanal interacciona débilmente con la carnosina, ya que la presencia de este dipéptido reduce solo en un 3,2% la concentración del hexanal en el espacio de cabeza. Sin embargo, estos autores utilizan una razón molar de carnosina / hexanal menor que la utilizada en el presente estudio. Esto significa que en el estudio realizado por Zhou y Decker (1999b) existen menos moles de carnosina para interactuar con un mol de hexanal. Landy et al. (1995) indican que el aumento de la concentración de proteína aumenta el porcentaje de interacción. Esto explicaría la diferencia en los resultados obtenidos en el porcentaje de interacción entre la carnosina y el hexanal.

El efecto del pH sobre la interacción entre cada compuesto volátil con la mioglobina se observa en la figura VI.12C. Solamente, 2-metil-

butanal y hexanal muestran interacción con la mioglobina. El efecto del pH en la solución únicamente es significativo para el hexanal, siendo el porcentaje de hexanal libre significativamente ( $p < 0,05$ ) mayor a pH 5,0 y 5,5 que a pH 6,0 y 6,5. Por otra parte, la interacción entre 2-metil-butanal y mioglobina no es afectada por el pH, pero es mayor que la interacción observada con el hexanal.

No existen antecedentes sobre la interacción de la mioglobina con compuestos volátiles. Sin embargo, hay estudios que indican que el pH puede inducir cambios conformacionales en la proteína dando lugar a alteraciones en los sitios de unión de las proteínas con los compuestos volátiles, como en el caso de la interacción de BSA con 2-nonanona, la constante de unión aumenta a pH 3,0, pH 5,0 y pH 6,0 y disminuye a pH 9,0 (Kinsella, 1990). En el caso de la interacción entre  $\beta$ -lactoglobulina y compuestos volátiles, metil-cetonas y etil-ésteres, aumenta la retención de los compuestos volátiles al incrementar el pH desde 3,0 a pH 9,0, mientras que la retención disminuye a pH 11,0 (Jounene y Crouzet, 2000). Adams et al. (2001) investigan el efecto del pH en la interacción de ovoalbúmina y compuestos disulfuro. Ellos indican que cuando el pH aumenta desde 6,7 a 8,0 disminuye la cantidad de compuestos disulfuros en el espacio de cabeza en presencia de la ovoalbúmina nativa y ovoalbúmina desnaturalizada por calor.

#### **VI.5.1.1.-Efecto del pH en la proporción de mioglobina**

En la tabla VI.8, se observa que el pH no tiene un efecto sobre los tres estados de oxidación de la mioglobina en el intervalo de pH estudiado.

En la interacción de la mioglobina con compuestos volátiles (figura VI.12) el pH solo afecta a la interacción con hexanal (apartado anterior) a

pesar de que el pH no es un factor que afecte el estado de oxidación de la mioglobina.

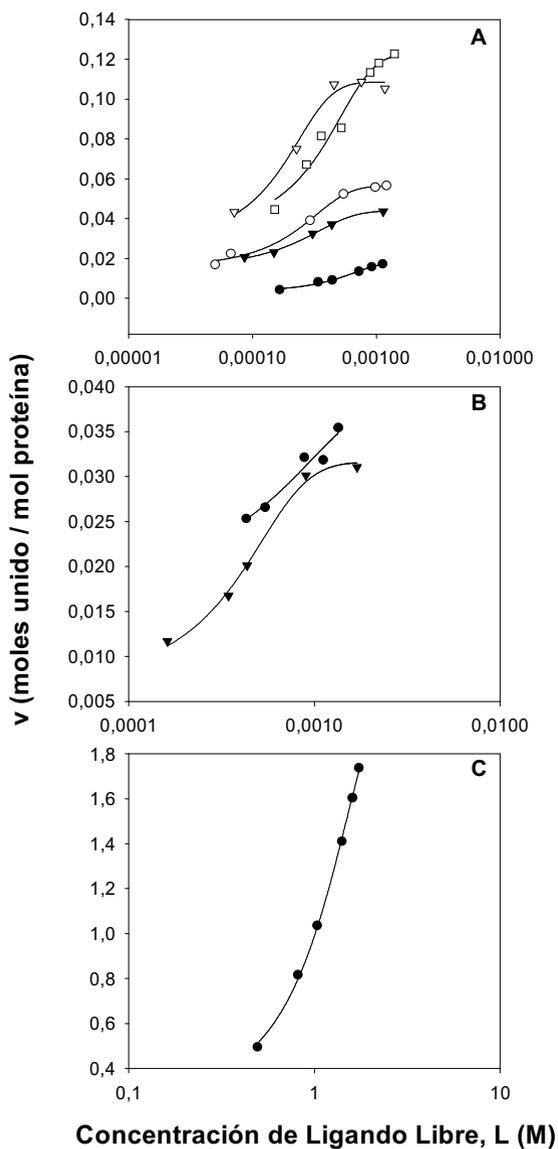
**Tabla VI.8.-** Efecto del pH sobre el porcentaje de los tres estados de oxidación de la mioglobina

pH	Mioglobina	Oximoglobina	Metamioglobina
5,0	--	6,8	93,2
5,5	--	7,0	93,0
6,0	--	6,8	93,2
6,5	--	6,9	93,1

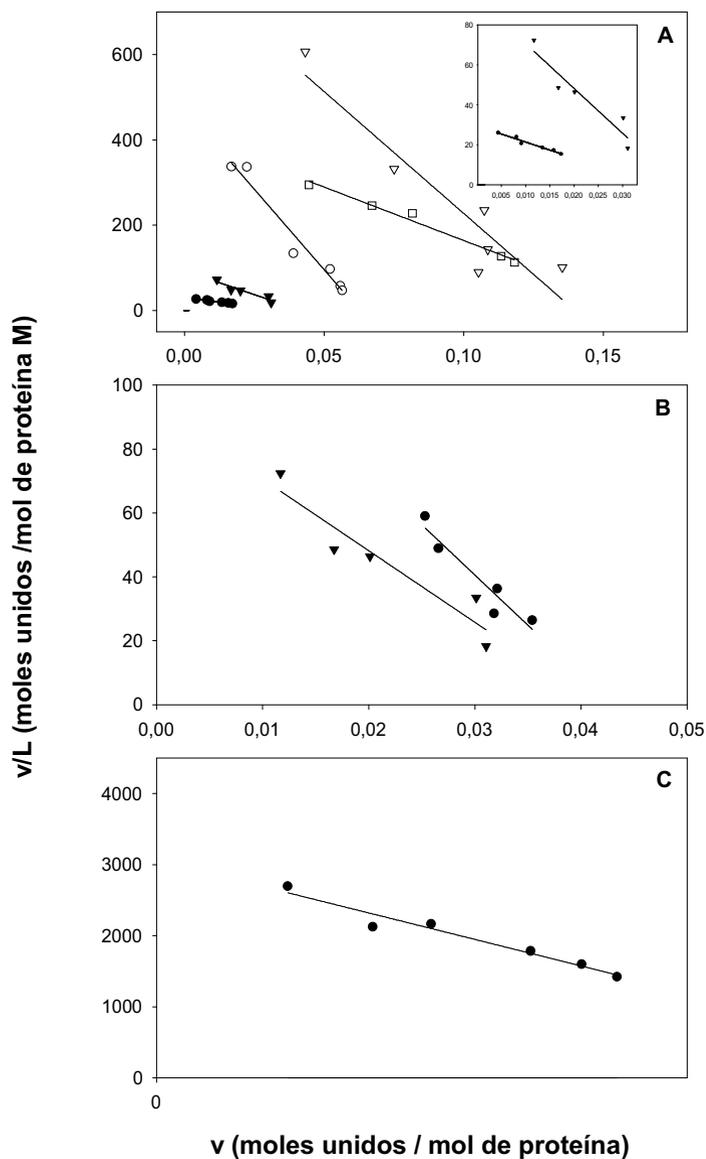
### VI.5.2.- Determinación de los parámetros de interacción

La determinación de los parámetros de interacción se estudia en aquellos casos donde la interacción produce una reducción del porcentaje de compuesto volátil libre mayor al 20% y a los valores de pH donde la interacción es mayor (figura VI.12).

Para medir el efecto de la interacción, se deben representar gráficamente el número de sitios de unión en función del logaritmo de la concentración de ligando libre. Esta gráfica debe cumplir algunos requisitos establecidos por Klotz (1982) para que el ajuste de datos a la ecuación de Scatchard sea válido. Todas las curvas (figura VI.13) muestran el comportamiento propuesto por Klotz (1982). Por otra parte, O'Keefe et al. (1991b) indican que al representar el número de sitios de unión en función de la concentración de ligando libre, tiene que mostrar un modelo hiperbólico porque modelo sigmoidal indicaría la presencia de cooperación con los sitios de unión. La representación de los datos (no se muestra la gráfica) según lo indicado por O'Keefe et al. (1991b), muestra curvas



**Figura VI.13.-** Número de moles de ligando unido por mol de proteína (v) en función de la concentración molar de ligando libre (L). Isotermas de unión: (A) carnosina con 2-metil-butanal, (●); 3-metil-butanal, (○); hexanal, (▼); octanal, (▽) y metional, (□); (B) anserina con 2-metil-butanal, (●) y hexanal, (▼); (C) mioglobina con 2-metil-butanal, (●)



**Figura VI.14.-** Gráfica de Scatchard: (A) carnosina con 2-metil-butanal, (●); 3-metil-butanal, (○); hexanal, (▼); octanal, (▽) y metional, (□); (B) anserina con 2-metil-butanal, (●) y hexanal, (▼); (C) mioglobina con 2-metil-butanal, (●).

Tabla VI.9.- Parámetros de interacción reversible obtenidos a partir de la gráfica de Scatchard

Péptido/ Proteína	Compuesto Volátil	pH	r	Parámetros de interacción		
				Nº de sitios de unión	K (M <sup>-1</sup> )	
$\Delta G$ (kJ/mol)						
Carnosina	2-Metil-butanol	6,5	0,999	0,036	831	-16,9
	3-Metil-butanol	6,5	0,994	0,062	7680	-22,5
	Hexanal	6,5	0,968	0,045	8928	-22,9
	Octanal	6,5	0,994	0,126	7215	-22,4
	Metional	6,5	0,991	0,159	2620	-19,8
Anserina	2-Metil-butanol	6,0	0,998	0,041	3535	-20,6
	Hexanal	6,5	0,988	0,038	2658	-19,9
Mioglobina	2-Metil-butanol	6,0	0,994	3	1083	-17,6

hiperbólicas y también las gráficas de dobles recíprocos son lineales indicando la ausencia de cooperación.

Los parámetros de interacción (tabla VI.9) se obtienen a partir de la pendiente e intersección de la gráfica de Scatchard (figura VI.14). El número de sitios de unión es muy bajo en la interacción con carnosina y anserina probablemente debido a la estructura de estos dipéptidos (tablas VI.9). Sin embargo, en la interacción de mioglobina con 2-metil-butanal se determina que existen 3 sitios de unión.

Las constantes de afinidad (tablas VI.9) obtenidas indican que la afinidad de la carnosina es más alta para dos aldehídos lineales, hexanal y octanal, y muy baja para 2-metil-butanal. Por otra parte, anserina muestra una constante de afinidad más alta con 2-metil-butanal que con hexanal, mientras que la mioglobina muestra una constante de afinidad media para 2-metil-butanal.

El porcentaje de interacción de anserina con 2-metil-butanal y hexanal es bajo a todos los pH estudiados (figura VI.12). Sin embargo, la constante intrínseca de interacción para ambos compuestos tiene un valor medio. Esta diferencia en el porcentaje de interacción se debe a que la razón molar de anserina/compuesto volátil es menor que la razón molar utilizada con carnosina.

En la interacción de los compuestos volátiles con carnosina, la constante de afinidad es menor para 2-metil-butanal (tabla VI.9). Estos resultados indicarían que la estructura de 2-metil-butanal produce un efecto estérico que causaría menos afinidad para la unión a la carnosina. Sin embargo, este efecto estérico no se observa en la interacción de este compuesto con anserina, debido a que la constante de afinidad es mayor (tabla VI.9). Además, en este estudio el pH es diferente ( $\text{pH} = 6,0$ ) y puede alterar la afinidad de unión entre anserina y 2-metil-butanal. Sin embargo, no

existen diferencias significativas en la interacción entre anserina y 2-metil-butanal cuando el pH cambia (figura VI.12).

Los valores obtenidos para la energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) son menores para la interacción entre carnosina y mioglobina con 2-metil-butanal y son mayores para la interacción entre carnosina y 3-metil-butanal, hexanal y octanal (tablas VI.9). Damodaran y Kinsella (1981a) y O'Keefe et al. (1991a) indican que el incremento de la energía libre de Gibbs con la longitud de la cadena esta de acuerdo con una interacción más hidrofóbica, sin embargo, la interacción de hexanal y octanal con carnosina (tabla VI.9) no observamos un aumento en la energía libre de Gibbs con el incremento de la longitud de la cadena.

Zhou y Decker (199b) han estudiado la interacción entre hexanal y varios dipéptidos que contienen histidina, y observan que a medida que aumenta el número de carbonos de la cadena del aminoácido que acompaña a la histidina, la interacción aumenta. Por otra parte, el dipéptido isoleucina-histidina tiene menos afinidad por el hexanal que la leucina-histidina. Esto indica que el grupo metilo del primer átomo de carbono de la cadena del aminoácido que acompaña a la histidina tiene mayor impacto en la interacción con hexanal que cuando el grupo metilo está ubicado en el segundo átomo de carbono de la cadena (Zhou y Decker, 1999b). En nuestros estudios, la constante obtenida en la interacción entre carnosina y anserina con hexanal (tabla VI.9) es mayor para carnosina que para anserina, lo cual indica que el grupo metilo presente en la anserina hace al grupo amino menos reactivo. Sin embargo, el comportamiento contrario es observado para la interacción de 2-metil-butanal con carnosina y anserina (tabla VI.9), donde la constante de afinidad de unión es más alta para la interacción con anserina.

## **VI.6.- OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME) PARA EL ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS AGENTES DE CURADO EN LA INTERACCIÓN ENTRE COMPUESTOS VOLÁTILES Y PROTEICOS SOLUBLES PRESENTES EN EL JAMÓN CURADO**

### **VI.6.1.- Selección de la concentración de los compuestos volátiles**

La selección de la concentración de los compuestos volátiles se basa en el cálculo de la concentración de cada compuesto volátil en el espacio de cabeza de jamón curado, según los datos obtenidos en el apartado VI.2.2.

Las áreas de respuesta del cromatógrafo obtenidas en la adsorción de los compuestos volátiles con la fibra de SPME de Car/PDMS que se mantiene durante 30 min a 30 °C en el espacio de cabeza de jamón curado (apartado VI.2.2), se utilizan para el cálculo de la concentración de los compuestos volátiles en el espacio de cabeza (tabla VI.10).

En el diseño del sistema modelo que simula la concentración que existe en el jamón curado, se pretende seleccionar una concentración en proporción similar a la existente en el jamón curado. Ahora bien, como en este sistema modelo los estudios se realizan en disoluciones acuosas, las concentraciones seleccionadas son diferentes pero se ha intentado mantener la proporción que existe en el jamón estudiado (tabla VI.10).

La selección de la concentración de los compuestos volátiles se desea mantener en una proporción similar en el espacio de cabeza y en la disolución modelo. Por ello, se selecciona 2 ppm de 2-metil-butanal y 3-metil-butanal en la disolución y la mitad de esta concentración (1 ppm) para hexanal y 2-pentanona. Sin embargo, para 2-octanal y metional se selecciona una concentración superior a la concentración proporcional (0,1 ppm) debido

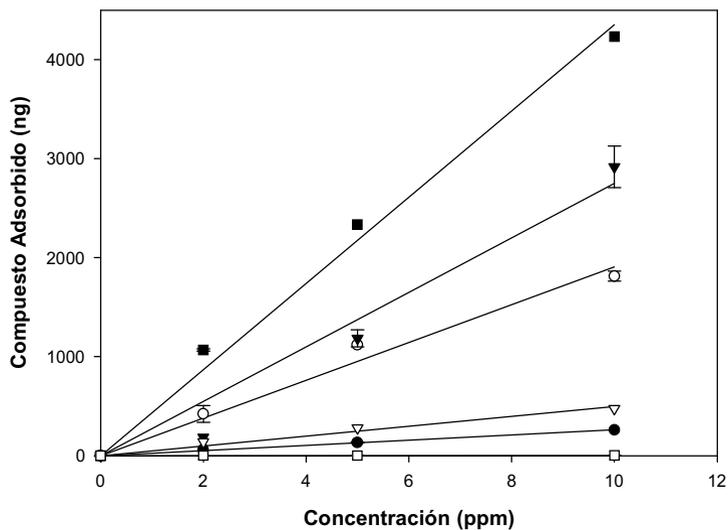
a que el área de respuesta del cromatógrafo de gases a dicha concentración es muy baja, por lo que se decide aumentar la concentración en la disolución a 1 ppm para octanal y 5 ppm para metional.

**Tabla VI.10.-** Concentración seleccionada de cada compuesto volátil.

Compuesto volátil	Area (FID) Promedio±desv	Concentración	
		Calculada en el espacio de cabeza (ppb)	Seleccionada en la disolución (ppm)
2-Metil-butanal	1133101±516171	11,726	2,0
3-Metil-butanal	2747108±196226	12,190	2,0
Hexanal	974104±263969	3,356	1,0
Octanal	116024±29811	0,127	1,0
2-Pentanona	2790393±547408	4,521	1,0
Metional	5015±237	0,005	5,0

### VI.6.2.- Linealidad de la detección

Con el fin de establecer si existe competencia entre los compuestos estudiados por la fibra de Car/PDMS, se determina la linealidad de detección de cada compuesto volátil (figura VI.15). Para ello, se mantiene la fibra durante 30 min a 30°C en presencia de la mezcla de compuestos volátiles a diferentes concentraciones. Se observa que a las concentraciones estudiadas (2 a 10 ppm) la respuesta es lineal para todas ellas y no se observan fenómenos de competición.



**Figura VI.15.-** Intervalo lineal de detección de los compuestos volátiles con la fibra de Car/PDMS: 2-metil-butanal, (●); 3-metil-butanal, (○); hexanal, (▼); octanal, (▽); 2-pentanona, (■); metional, (□).

## **VI.7.- ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS AGENTES DE CURADO EN LA INTERACCIÓN ENTRE COMPUESTOS VOLÁTILES Y PROTEICOS**

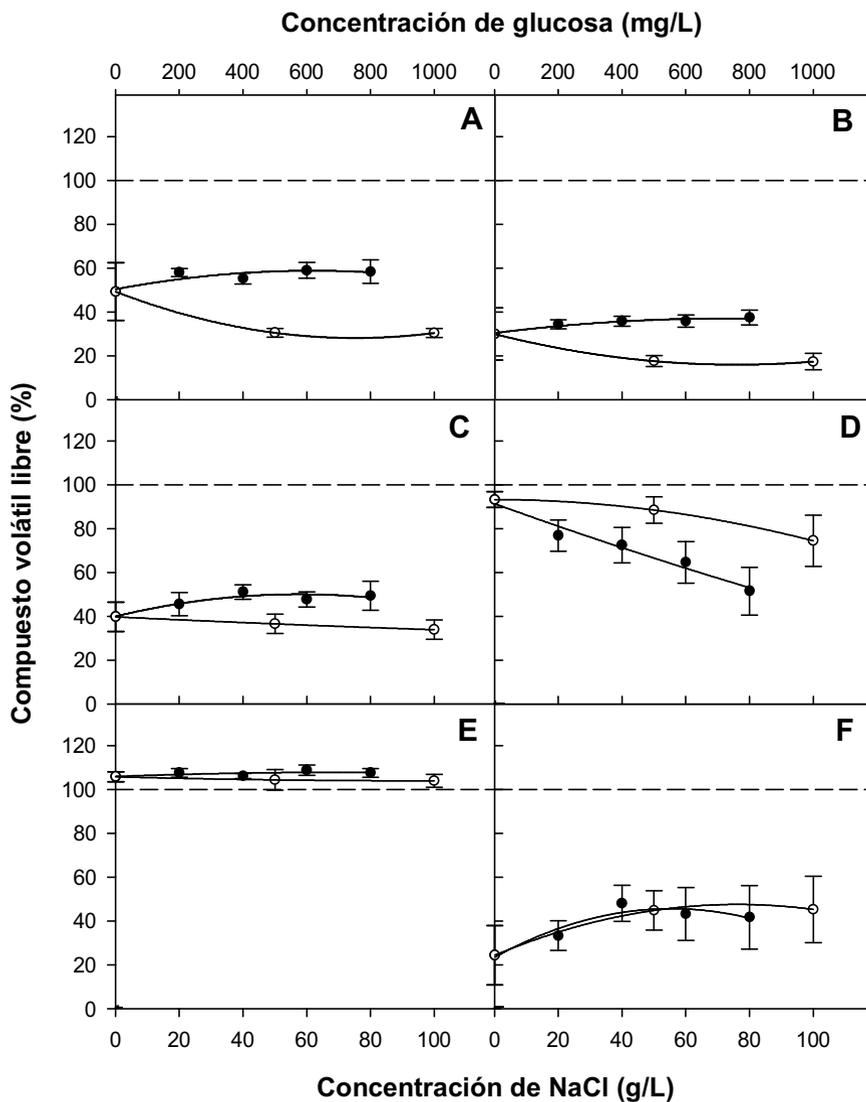
### **VI.7.1.- Estudio del efecto de los agentes de curado en la interacción entre compuestos volátiles y carnosina.**

Debido a la existencia de interacciones entre los compuestos volátiles y proteicos es importante determinar si la presencia de agentes de curado produce un efecto sobre la interacción ya que eso supondrá que su presencia pueda modular la percepción del aroma en jamón curado.

#### **-Efecto de la concentración de cloruro de sodio**

El cloruro de sodio ejerce un leve efecto sobre la interacción de la carnosina con 2-metil-butanal (figura VI.16A), 3-metil-butanal (figura VI.16B) y hexanal (figura VI.16C). El porcentaje libre de estos compuestos volátiles aumenta levemente con el aumento de la concentración de cloruro de sodio. Esto significa que la interacción de estos compuestos con la carnosina disminuye levemente cuando aumenta la concentración de cloruro de sodio presente en la disolución.

Por otra parte, el aumento de la concentración de cloruro de sodio produce un aumento lineal de la interacción entre octanal y carnosina (figura VI.16D), mientras que el porcentaje de metional libre en el espacio de cabeza aumenta con la concentración de cloruro de sodio hasta un máximo (40g/L de NaCl) para luego comenzar a disminuir ligeramente (figura VI.16F).



**Figura VI.16.-** Efecto de la concentración de NaCl, (●) y glucosa, (○) sobre el porcentaje de compuesto volátil libre en presencia de carnosina: (A), 2-metil-butanal; (B), 3-metil-butanal; (C), hexanal; (D), octanal; (E), 2-pentanona; (F), metional.

**-Efecto de la concentración de glucosa**

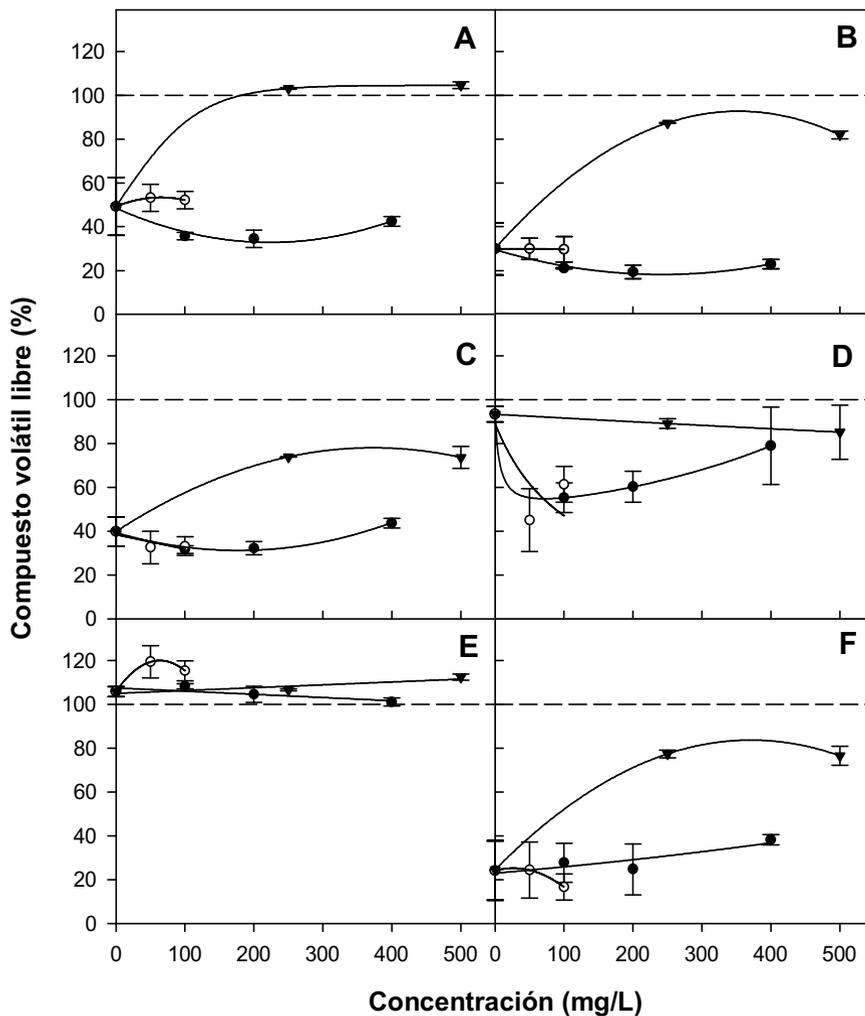
El estudio del efecto de la concentración de glucosa sobre la interacción con la carnosina se observa en la figura VI.16. Los porcentajes libres de 2-metil-butanal (figura VI.16A), 3-metil-butanal (figura VI.16B) y hexanal (figura VI.16C) disminuyen en presencia de glucosa, es decir, en estos compuestos aumenta la interacción con el incremento de la concentración de glucosa. Por otra parte, se observa una mayor interacción con octanal (figura VI.16D) debido a un incremento en la concentración de glucosa, pero los resultados obtenidos a 1 g/L presentan un alto coeficiente de varianza.

Se produce un aumento en el porcentaje de metional libre (figura VI.16F) en la interacción entre metional y carnosina en presencia de glucosa, lo cual significa que la concentración de glucosa disminuye la interacción entre la carnosina y el metional

Por último, tanto el cloruro de sodio como la glucosa no afectan el porcentaje de 2-pentanona libre en presencia de carnosina (figura VI.16E).

**-Efecto de la concentración de nitrato**

La concentración de nitrato ejerce un efecto sobre la interacción de los compuestos volátiles con la carnosina. En presencia de una baja concentración de nitrato los porcentajes libres de 2-metil-butanal (figura VI.17A), 3-metil-butanal (figura VI.17B), hexanal (figura VI.17C), y octanal (figura VI.17D) disminuyen. Posteriormente, se observa que conforme aumenta la concentración de nitrato el porcentaje libre de estos compuestos aumenta superando ligeramente en algún caso (hexanal) el porcentaje de compuesto volátil libre en ausencia de nitrato.



**Figura VI.17.-** Efecto de la concentración de nitrato, (●); nitrito, (○) y ácido ascórbico, (▼) sobre el porcentaje de compuesto volátil libre en presencia de carnosina: (A), 2-metil-butanal; (B), 3-metil-butanal; (C), hexanal; (D), octanal; (E), 2-pentanona; (F), metional.

**- Efecto de la concentración de nitrito**

El efecto de la concentración de nitrito es muy variable según el compuesto volátil. En el caso del octanal, la concentración de nitrito disminuye el porcentaje libre del compuesto en presencia de carnosina, es decir, la presencia de nitrito aumenta la interacción entre octanal y carnosina (figura VI.17D). Lo mismo ocurre con el metional (figura VI.17F), aunque este aumento en la interacción se observa cuando la concentración de nitrito es más elevada.

La concentración de nitrito produce un aumento del porcentaje libre de 2-pentanona cuando interacciona con carnosina este compuesto, superior al 100% (figura VI.17E), esto significa que el nitrito produce una liberación de 2-pentanona al espacio de cabeza.

**- Efecto de la concentración de ácido ascórbico**

En la interacción con carnosina, el ácido ascórbico produce un aumento en el porcentaje de compuesto volátil libre para todos los compuestos estudiados (figura VI.17), excepto para octanal y 2-pentanona donde el ácido ascórbico produce un leve descenso en el porcentaje de octanal libre (figuras VI.17E y VI.17D, respectivamente).

### **VI.7.2.- Estudio del efecto de los agentes de curado en la interacción entre compuestos volátiles y la anserina.**

#### **-Efecto de la concentración de cloruro de sodio**

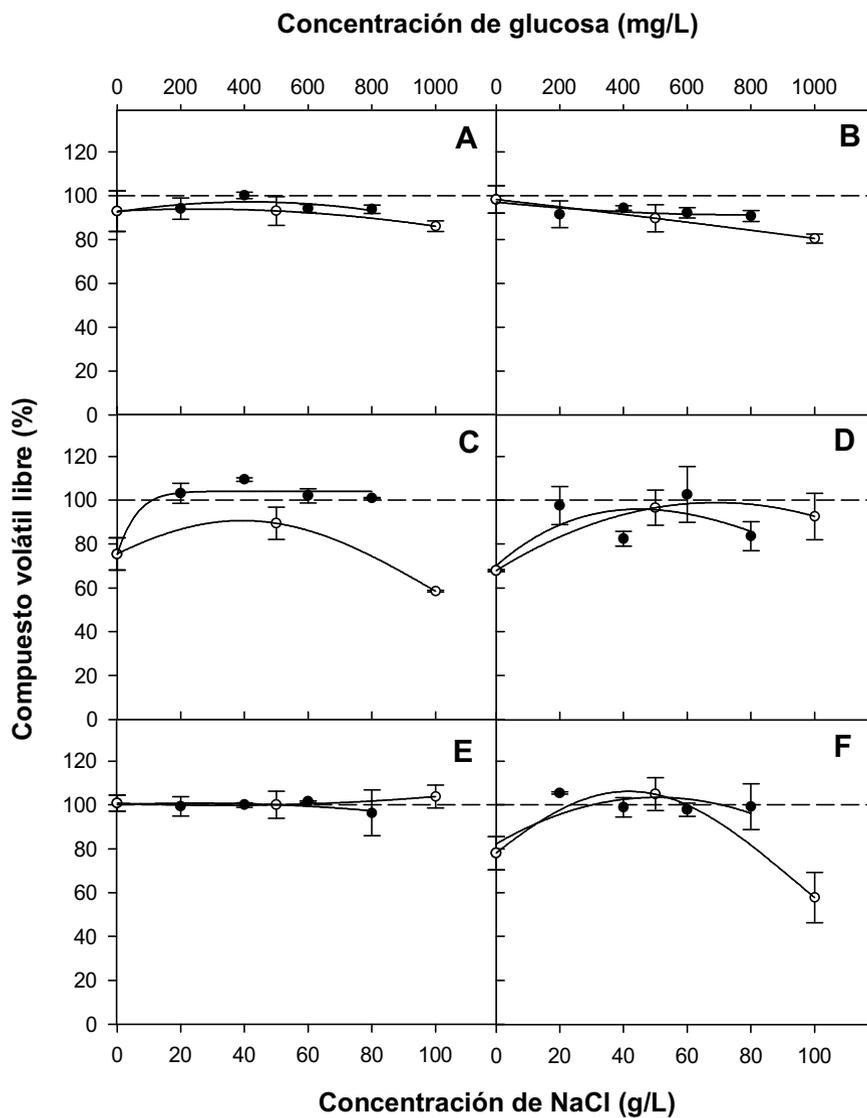
La concentración de cloruro de sodio aumenta el porcentaje libre de hexanal, octanal y metional (figura VI.18). Esta disminución en la interacción entre estos compuestos volátiles y anserina es mayor cuando la concentración de cloruro de sodio es de 20 g/L, pero a mayor concentración no se produce variación en el porcentaje de interacción.

#### **-Efecto de la concentración de glucosa**

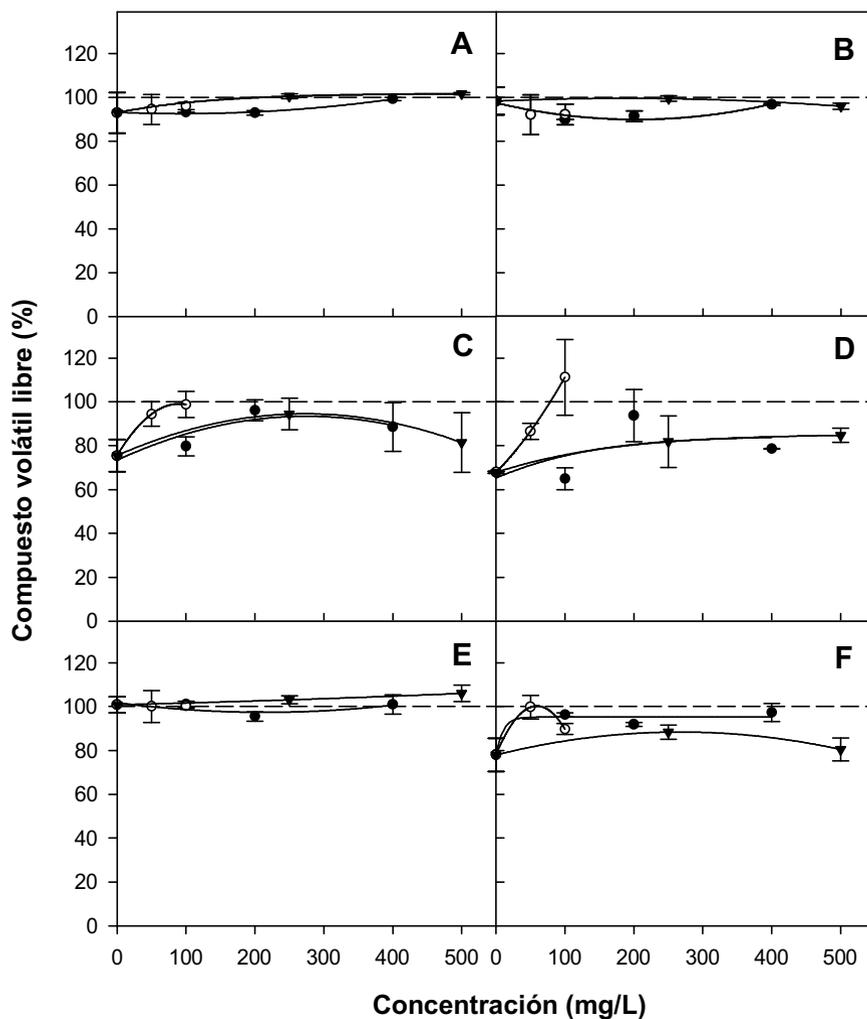
La concentración de glucosa disminuye levemente el porcentaje libre de los aldehídos ramificados 2-metil-butanal y 3-metil-butanal en presencia de anserina (figuras VI.18A y VI.18B). Por otra parte, se observa que cuando la concentración de glucosa es 0,5 g/L, el porcentaje libre de hexanal, octanal y metional (figuras VI.18C, VI.18D, VI.18F) aumenta respecto de la solución que se encuentra en ausencia de glucosa, es decir, la interacción con anserina disminuye. Sin embargo, cuando la concentración de glucosa aumenta a 1g/L, los porcentajes libres de hexanal y metional disminuyen y el porcentaje libre de octanal se mantiene en el valor obtenido a 0,5 g/L de glucosa. Por tanto, la concentración de glucosa produce un efecto significativo sobre la interacción.

#### **-Efecto de la concentración de nitrato**

En el estudio del efecto del nitrato en el porcentaje de compuesto volátil libre en presencia de anserina, se observa que la adición de nitrato aumenta los porcentajes libres de hexanal, octanal (figuras VI.19C y VI.19D) y metional (figura VI.19F). Por otra parte, los porcentajes de



**Figura VI.18.-** Efecto de la concentración de NaCl, (●) y glucosa, (○) sobre el porcentaje de compuesto volátil libre en presencia de anserina: (A), 2-metil-butanal; (B), 3-metil-butanal; (C), hexanal; (D), octanal; (E), 2-pentanona; (F), metional.



**Figura VI.19.-** Efecto de la concentración de nitrato, (●); nitrito, (○); ácido ascórbico, (▼) sobre el porcentaje de compuesto volátil libre en presencia de anserina: (A), 2-metil-butanal; (B), 3-metil-butanal; (C), hexanal; (D), octanal; (E), 2-pentanona; (F), metional.

compuestos volátil libre, 2-metil-butanal (figura VI.19A), 3-metil-butanal (figura VI.19B) y 2-pentanona (figura VI.19E) se mantienen relativamente constantes.

**- Efecto de la concentración de nitrito**

En la interacción con anserina, el nitrito produce un aumento en el porcentaje de compuesto volátil libre de los aldehídos lineales, hexanal (figura VI.19C), y octanal (figura VI.19D).

La concentración de nitrito no ejerce ningún efecto sobre la interacción entre anserina y 2-pentanona (figura VI.19E). Además, la concentración de nitrito tiene un ligero efecto sobre la interacción con los aldehídos ramificados (figuras VI.19A y VI.19B).

**-Efecto de la concentración de ácido ascórbico**

En la interacción con anserina en presencia de ácido ascórbico se observa que el porcentaje libre de 2-metil butanal (figura VI.19A), 3-metil-butanal (figura VI.19B), 2-pentanona (figura VI.19E), se mantiene alrededor del 100% sin afectar el valor inicial de la interacción. Por otra parte, a una mayor concentración de ácido ascórbico aumenta el porcentaje de octanal libre (figura VI.19D). En resumen, la concentración de ácido ascórbico tiene un ligero o ningún efecto sobre la interacción con anserina.

### **VI.7.3.- Estudio del efecto de los agentes de curado en la interacción entre compuestos volátiles y la mioglobina**

#### **-Efecto de la concentración de cloruro de sodio**

La concentración de cloruro de sodio no afecta a la interacción entre mioglobina y 2-metil-butanal (figura VI.20A), 3-metil-butanal (figura VI.20B) y 2-pentanona (figura VI.20E).

Los compuestos hexanal (figura VI.20C), octanal (figura VI.20D) y metional (figura VI.20F) no son retenidos por la mioglobina en ausencia de cloruro de sodio, aunque, la presencia y el aumento de la concentración de cloruro de sodio disminuye el porcentaje libre de estos compuestos.

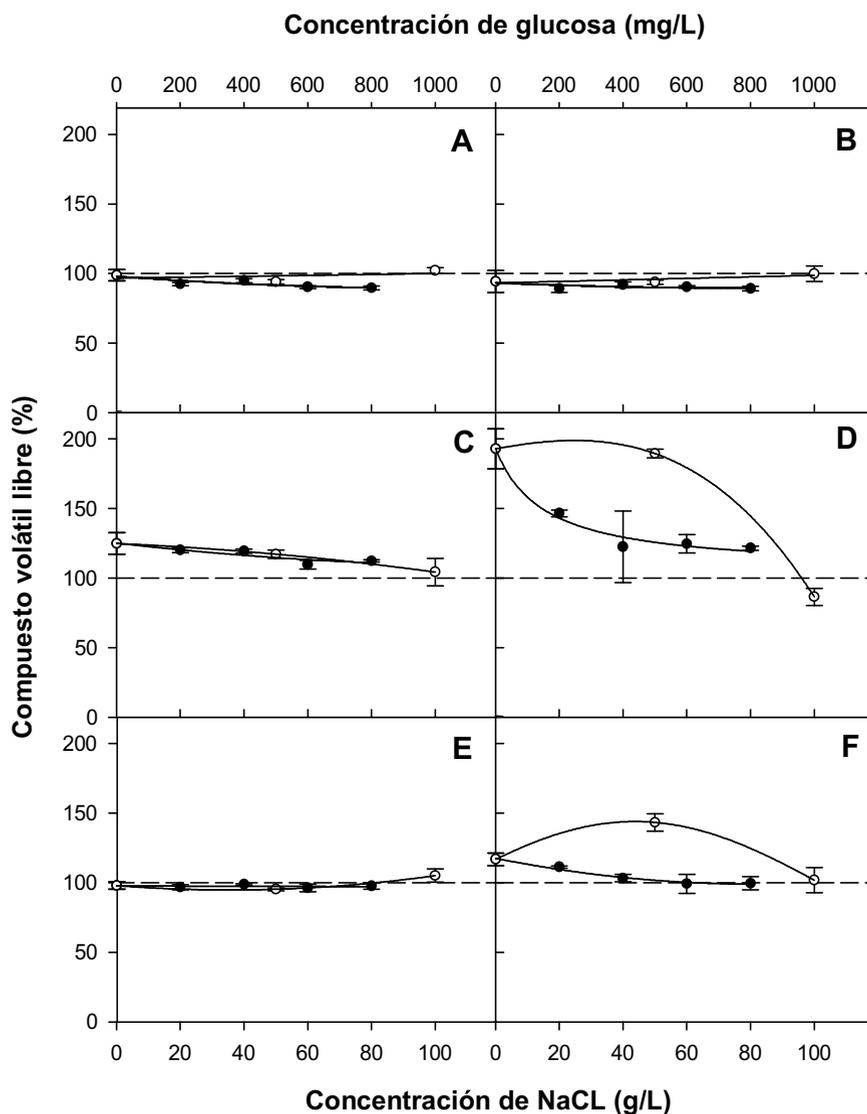
#### **-Efecto de la concentración de glucosa**

La concentración de glucosa no afecta a la interacción entre mioglobina y 2-metil-butanal (figura VI.20A), 3-metil-butanal (figura VI.20B), y 2-pentanona (figura VI.20E).

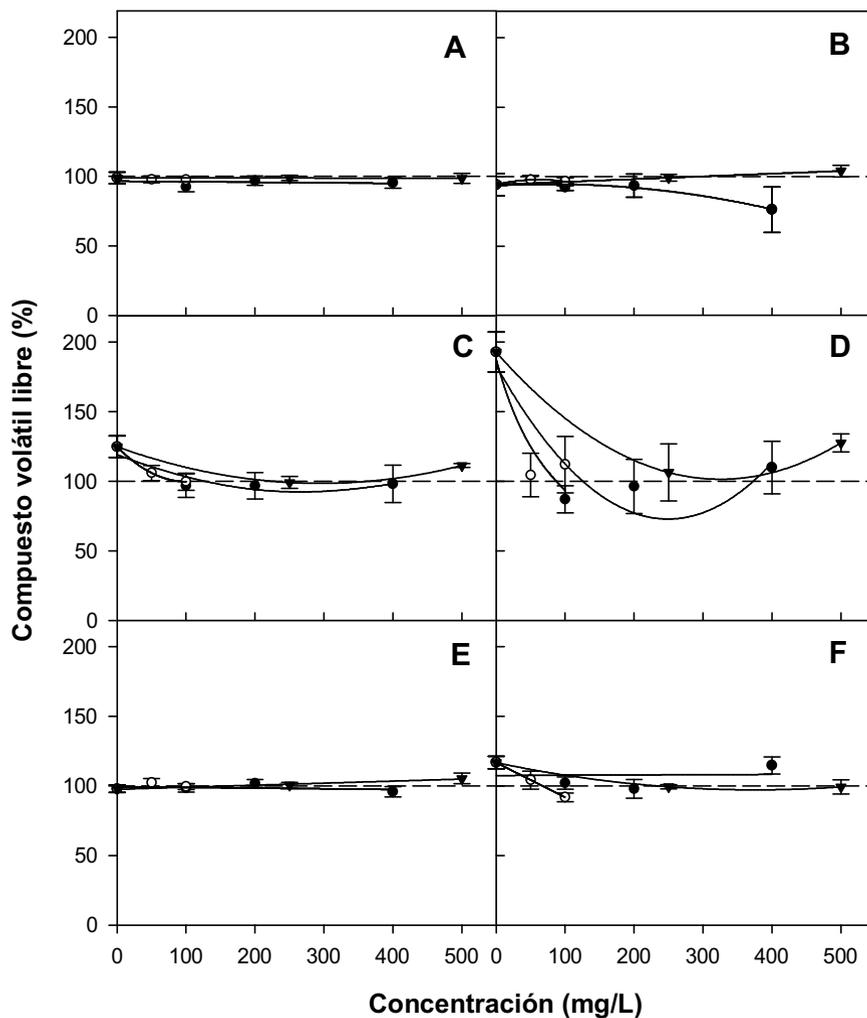
En cambio, la concentración de cloruro de sodio disminuye los porcentajes libres de hexanal (figura VI.20C) y, de forma más acusada, de octanal (figura VI.20D) y metional (figura VI.20F).

#### **-Efecto de la concentración de nitrato**

El porcentaje libre de todos los compuestos volátiles se encuentra alrededor del 100% (figura VI.21), cuando la concentración de nitrato alcanza los 400 mg/L, excepto para 3-metil-butanal (figura VI.21B) donde el porcentaje libre es menor, del orden de 76,4%.



**Figura VI.20.-** Efecto de la concentración de NaCl, (●) y glucosa, (○) sobre el porcentaje de compuesto volátil libre en presencia de mioglobina: (A), 2-metil-butanal; (B), 3-metil-butanal; (C), hexanal; (D), octanal; (E), 2-pentanona; (F), metional.



**Figura VI.21.-** Efecto de la concentración de nitrato (●); nitrito, (○) y ácido ascórbico, (▼) sobre el porcentaje de compuesto volátil libre en presencia de mioglobina: (A), 2-metil-butanal; (B), 3-metil-butanal; (C), hexanal; (D), octanal; (E), 2-pentanona; (F), metional.

**- Efecto de la concentración de nitrito**

La concentración de nitrito disminuye el porcentaje libre de octanal en presencia de la mioglobina (figura VI.21D), es decir, la concentración de nitrito aumenta la interacción entre octanal y mioglobina. Lo mismo ocurre con metional (figura VI.21F) y hexanal (figura VI.21C), aunque la disminución de este porcentaje libre es menor. Por otra parte, la concentración de nitrito no afecta la interacción entre mioglobina y 2-metil-butanol (figura VI.21A), 3-metil-butanol (figura VI.21B), y 2-pentanona (figura VI.21E).

**- Efecto de la concentración de ácido ascórbico**

El ácido ascórbico disminuye los porcentajes libres de hexanal (figura VI.21C) y octanal (figura VI.21D), en presencia de mioglobina. Sin embargo, cuando la concentración de ácido ascórbico es más alta el porcentaje libre de estos compuestos tiende a aumentar ligeramente. Por otra parte, la concentración de ácido ascórbico no afecta la interacción entre mioglobina y 2-metil-butanol (figura VI.21A), 3-metil-butanol (figura VI.21B) y 2-pentanona (figura VI.21E).

**VI.7.3.1.- Efecto de los agentes de curado sobre el estado de oxidación de la mioglobina**

El efecto de los agentes de curado sobre el estado de oxidación de la mioglobina se determina con el fin de establecer cual de las formas químicas de la mioglobina es la causante de los fenómenos de interacción. La concentración de ácido ascórbico tiene un efecto sobre el estado de oxidación de la mioglobina. Los porcentajes de mioglobina y oximioglobina aumentan con la concentración de ácido ascórbico, mientras que el porcentaje de metamioglobina disminuye (tabla VI.11), efecto debido a la

actividad reductora del ácido ascórbico. Por otra parte, las concentraciones de cloruro de sodio, glucosa y nitrito no tienen efecto sobre los estados de oxidación de la mioglobina. Sin embargo, para una concentración de 400 mg/L de nitrato disminuye la proporción de metamioglobina y aumenta la proporción de oximioglobina (tabla VI.11).

**Tabla VI.11.-** Efecto de los agentes de curado sobre los porcentajes de los tres estados de oxidación de la mioglobina, a pH 6,0

<b>Concentración de los agentes de curado</b>	<b>Mioglobina</b>	<b>Oximioglobina</b>	<b>Metamioglobina</b>
<b>Cloruro de sodio (g/L)</b>			
0	--	6,8	93,2
40	--	6,2	93,8
80	--	6,4	93,6
<b>Glucosa (mg/L)</b>			
0	--	6,8	93,2
500	--	5,9	94,1
1000	--	6,1	93,9
<b>Nitrato (mg/L)</b>			
0	--	6,8	93,2
100	--	6,7	92,8
200	--	6,8	93,2
400	0,7	13,7	85,7
<b>Nitrito (mg/L)</b>			
0	--	6,8	93,2
50	--	5,6	94,4
100	--	5,8	94,2
<b>Ácido Ascórbico (mg/L)</b>			
0	--	6,8	93,2
250	2,1	42,3	55,6
500	17,7	46,9	35,4

A pesar de la existencia de cambios en el estado de oxidación de la mioglobina en presencia de ácido ascórbico, los efectos sobre la interacción fueron poco destacables y solo afectaron a la concentración de octanal (figura VI.21). Además, el efecto del ácido ascórbico sobre la interacción entre octanal y carnosina sigue la misma tendencia que la observada en presencia de los agentes de curado nitrito y nitrato (figura VI.21D), aunque estos agentes tienen muy poco efecto sobre el estado de oxidación de la mioglobina (tabla VI.11). Este hecho indica que la parte del anillo de porfirina donde se da el cambio del estado de oxidación de la mioglobina interviene muy poco en la liberación, y al parecer la estructura proteica (globina) interviene en la liberación de octanal.

De los resultados obtenidos del estudio del efecto de los agentes de curado en la interacción con compuestos volátiles es de destacar que la adición de una mezcla de compuestos volátiles varía el porcentaje de interacción de los compuestos volátiles respecto del porcentaje de interacción obtenido con cada compuesto en particular (ver figura VI.12).

Los porcentajes de interacción entre carnosina y 2-metil-butanal, 3-metil-butanal y metional y entre anserina y octanal y metional aumentan en presencia de la mezcla de compuestos volátiles (figuras VI.16, VI.17, VI.18, VI.19), respecto del porcentaje de interacción obtenido con cada compuesto en particular (figura VI.12). Este aumento del porcentaje de interacción se podría deber a que cuando se utiliza la mezcla de los compuestos volátiles, la concentración de cada compuesto volátil utilizada es menor que cuando se utiliza cada compuesto en particular. Así pues, existe más proteína por mol de compuesto volátil para la interacción, de manera que el porcentaje de interacción aumenta cuando la concentración de volátil es menor. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Ng et al. (1989) y Landy et al. (1995) que indican que cuando la razón proteína / compuesto volátil aumenta también aumenta el porcentaje de interacción del compuesto volátil.

Por otra parte, en la interacción entre carnosina y octanal (figuras VI.16, VI.17) disminuye el porcentaje de interacción cuando se utiliza la mezcla de compuestos volátiles respecto del porcentaje de interacción obtenido con dicho compuesto en particular en presencia de carnosina. En este caso, la disminución en el porcentaje de interacción se podría deber a un efecto de competición por los sitios de unión a la carnosina por 3-metil-butanal, 2-metil-butanal, metional y hexanal. La unión de estos compuestos a la carnosina impediría la interacción con octanal. De acuerdo con las constantes de afinidad medidas para cada compuesto volátil por separado (tabla VI.9) la afinidad de unión de carnosina es mayor para hexanal y 3-metil-butanal que para octanal, por lo cual estos compuestos competirían por la unión de octanal a la carnosina.

Los resultados obtenidos en el estudio realizado sobre el efecto del cloruro de sodio en la interacción con la carnosina (figura VI.16) y la anserina (figura VI.18) indican que solo con algunos compuestos volátiles aumenta el porcentaje de interacción con la concentración de cloruro de sodio. En estudios realizados por Damodaran y Kinsella (1981b) con proteína de soja la afinidad de unión aumenta con la concentración de cloruro de sodio. Los mismos resultados se obtienen en la interacción entre BSA y 2-nonanona (Kinsella, 1990). Por otra parte, en la interacción de la mioglobina (figura VI.21) con octanal y metional, la concentración de cloruro de sodio permite retener estos compuestos. Respecto a los otros agentes de curado no existen antecedentes sobre el efecto que tienen sobre la interacción con proteínas o péptidos.

**VI.8.- ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE COMPUESTOS VOLÁTILES Y PROTEICOS EN PRESENCIA DE MEZCLA DE AGENTES DE CURADO**

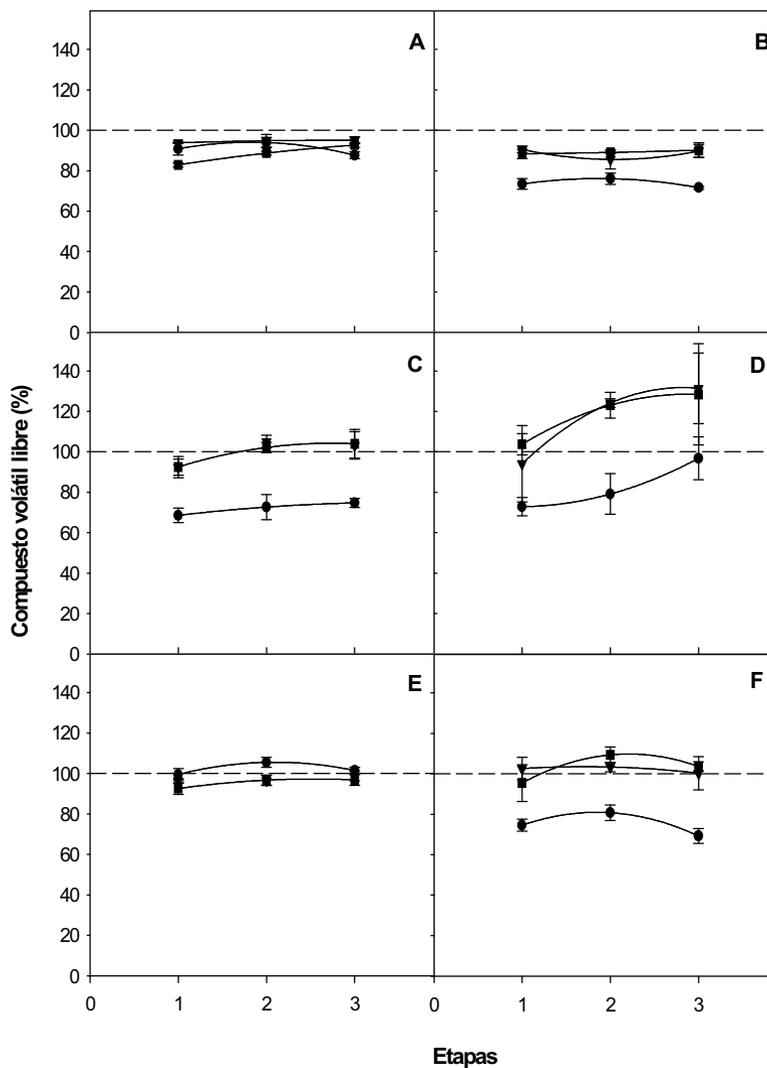
El efecto de la mezcla de los agentes de curado se estudia preparando mezclas de agentes de curado a determinados pH, simulando las etapas características del proceso del jamón curado. La etapa I correspondería a la etapa final del post salado, mientras que las etapas II y III corresponderían a la mitad y al final del proceso de curado, respectivamente.

La variación de la concentración de los agentes de curado puede modificar la proporción de mioglobina. En la etapa I el porcentaje de mioglobina es mayor respecto de las otras etapas (II, III) (tabla VI.12) donde las proporciones de oximioglobina y metamioglobina son mayores.

**Tabla VI.12.-** Efecto de la mezcla de los agentes de curado sobre los porcentajes de los tres estados oxidación de la mioglobina, a pH 6,0.

<b>Etapas</b>	<b>Mioglobina</b>	<b>Oximioglobina</b>	<b>Metamioglobina</b>
<b>I</b>	8,9	18,7	72,3
<b>II</b>	0,8	19,3	79,8
<b>III</b>	--	20,1	79,9

El efecto de la mezcla de los agentes de curado sobre la interacción entre compuestos volátiles y proteicos se muestra en la figura VI.22.



**Figura VI.22.-** Efecto combinado de los agentes de curado en los porcentajes de compuestos volátiles libres en presencia de: Carnosina,(●); Anserina, (▼); Mioglobina, (■): (A), 2-metil-butanal; (B), 3-metil-butanal; (C), hexanal; (D), octanal; (E), 2-pentanona; (F), metional. Etapa 1 corresponde al post-salado, Etapa 2 corresponde a la mitad del curado, y Etapa 3 corresponde al final del de curado.

**- Carnosina**

El porcentaje de compuesto libre en presencia de carnosina se mantiene con valores cercanos al 100% o ligeramente inferiores para los compuestos; 2-metil-butanal (figura VI.22A), y 2-pentanona (figura VI.22E). Por otra parte, la interacción entre carnosina y; 3-metil-butanal (figura VI.22B), y hexanal (figura VI.22C), se mantiene relativamente constante en las etapas de curado. Sin embargo, el porcentaje de interacción de estos compuestos es mayor que el obtenido con 2-metil-butanal y 2-pentanona.

La mezcla de los agentes de curado tiene un comportamiento distinto sobre la interacción entre carnosina y octanal (figura VI.22D). El porcentaje de compuesto volátil libre aumenta durante las etapas de curado, es decir, la interacción disminuye durante el curado. Por otra parte, la interacción aumenta levemente entre carnosina y metional en la etapa final del proceso de curado (figura VI.22F).

Es de destacar que los resultados de interacción obtenidos con carnosina son diferentes a los obtenidos con anserina y mioglobina.

**- Anserina**

El porcentaje libre de 2-metil-butanal (figura VI.22A), se mantiene constante en las diferentes etapas de curado. El porcentaje de interacción de este compuesto con anserina es bajo, pero, el porcentaje de interacción de 3-metil-butanal (figura VI.22B), es ligeramente superior al obtenido con 2-metil-butanal.

El porcentaje libre de los aldehídos lineales en presencia de anserina aumenta durante el proceso de curado (figura VI.22C y VI.22D). Por otra parte, no se observa ningún efecto de la mezcla de los agentes de curado sobre la interacción entre anserina y 2-pentanona (figura VI.22E), y metional (figura VI.22F).

### - Mioglobina

Los resultados obtenidos en la interacción de la mioglobina con estos compuestos volátiles son similares a los obtenidos en la interacción con la anserina.

El porcentaje libre de 2-metil-butanal (figura VI.22A), se mantiene constante en las diferentes etapas de curado. El porcentaje de interacción de 3-metil-butanal (figura VI.22B), es levemente superior al obtenido con 2-metil-butanal.

El porcentaje libre de los aldehídos lineales en presencia de mioglobina aumenta durante el proceso de curado (figuras VI.22C y VI.22D). Por otra parte, no se observa ningún efecto de la mezcla de los agentes de curado sobre la interacción entre mioglobina y 2-pentanona (figura VI.22E).

A partir de los resultados obtenidos del estudio del efecto de mezclas de agentes de curado que simulan las etapas del proceso de curado es de destacar que el porcentaje de interacción de los compuestos volátiles con carnosina es mayor que el obtenido con anserina y mioglobina en presencia de la mezcla de los agentes de curado. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el estudio de la interacción entre los compuestos volátiles y los agentes de curado de forma individual (figura VI.16). En el estudio del efecto combinado de los agentes de curado, la presencia de ácido ascórbico en cada una de las etapas sería responsable de la disminución de la interacción entre carnosina y 2-metil-butanal (figura VI.22A), 3-metil-butanal (figura VI.22B) y metional (figura VI.22F), ya que en forma individual es el agente que produce una mayor liberación de estos compuestos en presencia de carnosina (figura VI.17). Por otra parte, en la interacción entre carnosina y octanal en presencia de la mezcla de los agentes de curado, la interacción disminuye a medida que avanzan las etapas

de curado, en este caso hay que destacar que el ácido ascórbico no afecta la interacción entre carnosina y octanal (figuras VI.17D). Así pues, la disminución de la interacción entre carnosina y octanal en las etapas de curado sería responsabilidad de las concentraciones de nitrato, glucosa y cloruro de sodio, ya que estos agentes de curado aumentan la interacción de manera individual en la etapa inicial de curado (ver figura VI.16 y VI.17).

El porcentaje de octanal libre en presencia de mioglobina aumenta durante el proceso de curado (figura VI.22D). Este aumento se puede explicar por el efecto que tendría la concentración de glucosa (figura VI.20D), ácido ascórbico y nitrato (figura VI.21D) sobre el porcentaje de octanal libre, ya que este porcentaje es menor cuando la concentración de los agentes de curado es mayor. Por ello, al avanzar el curado, la concentración de estos agentes de curado disminuye y produciría una liberación del octanal.

En resumen hay que señalar que el aroma típico a jamón curado no se atribuye a ningún compuesto específico sino a un conjunto de compuestos volátiles que se encuentran en las proporciones apropiadas (Barbieri et al., 1992 y Flores et al., 1997a). Los compuestos volátiles utilizados en nuestro estudio tienen un bajo umbral de percepción (Shahidi et al., 1986; Hinrichsen y Petersen, 1995) y se ha demostrado que participan en el aroma de jamón curado (Carrapiso et al., 2002). La modificación de la proporción relativa de estos compuestos volátiles debido a la interacción con los compuestos proteicos puede modular el aroma y, por consiguiente, cambiar la percepción sensorial del jamón curado.

1. La técnica de microextracción en fase sólida es apropiada para el análisis cualitativo y cuantitativo de los compuestos volátiles presentes en el espacio de cabeza de jamón curado. Se debe tener presente que existen muchos factores que afectan dicha extracción tales como el tipo de fibra, la volatilidad y la masa molecular de los compuestos volátiles. En el caso del tipo de fibra, las fibras de polaridad simple (PA y PDMS) no extraen ningún compuesto volátil del espacio de cabeza de jamón curado mientras que las fibras bi-polares, Car/PDMS y DVB/Car/PDMS, son capaces de extraer 70 compuestos volátiles distintos. La naturaleza de los compuestos volátiles extraídos depende de la polaridad de la fibra. La fibra de DVB/Car/PDMS extrae compuestos de media y alta masa molecular y la fibra Car/PDMS presenta preferencia por compuestos de baja masa molecular. Así, en el espacio de cabeza de jamón curado la fibra de DVB/Car/PDMS extrae mayoritariamente hexanal (18%) y 2-pentanona (10%) mientras que los compuestos extraídos de forma mayoritaria por la fibra de Car/PDMS son 3-metil-butanal (19,8%) y 2-metil-butanal (17,7%) seguido de hexanal (7%) y 2-pentanona (8%).
2. La evolución del perfil de adsorción con el tiempo de las fibras bi-polares de microextracción en fase sólida depende no solo de la afinidad de los compuestos por la fibra sino también de la existencia de fenómenos de competición. Es de destacar que la fibra Car/PDMS es capaz de extraer de 2 a 3 veces más cantidad de compuesto que la fibra DVB/Car/PDMS.
3. La técnica de microextracción en fase sólida ha demostrado gran utilidad para el estudio de la interacción entre compuestos volátiles y proteicos. La carnosina presenta interacción con todos los compuestos volátiles estudiados excepto con la 2-pentanona. La anserina presenta interacción

con 2-metil-butanal, 3-metil-butanal, hexanal y metional. Por último, la mioglobina solo presenta interacción con 2-metil-butanal y hexanal. En todos los casos estudiados, la interacción sigue la ecuación de Scatchard siendo una interacción no-covalente y reversible. En cuanto a los parámetros de interacción, la carnosina es el péptido con mayores constantes de afinidad “K” ( $M^{-1}$ ) por hexanal, 3-metil-butanal y octanal, mientras que la mioglobina presenta para el 2-metil-butanal un número de sitios de unión ( $n=3$ ) mayor que los dipéptidos.

4. La interacción entre compuestos volátiles y proteicos se ve afectada por la presencia de agentes de curado. De entre los agentes estudiados, el ácido ascórbico es el que produce un efecto más destacado al disminuir la interacción entre los compuestos volátiles (2-metil-butanal, 3-metil butanal, metional) y la carnosina. El efecto de la simulación de las etapas de curado sobre la interacción entre compuestos volátiles y proteicos solubles concuerda con los resultados obtenidos en los ensayos en presencia de los agentes de curado de forma individual. El porcentaje de interacción es mayor en las etapas de curado en presencia de carnosina que con anserina y mioglobina. En la 2ª y 3ª etapas de curado, la interacción permanece constante excepto en el caso de octanal que disminuye en presencia de los compuestos proteicos, y en el metional que aumenta ligeramente sobre todo en presencia de carnosina.
5. Los resultados obtenidos demuestran la existencia de interacciones entre compuestos volátiles y compuestos proteicos musculares solubles, las cuales producen la modificación de la proporción relativa de estos compuestos de gran potencia aromática en el espacio de cabeza. Dicha modificación puede modular el aroma y, por consiguiente, cambiar la percepción sensorial del jamón curado.

- Acree, T.E., Teranishi, R. (1993). Flavor Science. Sensible principles and technique, Professional Reference Book. American Chemical Society, Washington DC.
- Adams, R.L., Mottram, D.S., Parker, J.K., Brown, H.M. (2001). Flavor-protein binding: Disulfide interchange reactions between ovoalbumin and volatile disulfides. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4333-4336.
- Andriot, I., Harrison, M., Fournier, N., Guichard, E. (2000). Interactions between methyl ketones and  $\beta$ -Lactoglobulin: Sensory analysis, headspace analysis, and mathematical modeling. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 4246- 4251.
- Arthur, C.L., Pawliszyn, J. (1990). Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.*, 62, 2145-2148.
- Barbieri, G., Bolzoni, L., Parolari, G., Virgili, R., Buttini, R., Careri, M., Mangia, A. (1992). Flavor compounds of dry-cured ham. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 2389-2394.
- Bellavia, V., Natangelo, M., Fanelli, R., Rotilio, D. (2000). Analysis of benzothiazole in Italian wines using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography- mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 1239-1242.
- Berdagué, J.L., Denoyer, C., Le Quéré, J-L., Semon, E. (1991). Volatile components of dry-cured ham. *J. Agric. Food Chem.*, 39, 1257-1261.
- Bicchi, C.P., Panero, O.M., Pellegrino, G.M., Vanni, A.C. (1997). Characterization of roasted coffee and coffee beverages by solid phase microextraction-gas chromatography and principal component analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 4680-4686.
- Biswas, S., Staff, C. (2001). Analysis of headspace compounds of distillers grains using SPME in conjunction with GC/MS and TGA. *J. Cereal Sci.*, 33 223-229.
- Bolzoni, L., Barbieri, G., Virgili, R. (1996). Changes in volatile compounds of Parma ham during maturation. *Meat Sci.*, 43, 301-310.

- Boué, S.M., Shih, B.Y., Carter-Wientjes, C.H., Cleveland, T.E. (2003). Identification of volatile compounds in soybean at various developmental stages using solid phase microextraction. *J. Agric. Food Chem.*, *51*, 4873-4879.
- Brunton, N.P., Cronin, D.A., Monahan, F.J., Durcan, R.A. (2000). A comparison of solid-phase microextraction (SPME) fibres for measurement of hexanal and pentanal in cooked turkey. *Food Chem.*, *68*, 339- 345.
- Brunton, N.P., Cronin, D.A., Monahan, F.J. (2001). The effects of temperature and pressure on the performance of Carboxen/PDMS fibres during solid phase microextraction (SPME) of headspace volatiles from cooked and raw turkey breast. *Flavour Fragrance J.*, *16*, 294-302.
- Buscailhon, S., Berdagué, J.L., Monin, G. (1993). Time-related changes in volatile compounds of lean tissue during processing of French dry-cured ham. *J. Agric. Food Chem.*, *63*, 69-75.
- Buscailhon , S., Berdagué, J.L., Bousset, J., Cornet, M., Gandemer, G., Touraille, C., Monin, G. (1994). Relations between compositional traits and sensory qualities of French dry-cured ham. *Meat Sci.*, *37*, 229-243.
- Buttery, R.G., Bomben, J.L., Guadagni, D.G., Ling, L.C. (1971). Some considerations of the volatilities of organic flavor compounds in foods. *J. Agric. Food Chem.*, *19*, 1045-1048.
- Carnegie, P.R., Ilic, M.Z., Etheridge, M.O., Stuardt, S. (1985). Use of histidine dipeptides and myoglobin to monitor adulteration of cooked beef with meat from other species. *Aust. vet. J.* *62*, 272-276.
- Careri, M., Mangia, A., Barbierie, G., Bolzoni, L., Virgili, R., Parolari, G. (1993). Sensory property relationships to chemical data of Italian-type dry-cured ham. *J. Food. Sci.*, *58*, 986-972.
- Carrapiso, A.I., Ventanas, J., García C. (2002). Characterization of the most odor-active compounds of Iberian ham headspace. *J. Agric. Food Chem.*, *50*, 1996-2000.
- Castellan G.W. (1987). Fisicoquímica. Cap.10, pp 216-234. Addison-Wesley Iberoamericana. Wilmington, Delaware. USA.

- Chan, K.M., Decker, E.A. (1994). Endogenous skeletal muscle antioxidants. *CRC. Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 34, 403-426.
- Chang, S.S., Petersen, R.J. (1977). Recent developments in the flavour meat. *J. Food. Sci.*, 42, 298-305.
- Chin, H.W., Bernhard, R.A., Rosenberg, M. (1996). Solid phase microextraction for cheese volatile compound analysis. *J. Food Sci.*, 61 1118-1128.
- Chung, S., Villota, R. (1989). Binding of alcohols by soy protein in aqueous solutions. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 1604-1606.
- Clark, T.J., Bunch. (1997). Qualitative and quantitative analysis of flavor additives on tobacco products using SPME-GC-mass spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 844-849.
- Costa Freitas, A.M., Parreira, C., Vilas-Boas, L. (2001). Comparison of two SPME fibers for differentiation of coffee by analysis of volatile compounds. *Chromatographia*, 54, 647-652
- Damodaran, S., Kinsella, J. (1980). Flavor protein interactions. Binding of carbonyls to bovine serum albumin: Thermodynamic and conformational effects. *J. Agric. Food Chem.*, 28, 567-571.
- Damodaran, S., Kinsella, J. (1981a). Interaction of carbonyls with soy protein: Thermodynamic effect. *J. Agric. Food Chem.*, 29, 1249-1253.
- Damodaran, S., Kinsella, J. (1981b). Interaction of carbonyls with soy protein: Conformational effects. *J. Agric. Food Chem.*, 29, 1253- 1257.
- Damodaran, S., Kinsella, J. (1983). Interaction of carbonyls to fish actomyosin. *J. Agric. Food Chem.*, 31, 856-859.
- De Ancos, B., Ibañez, E., Reglero, G., Cano, M.P. (2000). Frozen storage effects on anthocyanins and volatile compounds of raspberry fruit. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 873-879.
- Decker, E.A., Crum, A.D. (1991). Inhibition of oxidative rancidity in salted ground pork by carnosine. *J. Food Sci.*, 56, 1179-1181.

- Decker, E.A., Crum, A.D., Calvert, J.T. (1992). Difference in the antioxidant mechanism of carnosine in the presence of copper and iron. *J. Agric. Food Chem.*, *40*, 765-759.
- Decker, E.A., Chan, W.K.M., Livisay, S A., Butterfield, D.A. Fuastman, C.H.A. (1995). Interactions between carnosine and the different redox states of myoglobin. *J. Food Sci.*, *60*, 1201-1204.
- Dirinck, P., Van Opstaele, F., Vandendriessche, F.(1997). Flavour differences between northern and southern European cured hams. *Food Chem.*, *59*, 511-521.
- Druaux, C., Lubbers, S., Charpentier, C., Voilley, A. (1995). Effects of physico- chemical parameters of a model wine on the binding of  $\gamma$ -decalactone on bovine serum albumin. *Food Chem.*, *53*, 203-207.
- Drumm, T.D., Spanier, A.M. (1991). Changes in the content of lipid autoxidation and sulphur-containing compounds in cooked beef storage. *J Agric. Food Chem.*, *39*, 336-343.
- Dufour, E., Haertlé, T. (1990). Binding affinities of  $\beta$ -Ionone and related flavor compounds to  $\beta$ -Lactoglobulin: Effects of chemical modifications. *J. Agric. Food Chem.*, *38*, 1691-1695.
- Dufour, J.P., Delbecq, P., Perez Albela, L. (2001). Solid-phase microextraction combined with gas chromatography-olfatometry for analysis of cheese aroma. En *Gas chromatography-olfatometry. The state of the art*. J.V. Leland, P. Shieberle, A. Buettner, T.E. Acree, Eds., ACS Symposium Series 782, pp 123-137. American Chemical Society. Washington DC.
- Elmore, J.S., Erbahadir, M.A., Mottram, D.S. (1997). Comparison of dynamic headspace concentration on Tenax with solid phase microextraction for the analysis of aroma volatiles. *J. Agric. Food Chem.*, *45*, 2638-2641.
- Elmore, J.S., Mottram, D.S., Hierro, E. (2000). Two-fibre solid-phase microextraction combined with gas chromatography- mass spectrometry for the analysis of volatile aroma compounds in cooked pork. *J. Chromatogr. A*, *905*, 233-240.

- Estévez, M., Morcuende, D., Ventanas, S., Cava, R. (2003). Analysis of volatiles in meat from Iberian pigs and lean pigs after refrigeration and cooking by using SPME-GC-MS. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 3429-3435.
- 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. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 1497-1501.
- Fennema, O. (2000). Introducción a la Química de los Alimentos. 2<sup>o</sup>ed., pp 384-511; 775-782; 1046-1071 Acribia. Zaragoza. España.
- Fischer, N., Widder, S. (1997). How proteins influence food flavor. *Food Technol.*, 51, 68-70.
- Flores, M., Grimm, C.C., Toldrá, F., Spanier, A.M. (1997a). Correlations of sensory and volatile compounds of spanish "Serrano" dry-cured ham as a function of two processing times. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2178-2186.
- Flores, M., Ingram, D.A., Bett, K.L., Toldrá, F., Spanier, A.M. (1997b). Sensory characteristics of spanish "Serrano" dry-cured ham . *J. Sens. Stud.*, 12, 169-179.
- Flores, M., Spanier, A.M., Toldrá, F. (1998). Flavour analysis of dry cured ham. *En flavor of meat, meat products and seafoods*. Ed.; Shahidi, F., pp 321-341, Blackie Academic and Professional, Londres.
- Forss, D.A. (1972). Odor and flavor compounds from lipids. *Prog. Chem. Fats other lipids*, 13, 181-258.
- Frankel, E.N. (1991). Review. Recent advances in lipid oxidation. *J. Sci. Food Agric.*, 54, 495-511.
- Franzen, K., Kinsella, J.E. (1974). Parameters affecting the binding of volatile flavor compounds in model food systems. I. Proteins. *J. Agric. Food Chem.*, 22, 675-678.
- Gandemer, G. (1999). Lipids and meat quality: Lipolysis, oxidation, Maillard reaction and flavour. *Sci. Aliments*, 19, 439-458.

- Gandini, N., Riguzzi, R. (1997). Headspace solid-phase microextraction analysis of methyl isothiocyanate in wine. *J. Agric. Food Chem.*, *45*, 3092-3094.
- García, C., Berdagué, J.L., Antequera, T., López-Bote, C., Córdoba, J.J., Ventanas, J. (1991). Volatile components of dry cured Iberian ham. *Food Chem.*, *41*, 23-32.
- Girard, B. (1996). Retention index calculation using Kováts constant model for linear temperature- programmed gas chromatography. *J. Chromatogr. A* *721*, 279-288.
- Goodridge, C.F., Beaudry, R.M., Pestka, J.J., Smith, D.M. (2003). Solid phase microextraction-gas chromatography for quantifying headspace hexanal above freeze-dried chicken myofibrils. *J. Agric. Food Chem.*, *51*, 4185-4190.
- Górecki, T., Martos, P., Pawliszyn, J. (1998). Strategies for the analysis of polar solvents in liquid matrixes. *Anal. Chem.*, *70*, 19-27.
- Górecki, T., Yu, X., Pawliszyn, J. (1999). Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME fibres. *Analyst.*, *124*, 643-649.
- Guichard, E., Langourieux, S. (2000). Interactions between  $\beta$ -lactoglobulin and flavour compounds. *Food Chem.*, *71*, 301-308.
- Hawthorne, S.B., Miller, D.J., Pawliszyn, J., Arthur, C.L. (1992). Solventless determination of caffeine in beverages using solid-phase microextraction with fused- silica fibers. *J. Chromatogr.* *603*, 185-191.
- Hayasaka, Y., Bortowsky, E.J. (1999). Analysis of diacetyl in wine using solid-phase microextraction combined with gas chromatography- mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, *47*, 612-617.
- Hill, A.V. (1910). Combination of the hemoglobin with O and CO. *J.Physiol.*, *40*, 190-192.
- Hinrichsen, L.L., Pedersen, S.B. (1995). Relationship among flavor, volatile compounds, chemical changes, and microflora in Italian- type dry cured ham during processing. *J. Agric. Food Chem.*, *43*, 2932-2940.

- Jelen, H.H., Wlazly, K., Wasowicz, E., Kaminski, E. (1998). Solid-phase microextraction for the analysis of some alcohols and esters in beer comparison with static headspace method. *J. Agric. Food Chem.*, *46*, 1469-1473.
- Jelen, H.H., Obuchowska, M., Zawirska-Wojtasiak, R., Wasowicz, E. (2000). Headspace solid-phase microextraction use for the characterization of volatile compounds in vegetable oils of different sensory quality. *J. Agric. Food Chem.*, *48*, 2360-2367.
- Jia, M., Zhang, H. Min, D.B. (1998). Optimization of solid-phase microextraction analysis for headspace flavor compounds of orange juice. *J. Agric. Food Chem.*, *46*, 2744-2747.
- Jouenne, E., Crouzet, J. (2000). Effect of pH on retention of aroma compounds by  $\beta$ -Lactoglobulin. *J. Agric. Food Chem.*, *48*, 1273-1277.
- Jung, D., Ebeler, S.E. (2003). Headspace solid-phase microextraction method for the study of the volatility of selected flavor compounds. *J. Agric. Food Chem.*, *51*, 200-205.
- Kinsella, J.E. (1978). Texturized proteins: Fabrications, flavoring, and nutrition *CRC. Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, *10*, 147-207.
- Kinsella, J.E. (1990). Flavor perception and binding. *Inform*, *1*, 215-226
- Klotz, I. M. (1982). Numbers of receptor sites from Scatchard Graphs: facts and fantasies. *Science*, *217*, 1247-1249.
- Kovats, E.Sz. (1965). Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. *En Advances in chromatography*; J.C. Gidding, R.A. Keller, Eds., *Vol 1*, pp 229-247, Marcel Dekker, Inc., New York.
- Krzywicki, K. (1982). The determination of heam pigments in meat. *Meat Sci.*, *7*, 29-36
- Landy, P., Druaux, C., Voilley, A. (1995). Retention of aroma compounds by proteins in aqueous solution. *J. Agric. Food Chem.*, *54*, 387-392.
- Le Thanh, M., Thibeau, M., Thibaut, A., Voilley, A. (1992). Interactions between volatile and non-volatile compounds in the presence of water. *Food Chem.*, *43*, 129-135.

- Leland, J. (1997) Flavor interactions: The greater whole. *Food Technol*, 51, 75-80.
- López, M.O., de la Hoz, L., Cambero, M.I., Gallardo, E., Reglero, G., Ordóñez, J.A. (1992). Volatile compounds of dry hams from Iberian pigs. *Meat Sci.*, 31, 267-277.
- Louch, D., Motlagh, S., Pawliszyn, J. (1992). Dynamic of organic compounds extraction from water using liquid-coated fused silica fibers. *J. Agric. Food Chem.*, 64, 1187-1199.
- Love, J. (1996). Contribution of lipids to desirable and undesirable flavors in foods. En *Food lipids and health.(itf basic symposium series)* R.E.McDonald, D.B.Min, Ed., pp 287-314. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Lubbers, S., Landy, P., Voilley, A. (1998). Retention and release of aroma compounds in food containing proteins. *Food Technol*, 52, 68-74, 210-214.
- MacGillivray, B., Pawliszyn, J., Fowlie, P., Sagara, C. (1994). Headspace solid-phase microextraction versus purge and trap for the determination of substituted benzene compounds in water. *J. Chromatogr. Sci.*, 32, 317-322.
- MacLeod, G., Seyyedain-Ardebili, M. (1981). Natural and simulated meat flavors. *CRC. Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 14, 309.
- Merkle, J.A., Larick, D.K. (1994). Conditions for extraction and concentration of beef fat volatiles with supercritical carbon dioxide *J. Food Sci.*, 59, 478-483.
- Motilva, M-J., Toldrá, F., Nieto, P., Flores, J. (1993). Muscle lipolysis phenomena in the processing of dry-cured ham. *Food Chem.*, 48, 121-125
- Morrissey, P., Sheehy, P., Galvin, K., Kerry, J., Buckley, D. (1998). Lipid stability in meat and meat products. *Meat Sci.*, 49, S73-S83.
- Mottram, D.S., Edwards, R.A. (1983). The role of triglycerides and phospholipids in the aroma of cooked beef. *J. Food Sci. Agric.*, 34, 517-382.

- Mottram, D.S. (1985). The effect of cooking conditions on the formation of volatile heterocyclic compounds in pork, *J. Sci. Food Agric.*, 34, 517-522.
- Mottram, D.S. (1998). Flavour formation in meat and meat products: A review. *Food Chem.*, 62, 415-424.
- Ng, P.K.W., Hoehn, E., Bushuk, W. (1989). Binding of vanillin by fababean proteins. *J. Food Chem.*, 54, 105-107.
- Nielsen, J.H., Sorensen, B., Skibsted, L.H., and Bertelsen, G. (1997). Oxidation of precooked minced pork as influenced by chill storage of raw muscle. *Meat Sci.*, 46, 191-197
- Nowar, W.W. (1971). Some variables: Affecting composition of headspace aroma. *J. Agric. Food Chem.*, 19, 1057-1059.
- Ockerman, H.W., Blumer, T.N., Craig, H.B. (1964). Volatile chemical compounds in dry-cured hams. *J. Food Sci.*, 29, 123-129.
- O'Keefe, S., Wilson, L.A., Resurreccion, A., Murphy, P.A. (1991a). Temperature effect on binding of volatiles flavor compounds to soy protein in aqueous model systems. *J. Food Sci.*, 56, 802-806.
- O'Keefe, S., Wilson, L.A., Resurreccion, A., Murphy, P.A. (1991b). Determination of the binding of the hexanal to soy glycinin and  $\beta$ -conglycinin in an aqueous model system using a headspace technique. *J. Agric. Food Chem.*, 39, 1022-1028.
- O'Niel, T., Kinsella, J. (1987). Binding of alkanone flavors to  $\beta$ -Lactoglobulin: Effects of conformational and chemical modification. *J. Agric. Food Chem.*, 35, 770-774.
- O'Niel, T., Kinsella, J. (1988). Effect of heat treatment and modification on conformation and flavor binding by a to  $\beta$ -Lactoglobulin. *J. Food Sci.*, 53, 906-909.
- Pearson, A.M., Young, R.B. (1989). Muscle and meat biochemistry. pp 1-33; 296-337. Academic Press, Inc., San Diego, California.

- Pelletier, E., Sostmann, K., Guichard, E. (1998). Measurement of interactions between  $\beta$ -lactoglobulin and flavor compounds (esters, acids and pyrazines) by affinity and exclusion size chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 1506-1509.
- Pereira-Lima, C.I., Ordoñez, J.A., Garcia de Fernando, G.D., Cambero, M.I. (2000). Influence of meat treatment on carnosine, anserine and free amino acid composition of beef broth and its role in flavour development. *Eur. Food. Res. Technol.*, 210, 165-172.
- Plowman, J.E., Close, E.A. (1988). An evaluation of a method to differentiate the species of origin of meats on the basic contents of anserine, balenine and carnosine in skeletal muscle. *J. Sci. Food Agric.* 45, 69-78.
- Plug, H., Haring, P. (1993). The role of ingredient-flavour interactions in the development of fat-free foods. *Trends Food Sci. Technol.*, 4, 150-152.
- Plug, H., Haring, P. (1994). The influence of flavour-ingredient interactions on flavour perception. *Food Quality Pref.*, 5, 95-102.
- Pillonel, L., Bosset, J.O., Tabacchi, R. (2002). Rapid Preconcentration and enrichment techniques for the analysis of food volatile. A Review. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 35, 1-14.
- Rico, E., Toldrá, F., Flores, J. (1991). Effect of dry-curing process parameters on pork muscle cathepsins B, H, and L activity. *Z Lebensm. Unters. Forsch.*, 193, 541-544.
- Roberts, D.D., Pollien, P., Milo, C. (2000). Solid-phase microextraction method development for headspace analysis of volatile flavor compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2430-2437.
- Ruiz, J., Cava, R., Ventanas, J., Jensen, M.T. (1998). Headspace solid phase microextraction for the analysis of volatiles in a meat product: Dry-cured Iberian ham. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4688-4694.
- Ruiz, J., Ventanas, J.P., Cava, R., Andrés, A.I., García, C. (1999). Volatile compound of dry-cured Iberian ham as affected by the length of the curing process. *Meat Sci.* 52, 19-27.

- Ruiz, J., Ventanas, J., Cava, R. (2001). New device for direct extraction of volatiles in solid samples using SPME. *J. Agric. Food Chem.*, *49*, 5115-5121.
- Ruiz, J., Muriel, E., Ventanas, J. (2002). The flavour of Iberian ham. En *Research advances in the quality of meat and meat products*. F. Toldrá, Ed., Research Signpost, Trivandrum, India.
- Sabio, E., Vidal-Aragón, M.C., Bernalte, M.J., Gata, J.L. (1998). Volatile compounds present in six types of dry-cured ham south European countries. *Food Chem.*, *61*, 493-503.
- Scarlata, C., Ebeler, S.E. (1999). Headspace solid-phase microextraction for the analysis of dimethyl sulfide in beer. *J. Agric. Food Chem.*, *47*, 2505-2508.
- Scatchard, G. (1949). The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, *51*, 660-672.
- Servili, M., Selvaggini, R., Taticchi, A., Bergliomini, L.A., Montedoro, G.F. (2000). Relationships between the volatile compounds evaluated by solid phase microextraction and the thermal treatment of tomato juice: Optimization of the blanching parameters. *Food Chem.*, *71*, 407-415.
- Seuvre, A.M., Espinoza Diaz, M.A., Voilley, A. (2001). Retention of aroma compounds by  $\beta$ -lactoglobulin in different conditions. *Food Chem.*, *77*, 421-429.
- Shahidi, F., Rubin, L.J., D'Suozza L.A. (1986). Meat flavor volatiles: a review of the composition techniques of analysis, and sensory evaluation. *CRC. Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, *24*, 141-243.
- Shirey, R.E. (2000). Optimization of extraction conditions for low-molecular-weight analytes using solid-phase microextraction. *J. Chromatogr. Sci.*, *38*, 109-116.
- Song, J., Gardner, B.D., Holland, J.F., Beaudry, R.M. (1997). Rapid analysis of volatile flavor compounds in apple fruit using SPME and GC/time-of-flight mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, *45*, 1801-1807.

- Song, J., Fan, L., Beaudry, R.M. (1998). Application of solid phase microextraction and gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry for rapid analysis of flavor volatiles in tomato and strawberry fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 3721-3726.
- Sostaric, T., Boyce, M.C., Spickett, E.E. (2000). Analysis of the volatile components in vanilla extracts and flavorings by solid-phase microextraction and gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 5802-5807.
- Steffen, A., Pawliszyn, J. (1996). Analysis of flavor volatiles using headspace solid-phase microextraction. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 2187-2193.
- Stevenson, D.F., Chen, X.D., Mills, O.E. (1996). Modern analyses and binding studies of flavour volatiles with particular reference to dairy protein products. *Food Res. Int.*, 29, 265-290.
- Taylor, A.J. (1996). Volatile flavor release from foods during eating *CRC. Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 38, 765-784.
- Taylor, A.J. (1998). Physical chemistry of flavor. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 33, 53-62.
- Timón, M.L., Ventanas, L., Martín, L., Tejada, J.F., García, C. (1998). Volatile compounds in supercritical carbon dioxide extracts of Iberian ham. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 5143-5150.
- Toldrá, F., Flores, M., Sanz, Y. (1997). Dry-cured ham flavour enzymatic generation and process influence. *Food Chem.*, 59, 523-530.
- Toldrá, F. (1998). Proteolysis and lipolysis in flavour development of dry-cured meat products. *Meat Sci.*, 49, S101-S110.
- Toldrá, F., Flores, M. (1998). The role of muscle proteases and lipases in flavor development during the processing of dry-cured ham. *CRC. Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 38, 331-352.
- Toldrá, F., Aristoy M.-C., Flores, M. (2000). Contribution of muscle aminopeptidases to flavor development in dry cured ham. *Food Res. Int.*, 33, 181-185.

- Toldrá, F. (2002). Dry-cured meat product, *pp* 113- 151, Food & Nutrition Press, Trumbull, CT.
- van Ruth, S.M., Villeneuve, E. (2002). Influence of  $\beta$ -lactoglobulin, pH and presence of other aroma compounds on the air/liquid partition coefficients of 20 aroma compounds varying in functional group and chain length. *Food Chem.*, 79, 157-164.
- Wampler, T.P. (1997) Analysis of food volatiles using headspace-gas chromatographic techniques. En *Techniques for analyzing food aroma*. R.Marsili, Ed., *pp* 27-58. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Wyllie, S.G., Fellman, J.K. (2000). Formation of volatile branched chain esters in Bananas (*Musa sapientum* L). *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3493-3496.
- Yang, X., Peppard, T. (1994). Solid-phase. microextraction for flavor analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1925-1930.
- Zhang, Z., Pawliszyn, J. (1993). Headspace solid-phase microextraction. *Anal. Chem.*, 65, 1843-1852.
- Zhang, Z., Yang, M., Pawliszyn, J. (1994). Solid-phase microextraction. *Anal. Chem.*, 66, 844A -853A.
- Zhou, S., Decker, E.A. (1999a). Ability of carnosine and other skeletal muscle components to quench unsaturated aldehydic lipid oxidation products. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 51-55.
- Zhou, S., Decker, E.A. (1999b). Ability of amino acids, dipeptides, polyamines, and sulfhydryls to quench hexanal, a saturated aldehydic lipid oxidation product. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1932-1936.

