



Instituto Politécnico Nacional

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA

UNIDAD QUERÉTARO

POSGRADO EN TECNOLOGÍA AVANZADA

Implementación de la metodología de cromatografía de líquidos con detección sensorial simultánea para la identificación de compuestos importantes de sabor en matrices alimenticias

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

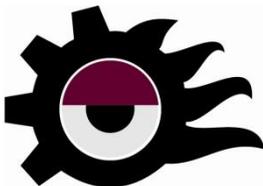
MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA AVANZADA

PRESENTA

Estefanía Abarca Ramírez

Director de Proyecto

Dr. Pedro Alberto Vázquez Landaverde



CICATA-IPN
QUERÉTARO

Querétaro, Qro. Diciembre del 2018.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTOR DE TESIS

México, D.F. a 28 de noviembre del 2018

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICATA-QRO en su sesión Ordinaria No. 161202 celebrada el día 2 del mes de diciembre conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

Abarca
Apellido paterno

Ramírez
Apellido materno

Estefanía
Nombre (s)

Con registro:

B	1	6	1	2	0	6
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de: Maestría en Tecnología Avanzada

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:

Implementación de la metodología de cromatografía de líquidos con detección sensorial simultánea para la identificación de compuestos de sabor importantes en matrices alimenticias

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

Implementar la metodología de cromatografía de líquidos con detección sensorial simultánea para la identificación de compuestos de sabor importantes en matrices alimenticias

2.- Se designa como Director de Tesis al Profesor:

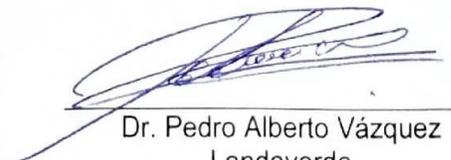
Dr. Pedro Alberto Vázquez Landaverde CICATA-IPN, Unidad Querétaro

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesina será elaborado por el alumno en: CICATA-IPN-QRO.

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Director de Tesis


Dr. Pedro Alberto Vázquez
Landaverde

Aspirante


Estefanía Abarca Ramírez

Presidente del Colegio


Dr. Alejandro Alfredo Lozano Guzmán
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
CIENCIA APLICADA
Y TECNOLOGÍA AVANZADA
UNIDAD QUERÉTARO
DIRECCIÓN



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Querétaro el día 28 del mes Noviembre del año 2018, el (la) que suscribe Estefanía Abarca Ramírez alumno (a) del Programa de Maestría en Tecnología Avanzada con número de registro B161206, adscrito al Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada - Unidad Querétaro, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Pedro Alberto Vázquez Landaverde y cede los derechos del trabajo intitulado **“Implementación de la metodología de cromatografía de líquidos con detección sensorial simultanea para la identificación de compuestos de sabor importantes en matrices alimenticias”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección de CICATA-Querétaro: Cerro Blanco No. 141, Col. Colinas del Cimatario. Santiago de Querétaro, Querétaro, México. C.P. 76090. Teléfonos 01 (442) 229 0804 o 01 (55) 5729 6000 Ext. 81002. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



Estefanía Abarca Ramírez

Agradecimientos

A Dios por la vida que me da y la oportunidad de seguir realizando mis propósitos y metas.

A CONACYT por el todo el apoyo brindado a lo largo de este posgrado, sin el cual no hubiese sido posible.

Al Centro de Investigación de Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada por la oportunidad de estudiar este posgrado dentro de sus instalaciones.

Al Dr. Pedro Alberto Vázquez Landaverde por la oportunidad de realizar este proyecto así como su asesoría a lo largo de este trayecto.

A los Dres. María Guadalupe Méndez Montealvo, Gonzalo Velázquez de la Cruz, Regina Hernández Gama y Norma Rojas Avelizapa por su guía y orientación en cada momento que lo requerí.

A mi familia que sin ellos mi persona, principios y formación no sería lo que es.



Índice

Contenido

Índice.....	6
Resumen.....	10
Abstrac.....	11
CAPÍTULO 1.....	12
Introducción	12
CAPÍTULO 2.....	14
Marco Teórico	14
2.1 Percepción del sabor.....	14
2.2 Influencia del olfato en la percepción del sabor.....	14
2.3 El sabor lingual.....	17
2.4 Morfología de la lengua.....	17
2.5 Percepción del sabor lingual.....	24
2.6 Mecanismos receptores.....	26
2.7 Mecanismos de transducción mediados por canales iónicos.....	28
2.8 Análisis de compuestos de sabor.....	33
CAPÍTULO 3.....	35
Antecedentes	35
3.1 Cromatografía de gases/olfactometría (GC/O por sus siglas en inglés) o Cromatografía de gases con detector de masas (CG-MS)/olfactometría (GC-MS/O).....	35
3.2 La “clave del sabor” en los alimentos.....	37
3.3 Cromatografía de líquidos con detección sensorial simultánea.....	41
CAPÍTULO 3.....	42
Justificación	42
CAPÍTULO 4.....	43
Objetivos	43

4.1	General.....	43
4.2	Específicos	43
	CAPÍTULO 5	44
	Materiales y Métodos	44
5.1	Entrenamiento a panelistas sensoriales para la identificación de compuestos hidrosolubles.....	44
	Determinación de las mejores condiciones cromatográficas utilizando sistemas modelo de compuestos de sabor.....	46
5.2	Aplicar la metodología de HPLC DSS y de panelistas entrenados para el análisis de 1 matriz alimenticia simple	47
5.3	Análisis cromatográfico	50
	CAPÍTULO 6	51
	Resultados y discusión	51
6.1	Entrenamiento sensorial de los 5 sabores básicos	51
6.2	Condiciones cromatográficas para muestras modelo.	56
6.3	Aplicación de la metodología de HPLC DSS utilizando panelistas entrenados para el análisis de 1 matriz alimenticia simple.....	63
	CAPÍTULO 7	84
	Conclusiones	84
	CAPÍTULO 8	85
	Referencias Bibliográficas	85

Figura 1. Anatomía del sistema olfatorio del ser humano. (Reineccius, 2005) 16

Figura 2. Morfología de la lengua (David V. Smith et. al. 2005) 19

Figura 3. Morfología del botón gustativo (David V. Smith et. al. 2005)	22
Figura 4. Inervación de papilas fungiformes. En A, múltiple inervación de una papila fungiforme en el centro de la papila. B, distribución de tres axones aferentes gustativos en las papilas sobrelapamiento de campos receptivos. (Modificado Bradley 1995; Hortencia y col., 2005)	23
Figura 5. Mapa lingual clásico, en donde se muestra las zonas con supuesta mayor sensibilidad de los sabores básicos sobre la superficie lingual humana. (David V. Smith y col.)	25
Figura 6. Mecanismo general de la transducción del sabor. (Hortencia y col., 2005).....	27
Figura 7. Célula gustativa específica para el sabor salado, donde ocurre una despolarización por iones Ca ⁺ . (Ira Fox, Stuart 2014).....	28
Figura 8. Célula gustativa específica para el sabor salado, donde ocurre una despolarización por iones Ca ⁺ . (Ira Fox, Stuart 2014).....	29
Figura 9. Célula gustativa específica para el sabor dulce y umami, donde ocurre una despolarización por azúcares, aminoácidos, glutamato y aspartato (que no se muestran por medio de receptores acoplado a proteína G. (Ira Fox, Stuart 2014).	30
Figura 10. Célula gustativa específica para el sabor amargo, donde ocurre una despolarización por quinina (que no se muestran por medio de receptores acoplados a proteína G y segundos mensajeros. (Ira Fox, Stuart 2014)	32
Figura 11. Célula gustativa específica para el sabor dulce y umami, donde ocurre una despolarización por quinina (que no se muestran por medio de receptores acoplados a proteína G y segundos mensajeros. (Ira Fox, Stuart 2014).....	32
Figura 12. Esquema de funcionamiento de un cromatógrafo de líquidos.	34
Figura 13. Esquema del sistema GC/O usado en obtención por CHARM (Gary Reineccius, 2005).	39
Figura 14. Diagrama de la implementación de DSS en Cromatografía de Líquidos.	49
Figura 17. Cromatograma de una solución de acesulfame K a una concentración de 0.7% en fase móvil constada de agua únicamente.	57
Figura 18. Pico correspondiente a una solución de 0.8 ppm de acesulfame K en fase agua 75%/Estanol 25% a una velocidad de flujo de 3 mL.	58
Figura 19. Pico correspondiente a ácido cítrico a una concentración de 1.83%	59
Figura 20. Pico correspondiente a Glutamato Monosódico a una concentración de 2.5% ...	60
Figura 21. Pico correspondiente a sacarosa a una concentración de 24%.....	61
Figura 22. Pico correspondiente a Cafeína a una concentración de 1.1%.....	62
Figura 21. Cromatograma perteneciente al ácido (Ácido cítrico).....	64
Figura 22. Cromatograma perteneciente al sabor dulce (Acesulfame K).	65
Figura 23. Cromatograma perteneciente al sabor amargo (Cafeína).	66
Figura 24. Cromatograma perteneciente al sabor Dulce (Sacarosa).	67
Figura 25. Cromatograma perteneciente al sabor ácido (Ácido cítrico).	68
Figura 26. Cromatograma perteneciente al sabor dulce (Acesulfame K).	69

Figura 27. Cromatograma perteneciente al sabor amargo (Cafeína).....	70
Figura 28. Cromatograma perteneciente al sabor Dulce (Sacarosa).....	71
Figura 29. Diferencia en la intensidad de percepción en cada sabor por los panelistas.....	72
Figura 30. Preferencia a nivel mundial entre las marcas Sprite y 7up. (CNNMoney (New York) Primera publicación 20, 2018).....	83



Resumen

El consumo de alimentos, sin duda, es una de las actividades más importantes en nuestro día a día. Una parte fundamental para su buena aceptación por parte del consumidor es su sabor, el cual está conformado por una diversa cantidad de compuestos químicos que son detectados a través del sentido del gusto y del olfato; estos sentidos, en conjunto, dan origen al “sabor”, por lo que es importante entonces identificar los compuestos de impacto en una matriz alimentaria. En el presente proyecto se llevó a cabo la implementación de la metodología de detección sensorial simultánea (DSS) acoplada a cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC); para ello se eligió 1 matriz alimentaria compuesta por una bebida carbonatada y una bebida homóloga para comparación de resultados. Después de pasar por el detector, el efluente fue llevado hacia un panelista para su evaluación de compuestos de sabor, obteniendo información valiosa respecto al perfil completo del sabor de un alimento.

Para el análisis sensorial realizado, se entrenó a panelistas para la identificación de compuestos de sabor hidrosolubles que puedan estar presentes en la matriz alimentaria seleccionada; dicho entrenamiento se llevó a cabo con 5 soluciones representativas de los 5 sabores linguales. De esta manera, al analizar las bebidas con DSS acoplada a HPLC se pudieron identificar los compuestos de sabor hidrosoluble en cada una de las bebidas, así como aquellos que tenían un mayor impacto en la percepción. En la bebida número 2, los sabores dulce, amargo y ácido fueron los más predominantes y se pudo concluir la sinergia de los compuestos de sabor lingual predominantes con los compuestos de aroma juegan un papel importante en la preferencia del consumidor.

Palabras clave: compuestos hidrosolubles, DSS (Detección Sensorial Simultanea), HPLC, sabor lingual, percepción.



Abstrac

Food consumption is, without any doubt, one of the most important activities in our daily routine. One of the main features for consumer acceptance of food is its good flavor, which is made up of a diverse amount of chemical compounds detected through the sense of taste and smell; these two senses together rise which is known as "flavor", that's why it is important to identify the impact compounds in a flavor matrix. In this project, the implementation of the simultaneous sensory detection (DSS) methodology coupled to high performance liquid chromatography (HPLC) was carried out; for this purpose, it was chosen one flavor matrix composed by a carbonated drink and a homologous drink to compare results. After passing through the detector, the effluent was taken to a panelist for their evaluation of flavor compounds, obtaining valuable information regarding the full profile of food taste.

For the performed sensory analysis, we trained panelists to identify water-soluble flavor compounds that may be present in the flavor matrix. This training was carried out with 5 solutions representing each of the 5 lingual flavors. This way, analyzing drinks with DSS coupled to HPLC made it possible to identify the water-soluble flavor compounds in each of the beverages, as well as those that had a greater impact on perception. On drink number 2, sweet, bitter and acid flavor the most predominant making it easier to conclude the synergy of the predominant lingual taste compounds with the aroma compounds play an important role in consumer preference.

Keywords: water soluble compounds, DSS (Simultaneous Sensory Detection), HPLC, lingual flavor, perception.

CAPÍTULO 1



Introducción

Los alimentos son indispensables en nuestra vida diaria y, sin duda, una parte esencial de los mismos es su sabor. El sabor es una sensación causada por los receptores de la boca y la nariz los cuales detectan los componentes químicos que conforman los alimentos, y que son liberados al momento de la masticación. Estos receptores responden produciendo señales que son interpretadas por el cerebro como sensación de gusto y aroma. Ciertas combinaciones de sabor y aroma son características particulares de alimentos (Department of Agriculture, 2013) . Al grupo de componentes que en conjunto conforman un sabor determinado se le conoce como “perfil de sabor” (Reineccius, 2005) . La identificación de este perfil químico permite a las grandes industrias alimenticias imitar sabores de origen natural, así como la creación de nuevos sabores.

El conocimiento de los componentes de sabor se ha vuelto más importante que nunca con la modernización de los sistemas alimentarios y la mayor dependencia de los alimentos procesados. (Department of Agriculture, 2013). Para el análisis de estos perfiles de sabor existen diversas técnicas analíticas, entre ellas la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En la cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que contiene una fase estacionaria. La separación cromatográfica en HPLC es el resultado de las interacciones específicas entre las moléculas de la muestra en ambas fases, móvil y estacionaria (Skoog, 2008) .

Una nueva metodología de cromatografía líquida de alta resolución es la detección sensorial simultánea la cual permite percibir de manera sensorial los compuestos químicos de sabor hidrosoluble, dicha percepción se lleva a cabo una vez que la muestra ha sido separada por la columna cromatográfica utilizando una mezcla no tóxica de disolventes. De esta manera las mediciones analíticas y pruebas de sabor se pueden llevar a cabo de forma simultánea en compuestos saborizantes y aroma. La ventaja clave de la detección sensorial simultánea sobre los métodos existentes es que permite que el panelista y el equipo analicen aromas y sabores al mismo tiempo (Reichelt et al., 2008).

El procedimiento de detección sensorial simultánea se basa en el principio de cromatografía líquida a alta eficacia con la diferencia de que en lugar de un solvente químico se utiliza agua como eluyente y fase móvil. La fase móvil utilizada no supone ningún riesgo para la salud y puede contener otros componentes del grupo de los alcoholes fisiológicamente tolerables, sales, ácidos, tampones, aceites o grasas. La evaluación sensorial de los componentes de sabor y aroma separados a través de cromatografía líquida se realiza en el eluato obtenido a la salida cromatográfica (Loescher, Morton, Razic, & Agatonovic-Kustrin, 2014).

En el presente proyecto se acopla el método de detección sensorial simultánea a HPLC para obtener el perfil de sabor de una matriz alimentaria y una matriz homóloga, así como la detección sensorial simultánea de los compuestos de impacto en el sabor.

La detección sensorial de los compuestos es importante ya que la evaluación de la misma se ocupa de la medición y cuantificación de las características del producto, que son percibidas por los sentidos humanos. Es una disciplina científica que permite evocar, medir, analizar e interpretar las características de un alimento percibidas por la vista, el olfato, el tacto, el gusto y el oído. Existen diferentes metodologías sensoriales tal como lo describe el Institute of Food Technologists, donde su elección depende del objetivo que se persiga. En el caso de este proyecto se utilizó un método analítico, cuyo objetivo consistió en medir si las muestras son diferentes y la magnitud de la diferencia, así como también describir los componentes de cada extracto que proporcione detección sensorial simultánea. Para ello fue necesario, entrenar a un grupo de panelistas para la identificación de compuestos hidrosolubles presentes en la muestra y así deducir los compuestos de impacto en cada matriz alimentaria (Pedrero & Pangborn, 1989) (Fermín et al. 2009).

CAPÍTULO 2



Marco Teórico

2.1 Percepción del sabor

Los humanos tenemos una gran sensibilidad para detectar una gran cantidad de olores y sabores. Continuamente estamos expuestos a moléculas que se liberan en el medio ambiente y a través de sentidos como el gusto y el olfato. Estas moléculas proveen de información importante para la disponibilidad de alimento, placer potencial o daño derivado de ellas (Chávez et al. 2010).

Es posible percibir el sabor gracias a dos sentidos de gran importancia, estos son el olfato (para compuestos volátiles de aroma) y el sentido del gusto lingual (para compuestos hidrosolubles de sabor lingual), el conocimiento de ambos se logra el redondeo del sabor.

2.2 Influencia del olfato en la percepción del sabor

La olfacción (la cual se lleva a cabo mediante el sentido del olfato) es el componente sensorial resultante de la interacción de los compuestos químicos volátiles de los alimentos, los cuales son detectados por los receptores ubicados en la cavidad nasal, y que son generalmente identificados como aroma u olor de un alimento. El estímulo para esta sensación puede ser oronasal, (estímulo de olor, el cual entra en la región olfativa directamente desde la nariz cuando olfatea un alimento), o retronasal el cual sucede cuando el estímulo de olor entra desde la cavidad oral al ingerir un alimento. El aroma es una sensación muy compleja, ya que, mientras que los estímulos disponibles para percibir el sabor lingual son limitadas, se han identificado más de 7,100 compuestos volátiles que pueden ser detectados olfativamente, los cuales contribuyen a la percepción del aroma. Dicha percepción dependerá de la concentración de los compuestos, así como de sus umbrales de detección. La capacidad de una persona para detectar olores es influenciada

también por otros factores tales como la variabilidad genética, la fatiga olfativa y los factores naturales e impredecibles tales como la temperatura y la humedad (Reineccius, 2005).

2.2.1 Anatomía del olfato

Es muy importante conocer como los compuestos “odorantes” llegan a las neuronas olfativas en los seres humanos, ya que gracias a este mecanismo pueden determinarse los aspectos de percepción del olor. Las neuronas olfativas forman un neuropitelio que recubre las protuberancias (cornetes) en las paredes laterales de la cavidad nasal. Los cornetes son una serie de pliegues hechos de extensiones laterales óseas. En los seres humanos, la mayor parte del epitelio olfativo se encuentra en la hendidura olfatoria que está directamente ligada al bulbo olfatorio en el cerebro por la placa cribiforme (Figura 1). Aproximadamente 6 millones de neuronas pasan a través del plato cribiforme a unos 8,000 glomérulos en cada bulbo olfatorio, lo cual constituye una conexión entre los receptores olfatorios y el cerebro. En el epitelio olfatorio, pequeños apéndices sobresalen hacia fuera del cuerpo. Al final de estos apéndices se localizan estructuras tipo bulbo que contienen de 20 a 30 cilios muy finos que contienen los receptores olfativos y el mecanismo de transducción sensorial. Estos cilios se encuentran en una capa de moco que cubre el tejido para protegerlo del secado y proporciona protección del cerebro contra el ataque microbiano a través de canales abiertos donde las señales olfativas pasan a los glomérulos. (Reineccius, 2005)

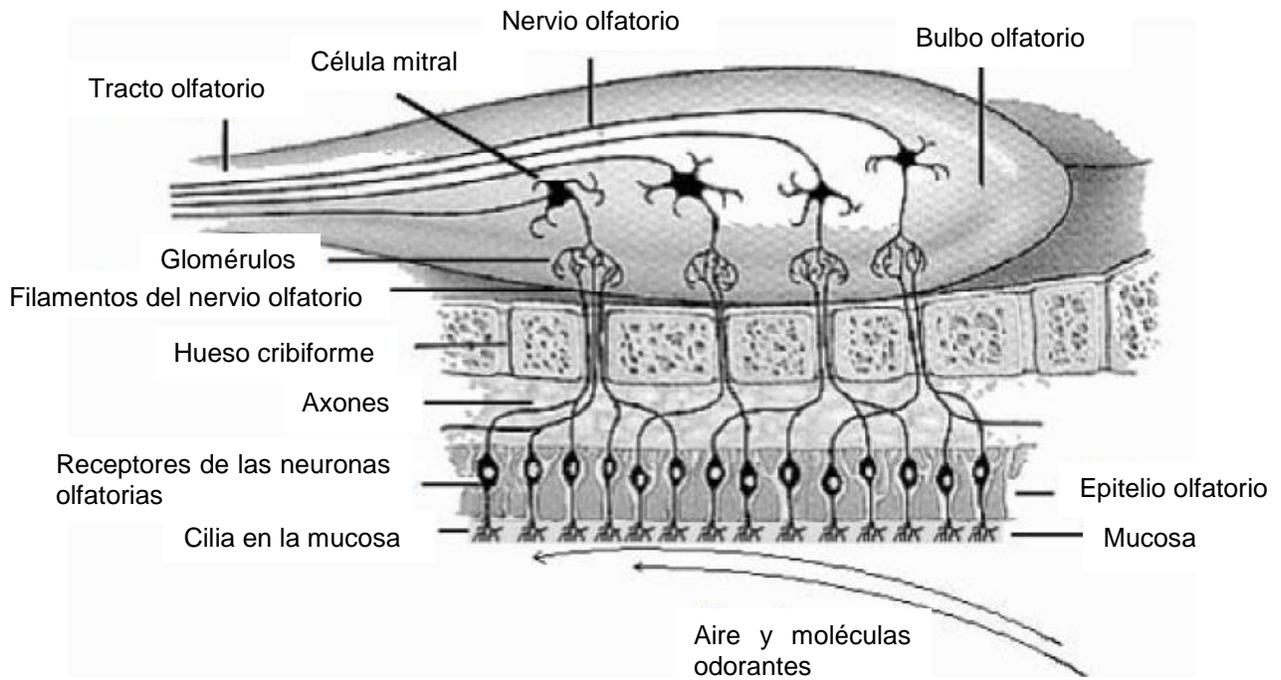


Figura 1. Anatomía del sistema olfatorio del ser humano. (Reineccius, 2005)

2.3 El sabor lingual

El sentido del gusto es un sentido muy primitivo, que capacita a los organismos superiores para detectar compuestos nutricionalmente importantes como azúcares, sales, aminoácidos, así como para evitar sustancias nocivas como ácidos, alcaloides y toxinas que normalmente presentan sabores muy amargos. Las células receptoras gustativas son células epiteliales modificadas, con forma de huso, agrupadas formando órganos sensoriales llamados botones gustativos. Estas células quimiorreceptoras monitorean el medio ambiente de la cavidad oral, convirtiendo sustancias químicas en patrones específicos de actividad neuronal (Chávez et al. 2010).

2.4 Morfología de la lengua

En el mundo de los mamíferos los botones gustativos están ampliamente distribuidos en la superficie dorsal y bordes laterales de la lengua, paladar blando y orofaringe. Los botones gustativos están asociados con estructuras especializadas llamadas papilas gustativas. Existen cuatro tipos principales de papilas linguales: filiformes, fungiformes, caliciformes y foliadas, véase Figura 2. Las más abundantes son las filiformes, localizadas en el dorso lingual en los tercios anterior y medio. Estas no poseen botones gustativos y por lo tanto no contribuyen a la función gustativa, más bien son encargadas del aspecto aterciopelado de la lengua y están involucradas en la sensación táctil. Las papilas fungiformes están localizadas en los dos tercios anteriores de la lengua, intercaladas entre las papilas filiformes. El ser humano tiene alrededor de 200 papilas filiformes, y entre 2 y 5 botones gustativos por la papila ubicados en la parte superior de estas papilas. Las papilas caliciformes se ubican en la unión entre la región oral y faríngea de la lengua, formando la V lingual, los botones gustativos se localizan dentro de las invaginaciones de la papila. En el humano existen entre 8 y 12 papilas con un promedio de 250 botones por papila y están inervadas por el nervio glossofaríngeo. (Chávez et. al 2010) Las papilas foliadas ubicadas en la parte posterior de la lengua sobre los bordes laterales, consisten en una serie de pliegues. En el humano existe una sola papila foliada con 6 o 7 invaginaciones sobre cada lado de la lengua y, los botones se encuentran en el epitelio de las invaginaciones, con un promedio de 1280 botones por papila (Bradley, 1995). Los botones gustativos extralinguales

se distribuyen a lo largo en el epitelio del paladar blando y la orofaringe, en el humano, su número es de 420 y 950 respectivamente (Chávez et. al 2010).

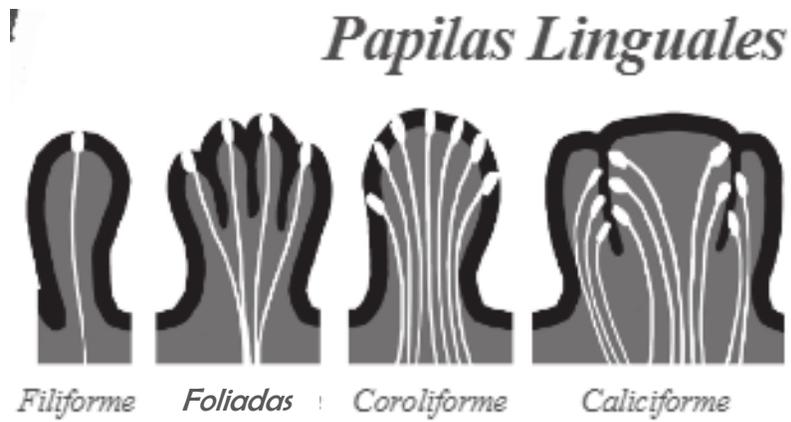
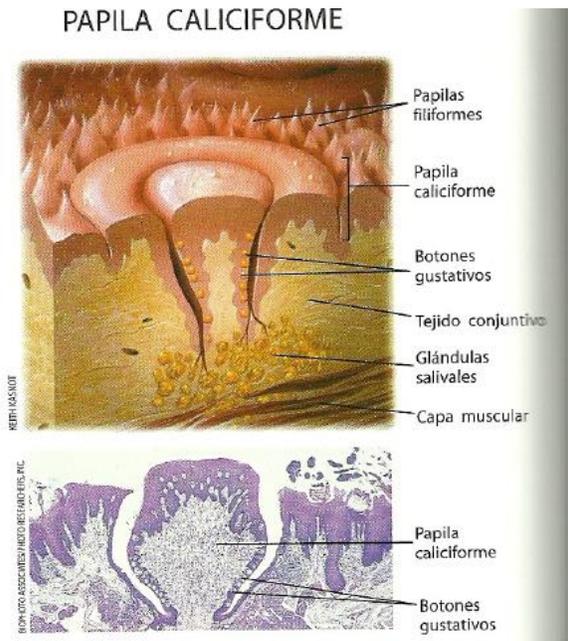
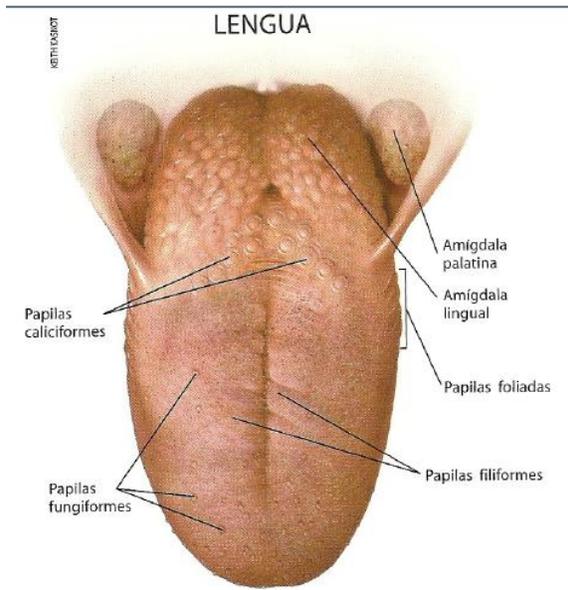


Figura 2. Morfología de la lengua (David V. Smith et. al. 2005)

Los botones gustativos tienen forma de globo ligeramente alargado, se hallan a su vez dentro de las papilas gustativas, están formados por células epiteliales modificadas que se extienden desde la membrana basal hasta la superficie externa del epitelio, presentan microvellosidades que protuyen a través de una pequeña apertura del poro gustativo, a la cavidad oral. Por debajo de estas microvellosidades, las células gustativas están unidas por complejos de unión estrecha, éstos separan la membrana apical de la basolateral. La ubicación de estas uniones estrechas, forman una barrera que separa el medio ambiente externo de la cavidad oral y el medio interno del botón (Chávez et al. 2010). Dichos botones gustativos son los que le confieren el aspecto aterciopelado a la lengua.

En los mamíferos el número de células que conforman un botón, oscila entre 50 a 100 células epiteliales y el tamaño de estos botones varía entre 50-60 micras de altura y de 30-70 micras de ancho (Figura 3). En cada botón gustativo existen cuatro tipos de células principales, Células tipo I: son células angostas y largas que se extienden desde la base del botón hasta el poro gustativo, estas células electrodensas se caracterizan por presentar grandes vesículas de centro denso en el citoplasma apical y núcleo alargado e indentado, constituyendo el 60% de la población celular total. Las células tipo II: se extienden por encima de la membrana basal y las microvellosidades apicales son más cortas que las del tipo I y no se extienden hasta el poro gustativo; su citoplasma es electrolúcido, se conocen también como células claras, su núcleo es redondo u oval, estas células corresponden al 30% de la población del botón gustativo. Las células del tipo III: morfológicamente son parecidas a las células del tipo II, pero presentan una sola prolongación citoplasmática, la cual se extiende hasta el poro gustativo, son las menos numerosas y se ubican en la región central del botón. Las células tipo IV: son células basales que están en contacto con la membrana basal, y que, a diferencia de las células anteriores están confinadas a la superficie basal y se conocen como células basales (Pumplin, 1997) (Yee, 2001) (Clapp, 2004)(Chávez et al. 2010).

La llegada de las señales al cerebro para la detección del sabor es posible gracias a que los axones de las neuronas aferentes gustativas penetran la membrana basal donde pierden su vaina de mielina y dentro del botón gustativo se ramifican extensamente, inervando a las células gustativas excepto las basales. Las fibras nerviosas contactan con las que se inervan en surcos profundos donde se asocian con gran número de vesículas sinápticas (Figura 4). La célula basal es una célula progenitora por lo que se piensa que no

está involucrada en la transducción del gusto, las células tipo III y tipo II se consideran células receptoras (Kinnamon, 1988) (Huang, 2008) (Chávez et al. 2010),

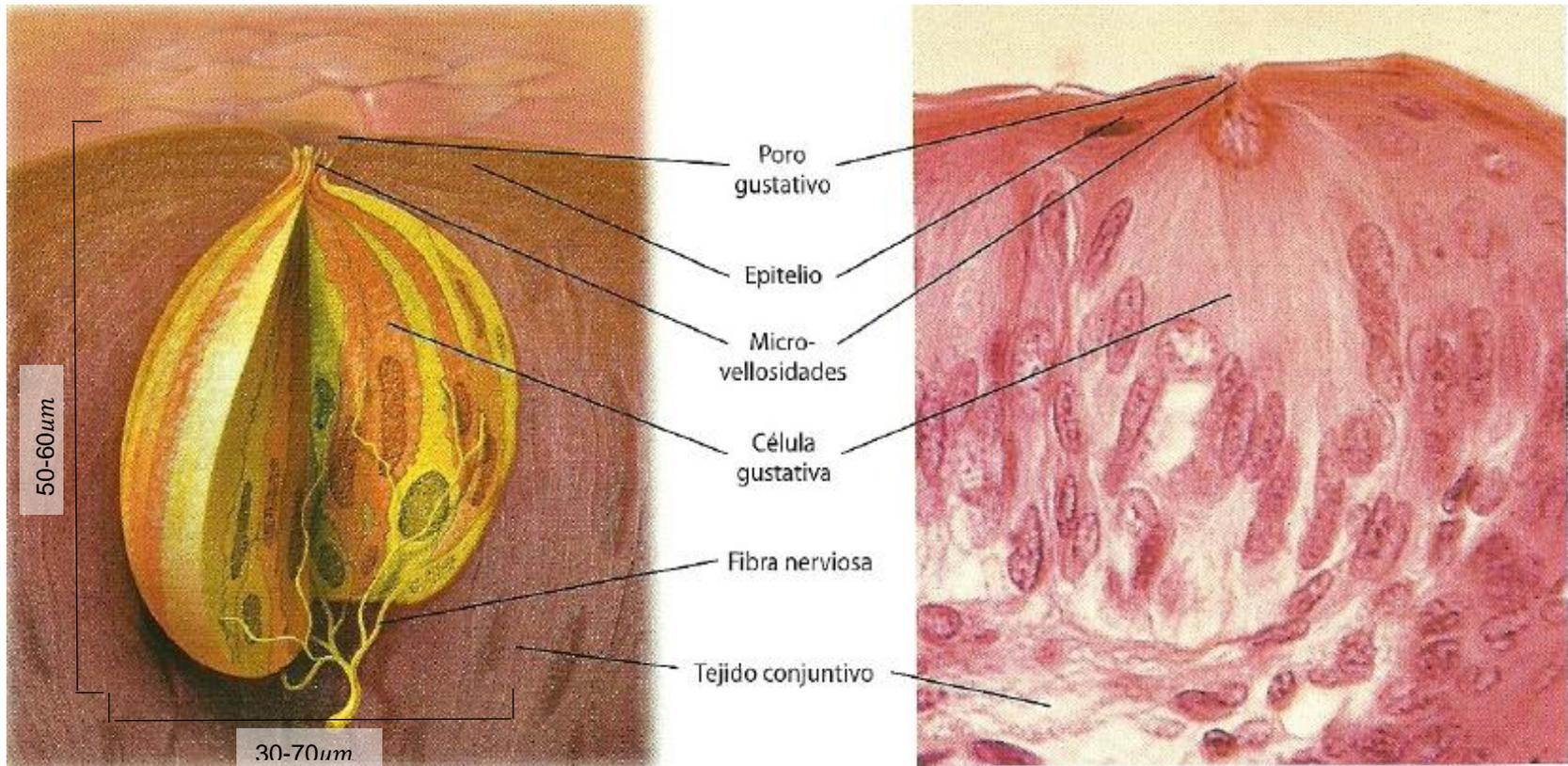


Figura 3. Morfología del botón gustativo (David V. Smith et. al. 2005)

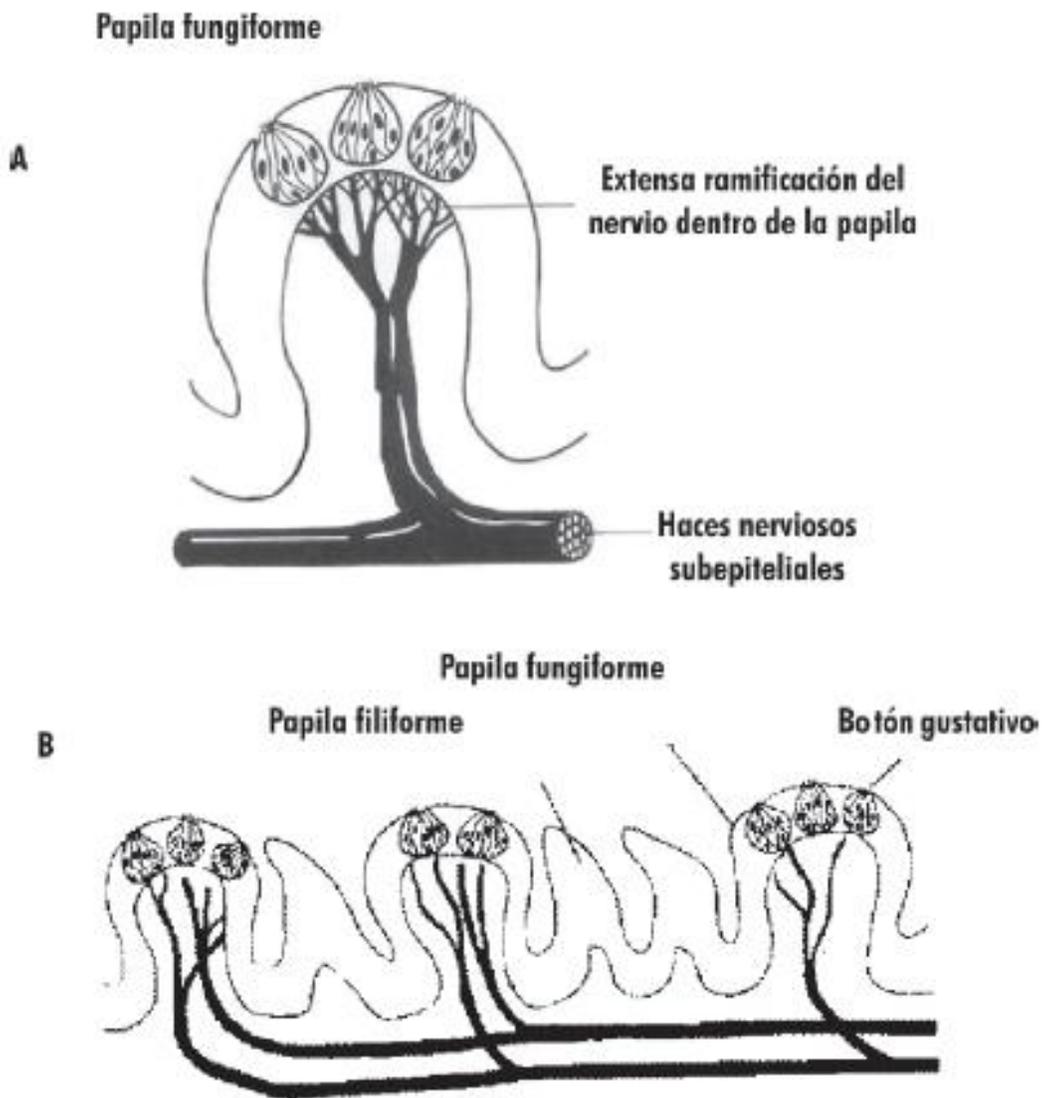


Figura 4. Inervación de papilas fungiformes. En A, múltiple inervación de una papila fungiforme en el centro de la papila. B, distribución de tres axones aferentes gustativos en las papilas sobrelapamiento de campos receptivos. (Modificado Bradley 1995; Hortencia y col., 2005)

El número total de fibras que penetran al botón gustativo supera al número de fibras que existen en los nervios del gusto, por lo tanto, existe una gran ramificación, se ha reportado que de 50 fibras que llegan al botón, incrementándose a más de 200 fibras dentro del mismo (Figura 4A). Además, una fibra nerviosa del gusto inerva a más de un botón gustativo, existiendo superposición entre los botones gustativos inervados por fibras gustativas diferentes (Mistretta, 1998) (Chávez et al. 2010) (Figura 4B).

2.5 Percepción del sabor lingual

Desde 1961, Kimura y Beidler demostraron que las células gustativas de los botones ubicados en las papilas fungiformes eran capaces de responder a los 4 sabores considerados en ese momento como básicos: salado, dulce, amargo y ácido. Por lo que todas las cualidades gustativas se detectan en todas las regiones de la lengua que contienen botones gustativos, con algunas ligeras diferencias en sensibilidad en unos lugares que en otros (Kinnamon, 2000) (Scott, 2004)

Uno de los hechos más inciertos acerca del gusto, es el mapa lingual en él que se muestran las grandes diferencias regionales de sensibilidad para detectar los sabores básicos sobre la superficie lingual humana. Este mapa indica que las sustancias dulces son detectadas en la punta de la lengua; las sustancias saladas en las porciones laterales del tercio anterior; las ácidas en los bordes laterales del tercio medio y posterior y las sustancias amargas se detectan básicamente en la parte posterior de la lengua (Margolskee, 2001). (Figura 5).

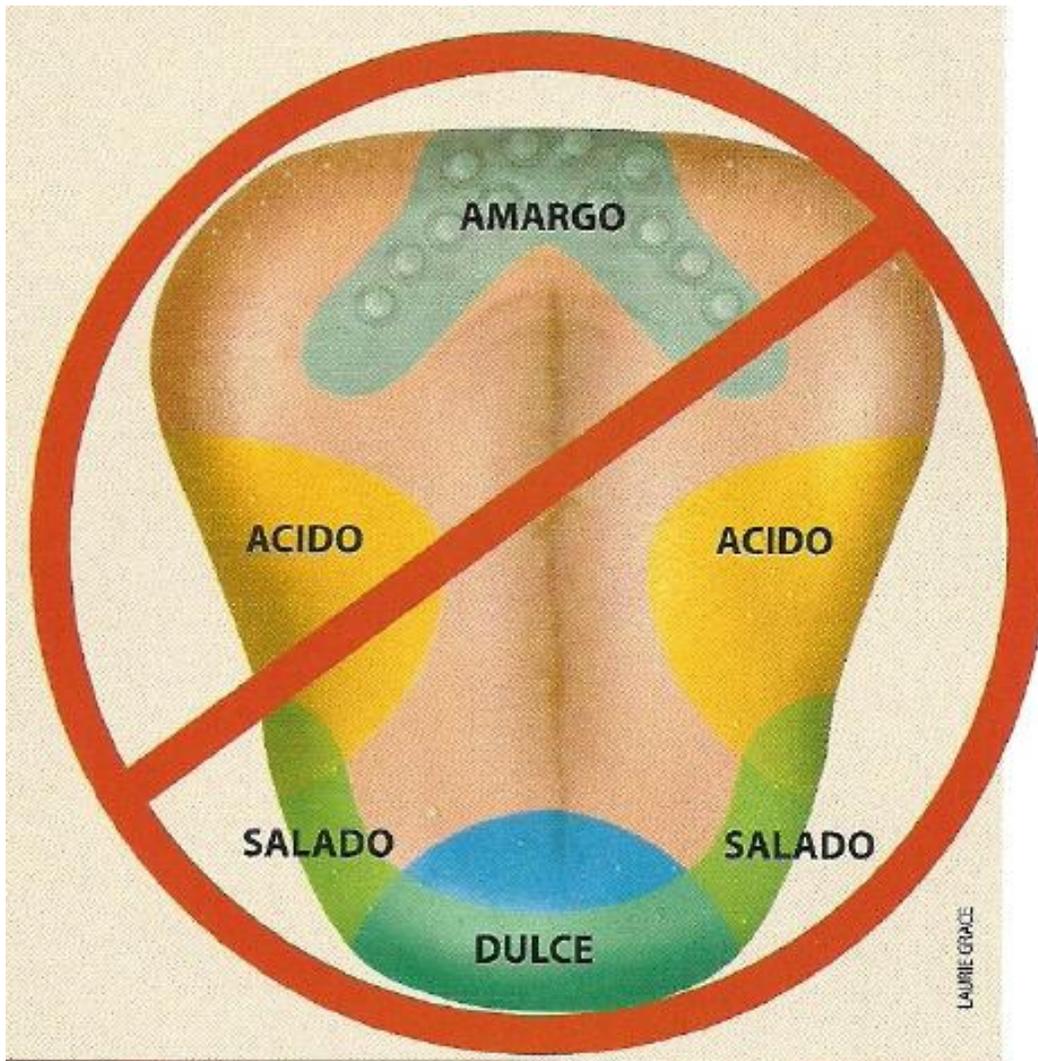


Figura 5. Mapa lingual clásico, en donde se muestra las zonas con supuesta mayor sensibilidad de los sabores básicos sobre la superficie lingual humana. (David V. Smith y col.)

2.6 Mecanismos receptores

En las microvellosidades de las células receptoras del gusto es donde se lleva a cabo el proceso de transducción sensorial (estímulo químico eléctrico). La función de los botones gustativos consiste en analizar los constituyentes químicos de los alimentos que, disueltos en la saliva, se ponen en contacto con las células receptoras durante la masticación. Tales sustancias producen cambios eléctricos en las células gustativas, que son transformados en potenciales de acción en las aferentes primarias del gusto que inervan a los botones gustativos, estos potenciales son conducidos a través de vías nerviosas hacia el cerebro, donde evocan la sensación que denominamos como gusto (Figura 6) (Chávez et al. 2010) (Smith, 2001).

Dentro de las cualidades gustativas básicas, se encuentran los sabores, salado, amargo, dulce, ácido y recientemente se ha descrito al umami como un quinto sabor, el cual se le atribuye a la sensación gustativa producida por aminoácidos como glutamato monosódico y L-arginina y ribonucleótidos (Chávez et al. 2010).

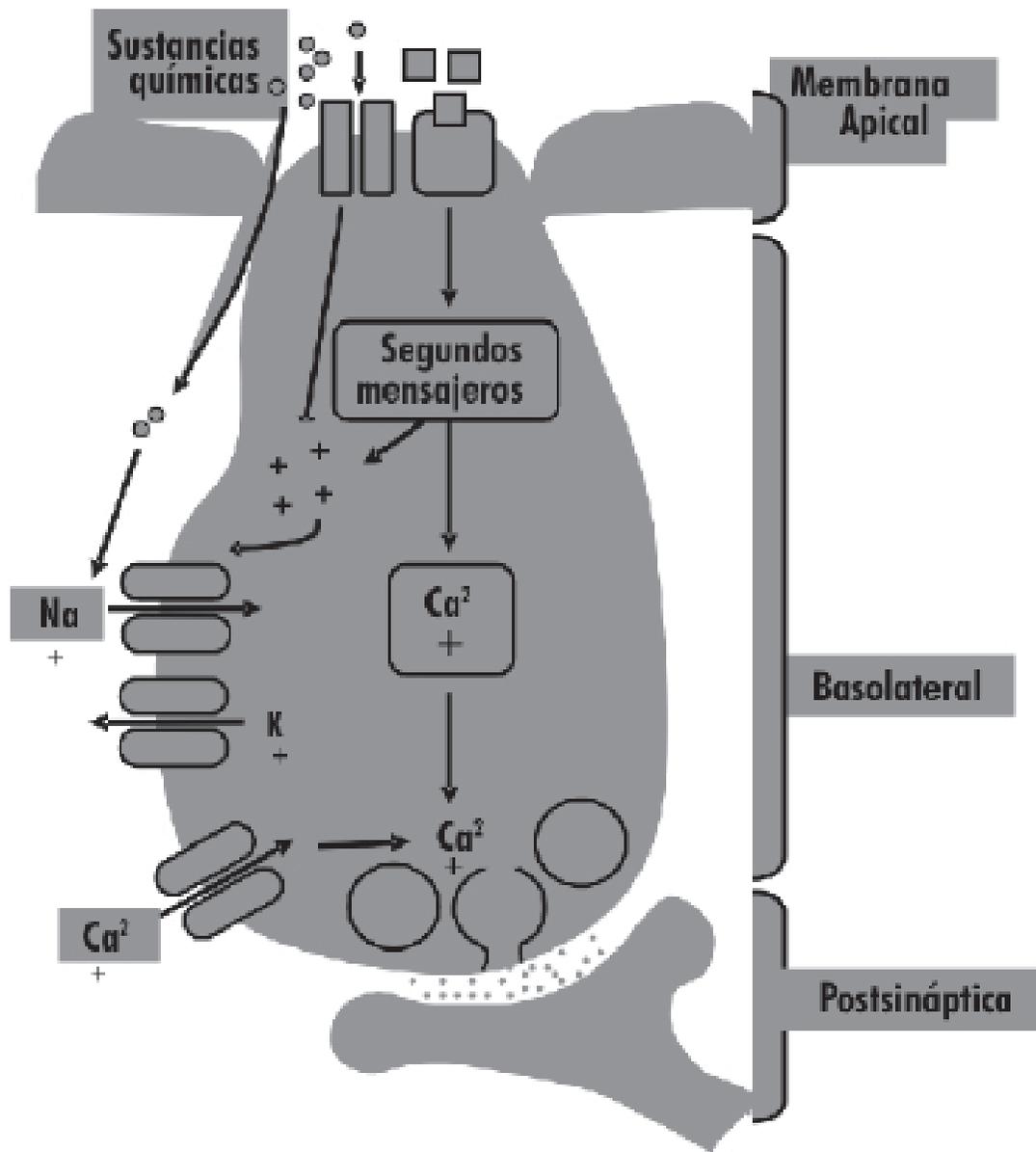


Figura 6. Mecanismo general de la transducción del sabor. (Hortencia y col., 2005).

2.7 Mecanismos de transducción mediados por canales iónicos.

Sabor salado.: Se produce por el cloruro de sodio (Na^+Cl^-). Los iones Na^+ entran a las células receptoras a través de canales de sodio sensible a amilorida, ubicado en la membrana apical en el poro gustativo. La entrada de Na^+ produce una despolarización de las células gustativas, esta despolarización abre canales dependientes de voltaje para sodio, lo que produce potenciales de acción en la célula gustativa, esta despolarización en la superficie basolateral abre canales de calcio dependientes de voltaje para calcio, situados en la cercanía de las vesículas sináptica. El aumento en el calcio intracelular, libera el neurotransmisor que se une a receptores ubicados en las neuronas aferentes gustativas (Figura 7) (Chávez et al. 2010) (Smith, 2001) (Fox, 2014).

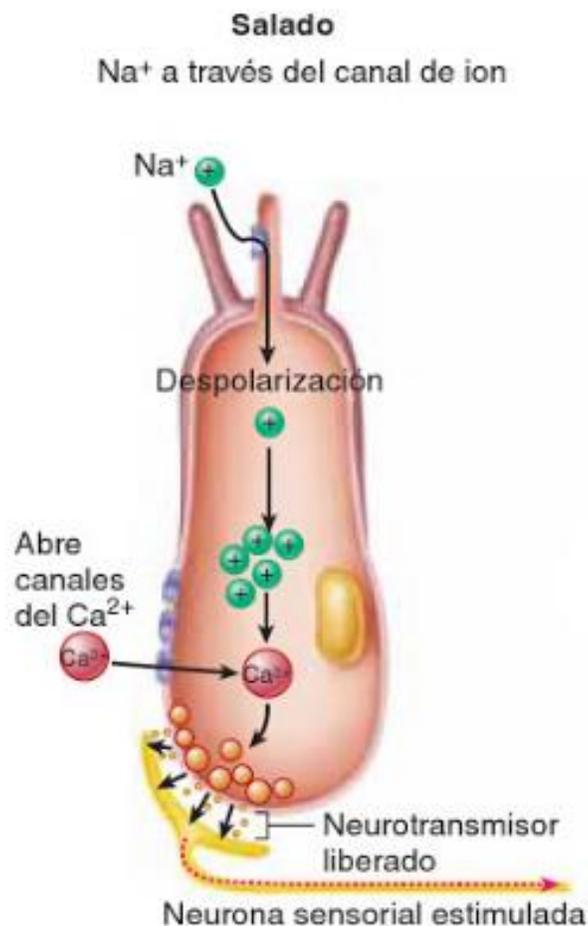


Figura 7. Célula gustativa específica para el sabor salado, donde ocurre una despolarización por iones Ca^+ . (Ira Fox, Stuart 2014)

Sabor Ácido. En el sabor ácido se conocen varios mecanismos. Los protones (H^+) de las sustancias ácidas, bloquean a los canales de potasio ubicados en la membrana apical de la célula receptora del gusto. El bloqueo de estos canales a través de los cuales pasan protones, uno de ellos se bloquea con amilorida y el otro no, la entrada de protones produce despolarización de la célula gustativa, esta despolarización abre canales de calcio dependientes de voltaje para sodio lo que produce potenciales de acción en la célula gustativa, esta despolarización en la superficie basolateral abre canales dependientes de voltaje para calcio, situados en la cercanía de las vesículas sinápticas, el aumento en el calcio intracelular, libera el neurotransmisor que se une a receptores ubicados en las neuronas aferentes gustativas. (Figura 8). (Chávez et al. 2010) (Smith, 2001) (Fox, 2014).

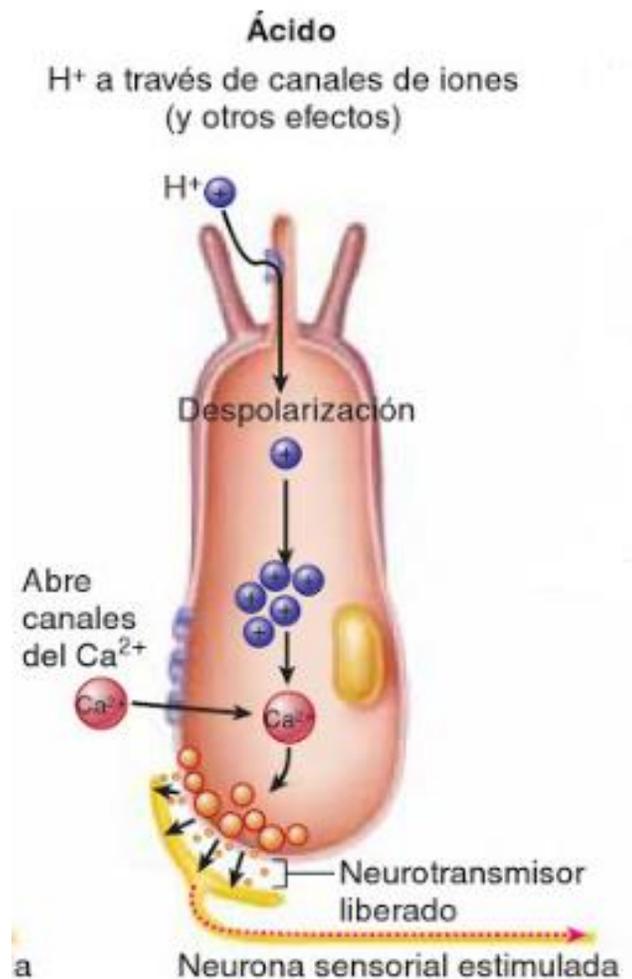


Figura 8. Célula gustativa específica para el sabor salado, donde ocurre una despolarización por iones Ca^{2+} . (Ira Fox, Stuart 2014)

Sabor dulce. Tal como es el caso del azúcar o los edulcorantes sintéticos, no entran en las células gustativas, debido a que el tamaño de molécula es muy grande, sin embargo si desencadenan cambios en el interior de las mismas. Se unen a unos receptores, situados en la superficie de la célula gustativa que están conectadas a proteína G. Cuando esto sucede las subunidades (α , β y γ) de la proteína G se escinden en dos subunidades funcionales α y $\beta\gamma$ que activan una enzima próxima. Seguidamente, la enzima convierte ciertas moléculas precursoras del interior de la célula en lo que se conoce como segundos mensajeros que, de forma indirecta, cierran los canales de potasio (Figura 9) (Chávez et al. 2010) (Smith, 2001) (Fox, 2014).

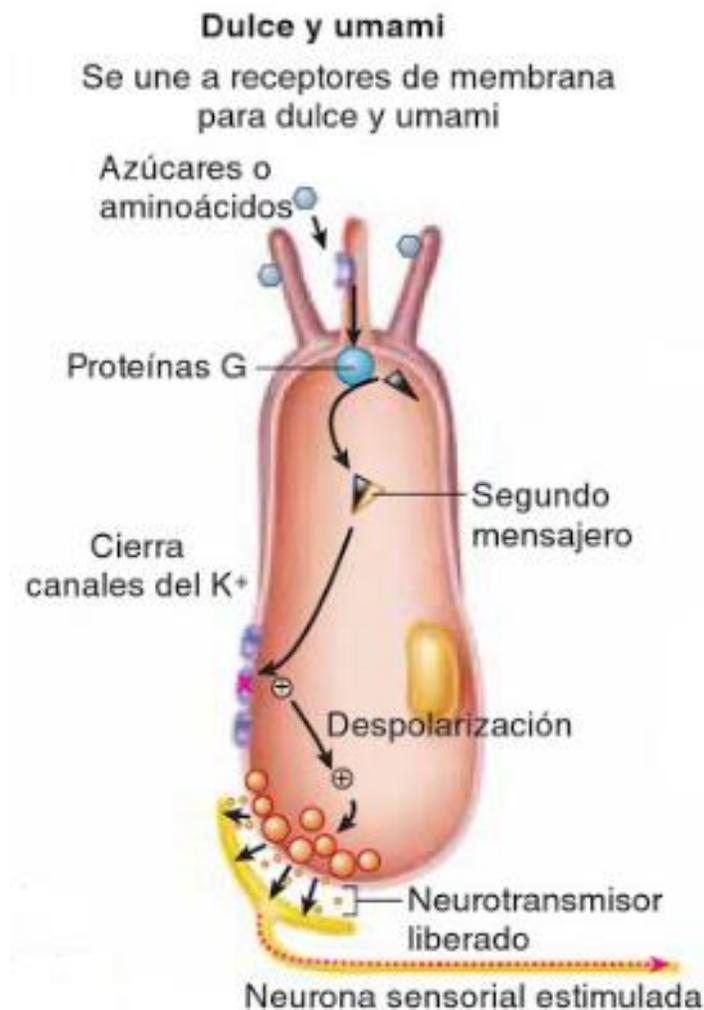


Figura 9. Célula gustativa específica para el sabor dulce y umami, donde ocurre una despolarización por azúcares, aminoácidos, glutamato y aspartato (que no se muestran por medio de receptores acoplado a proteína G. (Ira Fox, Stuart 2014).

Sabor umami. El gusto del glutamato monosódico (GMS), es lo que se identificó como gusto umami. Desde 1908, Kikunae Ikeda, identificó por primera vez al umami a partir de sopa de algas, aislando la molécula que origina este tipo de sabor y demostrando que era glutamato monosódico. Al igual que la sal y la pimienta, el GMS es, en la actualidad, una de las sustancias saborizantes más usadas en el mundo. Frecuentemente los occidentales describen al umami como sabor a caldo o sabor a carne; sin embargo, el glutamato es uno de los componentes principales en la mayor parte de los alimentos que contienen proteínas naturales, tales como la carne, el pescado, la leche, los quesos añejados y algunos vegetales como los tomates y el maíz, así como, aunque en menor proporción, la cebolla y zanahoria. El glutamato monosódico añadido a muchas comidas aumenta el sabor y se usa ampliamente en la industria alimenticia. Como tal, se encuentra en cereales, sopas enlatadas y de sobre, y es un componente importante de la salsa soya. (Chávez et al. 2010) (Smith, 2001) (Fox, 2014).

Los aminoácidos se unen a los receptores de acoplamiento de la proteína G y activan a los segundos mensajeros. No se conocen aún con certeza las reacciones en cuya virtud los segundos mensajeros conducen a la liberación de los paquetes de neurotransmisores. (Figura 9) (Smith, 2001).

Sabor amargo. El mecanismo asociado específicamente a la transducción de agentes gustativos amargo, involucra a canales iónicos algunos cationes divalentes, la quinina, y el bloqueador clásico de canales de potasio el tetraetilamonio (TEA). Actúan también a través del bloqueo directo de los canales de potasio apicales y de los receptores de acoplamiento de la proteína G, despolarizando a la célula receptora (Figura 10) (Chávez et al. 2010) (Smith, 2001) (Fox, 2014).

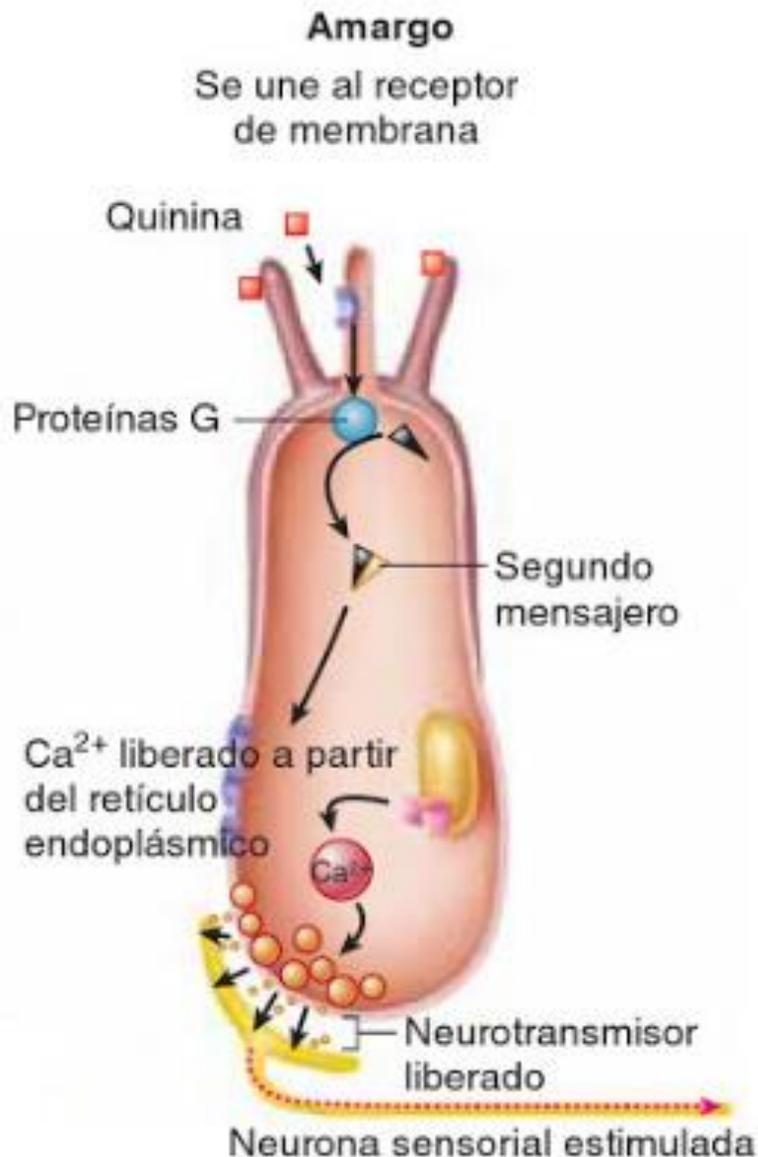


Figura 10. Célula gustativa específica para el sabor amargo, donde ocurre una despolarización por quinina (que no se muestran por medio de receptores acoplados a proteína G y segundos mensajeros. (Ira Fox, Stuart 2014)

2.8 Análisis de compuestos de sabor

El análisis de los sabores es importante ya que nos brinda información valiosa acerca del mismo, dándonos una idea más completa del perfil completo del sabor y darle el uso más conveniente, ya sea para la réplica de un sabor, el mejoramiento del mismo, pruebas de calidad, etc. Para dicho análisis de compuestos de sabor la metodología utilizada es la cromatografía de gases, para compuestos de aroma, volátiles y la cromatografía de líquidos para compuestos de sabor lingual, compuestos hidrosolubles.

2.8.1 Análisis de compuestos de aroma por cromatografía de gases (GC)

La investigación del aroma se ha beneficiado enormemente gracias al desarrollo de la cromatografía de gases (CG). Hasta 1963 solo se habían identificado unos 500 compuestos aromáticos en los alimentos. Gracias al desarrollo de la cromatografía de gases a mediados de los años sesenta y su posterior aplicación a la investigación se logró identificar 7,000 compuestos hasta el día de hoy. La CG es la metodología ideal para el estudio de aroma, ya que tiene excelentes poderes de separación y sensibilidad extrema (niveles de detección del orden de picograma). La resolución, así como la sensibilidad del equipo son esenciales para el análisis en la separación de aromas complejos encontrados rutinariamente en el trabajo del sabor (Reineccius, 2005).

Una de las desventajas primarias que han traído las columnas capilares ha sido su baja capacidad de muestreo. La cantidad de la muestra es importante ya que existe la posibilidad de realizarle un análisis posterior a un componente en específico, por ejemplo resonancia magnética nuclear o espectroscopía infrarroja (Reineccius, 2005).

Algunos de los estudios de sabor más complejos necesitan usar cg bidimensional. El estudio de cg bidimensional implica recolectar una parte de la corrida cromatográfica y volverla a analizar en otra fase cromatográfica diferente. Este tipo de sistemas permite la recolección de una parte específica de la corrida cromatográfica, lo cual mejora la sensibilidad de la prueba (Reineccius, 2005).

2.8.2 Análisis de compuestos de sabor lingual por cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC)

Desde el punto de vista de análisis, el gusto puede ser fácilmente explicado a través de técnicas analíticas. Por ejemplo, es el caso de la cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC, por sus siglas en inglés, Figura) la cual es una técnica analítica de separación ampliamente utilizada debido a su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su capacidad para separar especies no volátiles o termolábiles, pero, sobre todo, su amplia aplicabilidad a sustancias que son importantes tanto en la industria, como en muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general. Algunos ejemplos de los materiales que se pueden analizar mediante esta técnica son aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos, terpenoides, plaguicidas, antibióticos y una variedad de sustancias inorgánicas (Skoog, 2008)

Existen diversos puntos a considerar a la hora de utilizar la técnica de cromatografía de líquidos, uno de ellos es la eficiencia de la columna en la cromatografía de líquidos en donde es importante considerar el efecto del tamaño de partícula del empaque de la misma, por lo que la efectividad de una columna de cromatografía de líquidos debería mejorar a medida que disminuye el tamaño de partícula (Skoog, 2008)

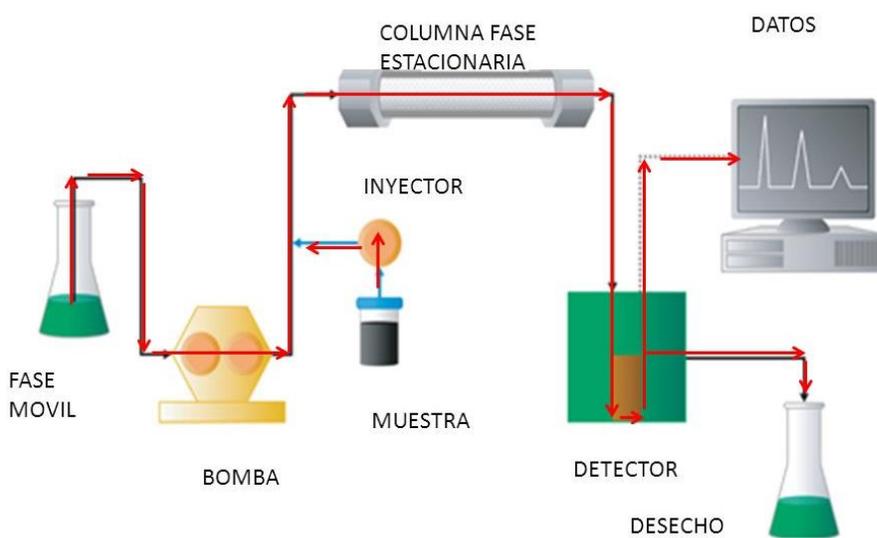


Figura 12. Esquema de funcionamiento de un cromatógrafo de líquidos.

CAPÍTULO 3



Antecedentes

Como se ha venido describiendo, el análisis de los compuestos tanto de aroma como de sabor lingual es de gran importancia cada vez más, ya que el tener información detallada de la presencia de los mismos da la posibilidad de futuras modificaciones y sobre todo mejoras a un determinado producto.

A lo largo de la historia se han desarrollado una serie de metodologías en las cuales se implementan una amplia variedad de especificaciones en el análisis de compuestos, y, lo más importante, que incluso parte de ellos están adaptados para ser analizados de manera sensorial y así en apoyo al análisis instrumental tener resultados más precisos y contundentes. A continuación, se describirán algunos de los métodos utilizados hoy en día.

3.1 Cromatografía de gases/olfactometría (GC/O por sus siglas en inglés) o Cromatografía de gases con detector de masas (CG-MS)/olfactometría (GC-MS/O)

GC/O y GC-MS/O son técnicas aplicadas exclusivamente a los estudios de compuestos de aroma. En olfactometría, la nariz se utiliza como detector de GC. Para este caso el sistema de GC está diseñado de tal modo que el efluente de la columna se divide de modo que una parte del efluente pasa a un puerto de inhalación y el resto va a un detector de GC (ionización por llama (FID) o un detector de masas (MS)) o la compresión de GC puede hacerse pasando todo el efluente de la columna de GC a la nariz en un momento dado, la columna se conecta entonces al instrumento detector, y se realiza una segunda ejecución. Esta segunda opción provee la máxima cantidad de muestra en la nariz una vez, y al detector FID o MS la segunda vez mejorando así el rendimiento de cada detector. Las principales desventajas que sean dos ciclos separados de GC es el tiempo de análisis y la dificultad de determinar que pico del cromatograma es responsable de un

olor en particular ya que en los cromatogramas puede haber varios picos en la proximidad del tiempo de retención de un olor dado, lo cual dificulta la asignación de un olor a un pico de GC o MS (Reineccius, 2005).

En general, es más deseable utilizar un método de GC-MS/O. Generalmente el analista está interesado en la identificación de compuestos que tienen olor (este olor puede ser tanto deseable, así como un mal olor). Desafortunadamente si se trata de hacer el trabajo de Cromatografía de gases con olfactometría (GC/O) y posteriormente identificar el compuesto responsable de un aroma de manera separada en un detector de masas (MS), es complicado determinar que pico de GC corresponde a que pico de MS. Por lo que es más conveniente utilizar GC/O-MS para este tipo de análisis ya que en este se puede obtener un perfil de olor y un perfil de MS a la vez, y de este modo la identificación de los compuestos es más sencilla (Reineccius, 2005).

Esta metodología es muy útil ya que además de determinar que picos de GC tienen olor, puede ayudar a la identificación de compuestos. Un químico experimentado puede brindar una gran cantidad de información sobre un producto químico por olfatear a medida que sale de la columna cromatográfica basándose simplemente en su aroma y en las propiedades de retención en la corrida cromatográfica (Reineccius, 2005).

El GC/O produce lo que se llama un aromagrama, el cual es una lista del carácter de olor de cada pico en la corrida cromatográfica. Debido a que en este análisis se utiliza más de un sniffer (minimización de errores de datos debido a alguna anosmia específica) los datos se presentan más a menudo en forma de tabla. Estos datos son extremadamente valiosos ya que indican que picos de GC tienen aroma. Esta metodología es muy útil, ya que otra de las ventajas es focalizarse únicamente en detectar los compuestos de interés en una prueba, así el analista no tiene la necesidad de analizar pico por pico, sino más bien, una vez localizado el aroma particular que desea encontrar en un producto solo enfocarse en la detección del mismo (Reineccius, 2005).

Es importante mencionar que para este análisis se utilizan solo panelistas experimentados limitando el tiempo que se le pide al sujeto oler cada uno de los compuestos (puede limitarse a 20 minutos), no obstante, aún con panelistas con experiencia muchas

veces existen desacuerdos, lo cual es muy común, por lo que muchas veces se le critica por ser una prueba subjetiva.

3.2 La “clave del sabor” en los alimentos

Históricamente, la investigación moderna del aroma comenzó gracias al aislamiento e identificación de los compuestos de aroma en los alimentos. Se pensó que si pudiéramos identificar todos los compuestos de aroma en los alimentos, se podría reproducir la réplica del aroma de un alimento en particular mediante la formulación del sabor basado en los datos analíticos. Lamentablemente no resultó ser como ellos esperaban, ya que los investigadores encontraron que había un enorme número de compuestos aromáticos presentes en los alimentos, y, sin embargo, no todos podrían ser contribuyentes al aroma de un alimento. Debido a este inconveniente, hubo una época en la que los investigadores intentaron determinar que compuestos aromáticos realmente necesarios para la recreación de un aroma particular en un alimento, por lo que se postularon entre 20 y 30 compuestos necesarios para reproducir un aroma de un alimento. Varios métodos fueron desarrollados para darle solución a este desafío, los cuales serán descritos a continuación (Reineccius, 2005).

El primer trabajo del que se tiene conocimiento en esta área fue hace más de 45 años por Patton y Josephson, quienes propusieron estimar la importancia de un compuesto aromático como característica sensorial de un alimento mediante la relación de la concentración de un compuesto en un alimento con el umbral sensorial del mismo. Esta relación se le conoce actualmente como el valor de actividad de olor (OAV) también conocido como: valor de olor, unidad de olor, unidad de sabor o aroma. Patton y Josephson sugirieron que los compuestos presentes por encima de sus concentraciones de umbral sensorial en un alimento eran probablemente contribuyentes significativos a su aroma, mientras que aquellos que ocurren por debajo de su umbral no lo son (Reineccius, 2005).

3.2.1 Análisis de dilución de extractos de aroma, Análisis de concentración de extractos de aroma y CHARM.

Desde la introducción del concepto OAV, se han utilizado varios enfoques para detectar olores clave (key compounds) en los alimentos. Dos procedimientos principales de selección para dichos compuestos clave son análisis de aroma por dilución de extractos (AEDA por sus siglas en inglés Aroma Extract Dilution Analysis) el cual fue desarrollado por Ullrich y Grosch; así como una variación la cual recibe el nombre de análisis de concentración de extracto de aroma (AECA por sus siglas en inglés Aroma Extract Concentration Analysis) creado por Kerscher y Grosch, así como también el análisis de CHARM desarrollado por Acree y Barnard. Estas metodologías evalúan por GC/O una serie de diluciones (o concentraciones) de un aroma de un alimento (Figura 13). En estas metodologías se toma en cuenta su tiempo de retención (el tiempo en el que un compuesto es detectado) o índice de Kovats en cada dilución. Cuanto mayor sea el número de diluciones, se considera que mayor es su CHARM o valor de dilución. A partir de estos estudios se genera un diagrama de dilución o valores de CHARM como una función del índice de retención (Figura 13, parte inferior derecha) (Reineccius, 2005).

Ambas metodologías, tanto AEDA como CHARM propusieron originalmente que entre mayor sea el valor de dilución (el número de diluciones necesarias hasta que no se perciba ningún rastro de olor) mayor es la contribución de ese compuesto al aroma general. Estas metodologías se utilizan para determinar que compuestos aromáticos es más probable que contribuyan más al aroma de un alimento (Reineccius, 2005).

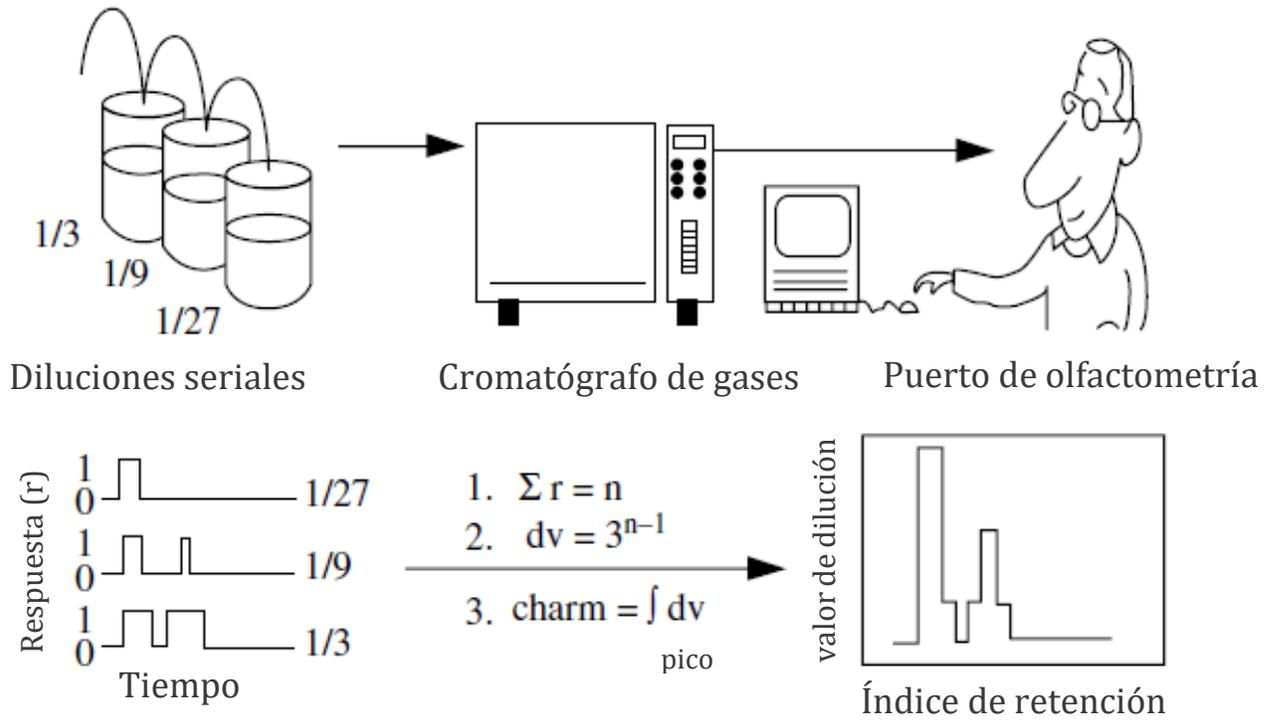


Figura 13. Esquema del sistema GC/O usado en obtención por CHARM (Gary Reineccius, 2005).

3.2.2 OSME

Otro de los métodos que también ha encontrado aplicación para GC/O recibe por nombre OSME el cual fue desarrollado por McDaniel y ha sido aplicado en los estudios de aroma del vino. En este método, un panelista evalúa los aromas que eluyen de una columna de GC y responde moviendo una variable más resistente como la intensidad del aroma. De esta manera se obtienen mediciones de intensidad y duración de cada pico del cromatograma (GC) (Reineccius, 2005).

La importancia de un odorante para el aroma general se juzga basado en la sensibilidad relativa de acuerdo a sus intensidades en la inhalación. Esta es una diferencia fundamental entre los métodos de dilución (AEDA, OAV Y CHARM), y OSME. Los métodos de dilución se basan en el principio de que los compuestos presentes en el múltiplo más grande de su umbral son los más importantes para la conformación del aroma (Reineccius, 2005).

3.2.3 Frecuencia de impacto nasal

El método de NIF (nasal impact frequency) fue desarrollado por Pollien en Alabama. En este método, de ocho a diez individuos sin entrenamiento previo inhalan el efluente de GC. Notando de esta manera en que momento detectan un olor en particular. El aroma utilizado se ajusta y se aísla, de tal manera que en una sola operación de GC, se perciben aproximadamente 30 odorantes, de esta manera los compuestos de aroma más detectados por los individuos se considera la probabilidad de que sean los más importantes. Sin embargo una de sus debilidades es que al aislar dos compuestos en un aroma uno podría estar apenas sobre su umbral de detección de todos los sniffers mientras que otro podría estar a una gran distancia por encima de su umbral de detección para todos los sniffers por lo que ambos podrían ser considerados como compuestos de igual intensidad en tal metodología. (Reineccius, 2005).

3.3 Cromatografía de líquidos con detección sensorial simultánea.

Como se mencionó anteriormente para el análisis de compuestos de aroma ya existen metodologías en las cuales se puede analizar los compuestos presentes en un producto alimenticio y al mismo tiempo tener la posibilidad de hacer un análisis sensorial lo cual favorece a tener un concepto más completo del análisis del sabor, sin embargo para analizar compuestos hidrosolubles, los cuales corresponden a los compuestos de sabor lingual no se tiene mayor registro.

Un grupo de investigadores propusieron la idea para el desarrollo de una metodología donde además de analizarse analíticamente por cromatografía de líquidos de alta eficiencia se pudiese llevar a cabo un análisis sensorial, mediante la bifurcación de la salida del efluente una vez que este sale del detector, para así poder dirigirse a un panelista y colector de fracciones al mismo tiempo. Los investigadores pertenecían a una la universidad de München en Alemania en conjunto con la Universidad de Zululand, Kwazulu Natal en Sudáfrica donde diseñaron esta metodología evaluando la modulación del sabor del té de yerba santa (*Eriodicyton angustifolium*) y dos más típicos de África, té honeybush (*Cyclopia intermedia*) y rooibos (*Aspalathus linearis*) (Reichelt et al., 2008). Dos años más tardes el mismo grupo de investigadores realizaron otra investigación en la misma universidad, dicho análisis lo realizaron en el enmascaramiento del sabor amargo y el mejoramiento del sabor dulce en yerba santa (Reichelt et al., 2010).

CAPÍTULO 3



Justificación

La metodología de HPLC acoplada a detección sensorial simultánea brinda información muy valiosa para entender el perfil de sabor completo de un sistema ya que como se ha demostrado, en un sabor es importante conocer tanto su conformación química como la percepción sensorial. Actualmente en México no existe dicha metodología por lo que este proyecto podrá dar pauta a futuras aplicaciones a nivel industrial para investigación y desarrollo.

CAPÍTULO 4



Objetivos

4.1 General

Implementar la metodología de cromatografía de líquidos con detección sensorial simultánea para la identificación de compuestos de sabor importantes en matrices alimenticias.

4.2 Específicos

- 1) Entrenar a panelistas sensoriales para la identificación de compuestos de sabor hidrosolubles.
- 2) Determinar las mejores condiciones cromatográficas utilizando sistemas modelo de compuestos de sabor.
- 3) Aplicar la metodología de HPLC DSS con panelistas entrenados para el análisis de una matriz alimenticia.

CAPÍTULO 5



Materiales y Métodos

5.1 Entrenamiento a panelistas sensoriales para la identificación de compuestos hidrosolubles.

Para el análisis sensorial se eligieron 2 panelistas adecuados. Las personas seleccionadas cumplieron con los siguientes parámetros: ser personas físicamente sanas, que no tuvieran ningún tipo de adicción (la cual podía afectar de manera negativa en su sensibilidad lingual), que no estuvieran bajo ningún tipo de tratamiento médico y que gozaran de una sensibilidad lingual estándar, aunque bien se sabe que este último factor es subjetivo, ya que los receptores linguales que se poseen pueden variar de una persona a otra al momento de la percepción, se tomó en cuenta que ambos panelistas percibieran con intensidad similar las concentraciones conocidas que se les facilitó en el momento de la evaluación (Calhoun et al.1992).

Se entrenó a los panelistas de tal manera que estuvieran familiarizados con el posible sabor que se podría percibir y así realizar su correcta identificación. Para esto se comenzó con el sabor dulce, específicamente con acesulfame K, este compuesto fue elegido ya que se encuentra presente en las bebidas carbonatadas. Se sabe también que la cantidad máxima permitida en bebidas no alcohólicas de este edulcorante es de 0.35 g/L de acuerdo con la NOM-218-SSA1-2011, por lo que se tomó este valor como referencia para la elaboración de las diluciones correspondientes a las primeras pruebas sensoriales, se realizaron un total de 7 diluciones con la finalidad de encontrar en que cantidad específica era detectable el sabor. Es importante mencionar que este reactivo se encuentra normalmente combinado con otra serie de edulcorantes, más comúnmente con aspartato, por lo que se optó por aumentar la concentración de acesulfame K, de tal modo que fuese perceptible, por lo que se elevó la concentración a 0.7 g/L, a partir de la cual se realizaron 6 diluciones seriales, mismas que fueron preparadas con agua como disolvente, las concentraciones de las mismas se muestran en la Tabla 1. (NOM-218-SSA1-2011).

Tabla 1. Concentraciones de las soluciones seriales de acesulfame K.

Compuesto	Concentración (%)
Acesulfame K	1.3, 1, 0.7, 0.5, 0.3, 0.1

Para darle continuidad al entrenamiento sensorial se realizaron soluciones de los sabores modelos para la correcta identificación de los sabores básicos, dichas diluciones comenzaron siendo el valor mínimo mostrado en la Tabla 2.

Tabla 2. Consideraciones para realizar las diluciones seriales para cada uno de los sabores básicos. (Karolin Höhl et.al. 2014).

Sustancia gustativa	Fórmula química	Peso molecular (g/mol)	Sabor	Concentración de la serie de diluciones	Unidad
Sacarosa	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342.3	Dulce	35.06	mmol/L
Cloruro de sodio	NaCl	58.44	Salado	34.22	mmol/L
Glutamato monosódico	$NaOOCCH_2CH(NH_2)COOH(H_2O)$	187.13	Umami	5.34	mmol/L
Ácido cítrico	$C_6H_8O_7(H_2O)$	210.14	Ácido	1.20	mmol/L
Cafeína	$C_8H_{10}N_4O_2$	194.19	Amargo	0.54	mmol/L

Las concentraciones realizadas, así como sus respectivas diluciones para cada sabor evaluado se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Concentraciones de las soluciones seriales de cada sabor básico.

Compuesto	Concentraciones (%)
Sacarosa	42, 33, 24, 16, 8
Cafeína	1.6, 1.1, 0.95, 0.4, 0.2
Glutamato monosódico	3.5, 2.5, 2.0, 1.3, 0.6
Ácido cítrico	2.1, 1.83, 1.4, 1.1, 0.4
Cloruro de sodio	6.9, 6.13, 3.27, 1.63, 0.69

A partir de las diluciones realizadas, tanto de los compuestos elegidos para representar a los sabores básicos, así como el acesulfame K, se inyectó en un vial por

separado un volumen de 380 μL de la fase móvil que se utilizó en las corridas cromatográficas, la cual fue agua/etanol (980:20 mL), de esta manera no representó ningún tipo de riesgo para la salud, y 20 μL de cada una de las diluciones antes mencionadas. Esto se realizó para familiarizar a los panelistas a los más cercano que percibieron en las corridas reales, donde no solo percibieron el compuesto de la muestra modelo o en la matriz real de interés, si no también, fase móvil, percibiendo todo en conjunto

Los panelistas atendieron 2 sesiones para cada sabor analizado. En cada sesión los panelistas fueron sometidos a la evaluación sensorial de cada una de las diluciones correspondiente al sabor en cuestión, llevándose a cabo un enjuague con agua de 20 segundos entre cada dilución evaluada, esto con la finalidad de limpiar el paladar y evitar la confusión de percepción e intensidad de cada una de ellas (Delwiche & Warnock, 2008).

Determinación de las mejores condiciones cromatográficas utilizando sistemas modelo de compuestos de sabor.

Para la determinación de las condiciones óptimas para la corrida cromatográfica se llevó a cabo el análisis de una muestra modelo correspondientes a los sabores básicos así como de acesulfame K, por lo que se inyectó cada una de las diluciones seriales, las cuales se muestran en las Tabla 1 y 3.

Se realizó una serie de corridas cromatográficas en un HPLC marca Agilent 1200s con una columna C18 marca LICHROSORB con un tamaño de partícula de 10 μm a una velocidad de 3.5 mL por minuto, utilizando una fase móvil agua/etanol a una proporción de 2%/98% respectivamente, utilizándose un loop de inyección de 20 μL y 100 μL .

Las composiciones propuestas para las muestras así como su concentración fueron siguientes: para el sabor dulce se utilizó sacarosa a una concentración de 35.06 mmol/L, para el sabor salado se utilizó cloruro de sodio a una concentración de 34.22 mmol/L, para el sabor ácido se utilizó ácido cítrico a una concentración de 1.20 mmol/L, para el sabor amargo se utilizó cafeína a una concentración de 0.54 mmol/L y finalmente para el sabor umami se utilizó glutamato monosódico a una concentración de 5.34 mmol/L. Cabe

mencionar que dichas concentraciones están basadas en el umbral de detección de cada uno de los compuestos propuestos (Hohl, Schonberger, & Busch-Stock, 2014).

El acondicionamiento cromatográfico de cada uno de los sabores se llevó a cabo con la variación de velocidad de flujo de la corrida cromatográfica, así como de temperatura, ya que se ha demostrado que la variación de los mismos puede favorecer a la detección del compuesto, optimizando así sus condiciones. (Thermo Scientific, 2016)

5.2 Aplicar la metodología de HPLC DSS y de panelistas entrenados para el análisis de 1 matriz alimenticia simple

Una vez establecidas las condiciones cromatográficas ideales se analizó una matriz alimenticia simple, la matriz seleccionada para este paso es una bebida carbonatada de marca comercial, así como una bebida homóloga de diferente fabricante, las cuales fueron inyectadas de manera directa en el cromatógrafo. Una vez inyectada, la muestra se dirigió a la columna cromatográfica pasando por detector y finalmente era evaluada por los panelistas en la salida de la corrida cromatográfica, el diagrama de funcionamiento de la metodología se muestra en la Figura 14.

Para tener una idea de lo que probablemente se puede observar en el análisis de la matriz alimenticia se elaboró un cuadro con los compuestos que posiblemente se esperaban visualizar, esto de acuerdo al contenido las bebidas carbonatadas (Tabla 3).

Tabla 4. Compuestos que se esperan encontrar en la matriz simple (bebida carbonatada).

Refresco 7Up					
Ingredientes en Etiqueta	Posibles compuestos	Compuestos Hidrosolubles	Compuestos Hidrosolubles c/sabor	Compuestos con concentración suficiente para sentir sabor	Posibles sabores que serán detectados
Agua Carbonatada	H ₂ O, H ₂ CO ₃	H ₂ O, H ₂ CO ₃	H ₂ CO ₃	H ₂ CO ₃	Ácido
Azúcares	Sacarosa: Fructosa y Glucosa	Sacarosa: Fructosa y Glucosa	Sacarosa: Fructosa y Glucosa	Sacarosa: Fructosa y Glucosa	Dulce
Saborizante natural Lima-Limón	Limoneno Ácido cítrico Isocrítico Sacarosa fructosa glucosa Vitamina C Compuestos fenólicos: flavonoides.	Ácido cítrico Azúcares: sacarosa, fructosa, glucosa Vitamina C (ácido ascórbico) Compuestos fenólicos: flavonoides.	Ácido cítrico Azúcares: sacarosa, fructosa, glucosa Vitamina C (ácido ascórbico) Compuestos fenólicos: flavonoides.	Ácido cítrico Azúcares: sacarosa, fructosa, glucosa Vitamina C (ácido ascórbico) Compuestos fenólicos: flavonoides.	Ácido Dulce Amargo
Ácido cítrico	Ácido cítrico	Ácido cítrico	Ácido cítrico	Ácido cítrico	Ácido
Benzoato de sodio	Benzoato de Sodio	Benzoato de Sodio	Benzoato de Sodio	Benzoato de Sodio	Salado
Acesulfame	Acesulfame	Acesulfame	Acesulfame	Acesulfame	Dulce
Sucralosa	Sucralosa	Sucralosa	Sucralosa	Sucralosa	Dulce
Ácido tartárico	Ácido tartárico	Ácido tartárico	Ácido tartárico	Ácido tartárico	Ácido

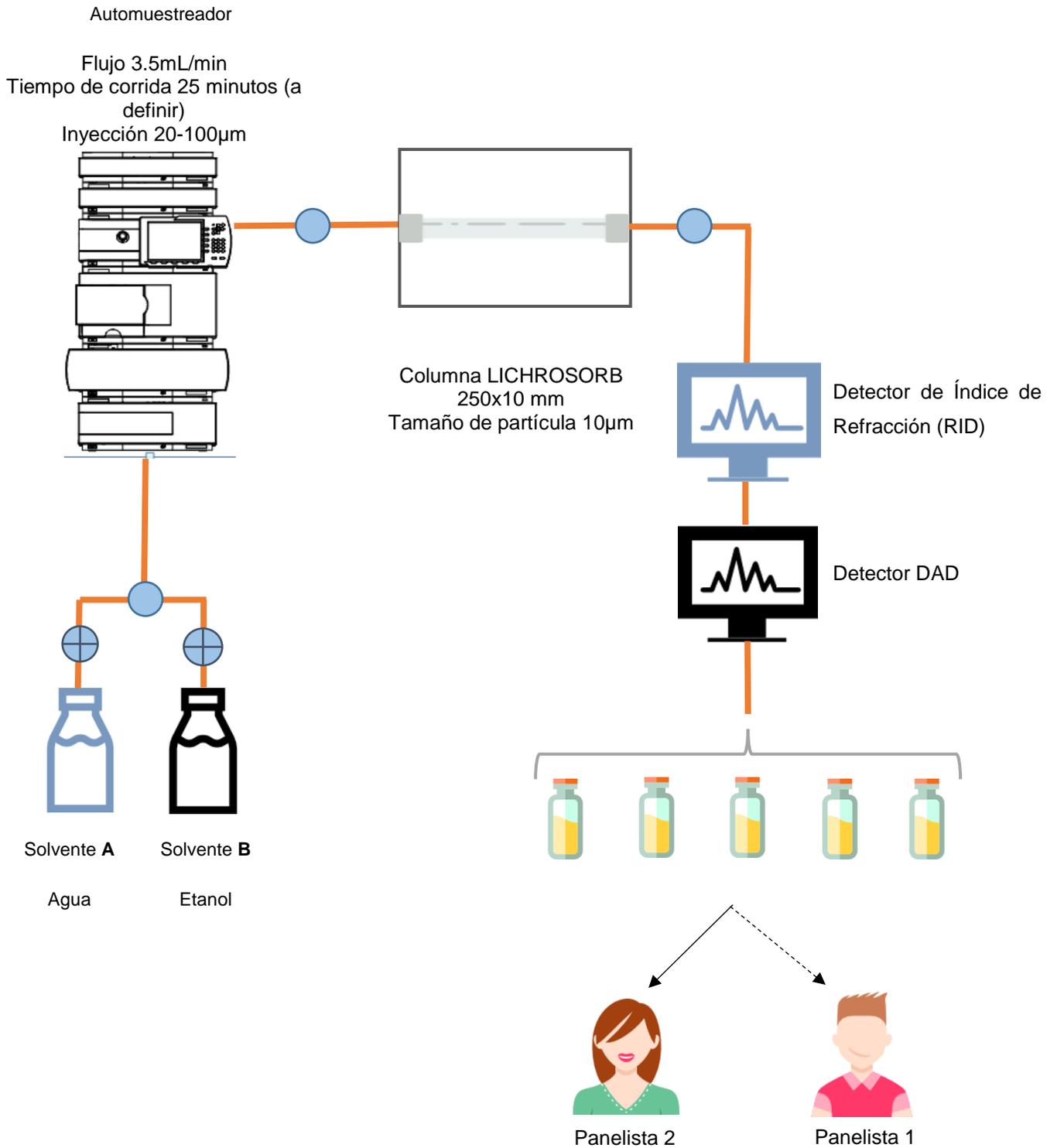


Figura 14. Diagrama de la implementación de DSS en Cromatografía de Líquidos.

5.3 Análisis cromatográfico

El análisis se llevó a cabo en un cromatógrafo de líquidos marca Agilent serie 1220 el cual cuenta con 2 bombas, un detector DAD (diode array detector), un detector de índice de refracción (RID), donde el seguimiento del efluente tiene una longitud de onda de 200nm y 400nm. Las separaciones se llevaron a cabo con una columna de fase inversa Hamilton PRP-1 (Hamilton Company, Nevada, EE.UU) en un 250 x 10 mm escala semipreparativa con un tamaño de partícula de 10 μm , con un gradiente de agua/etanol a una proporción de 7.5%/92.5% respectivamente con una velocidad de flujo de 3.5ml/min para eluir los compuestos.

CAPÍTULO 6



Resultados y discusión

6.1 Entrenamiento sensorial de los 5 sabores básicos

Los compuestos elegidos para realizar el entrenamiento sensorial para los 5 sabores básicos fueron: sacarosa y acesulfame K (dulce), cafeína (amargo), cloruro de sodio (salado), glutamato monosódico (umami) y ácido cítrico (ácido). Para la preparación de estas soluciones se consideró su umbral de detección sugerido en literatura los cuales se muestran en la Tabla 6 (Hohl et al., 2014).

Tabla 5. Consideraciones para realizar las diluciones seriales para cada uno de los sabores básicos. (Karolin Höhl et.al. 2014).

Sustancia gustativa	Fórmula química	Peso Molecular (g/mol)	Sabor	Concentraciones de la serie de diluciones	Unidad
Sacarosa	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342.3	Dulce	35.06	Mmol/L
Cloruro de sodio	NaCl	58.44	Salado	34.22	mmol/L
Glutamato monosódico	$NaOOCCH_2CH(NH_2)COOH(H_2O)$	187.13	Umami	5.34	Mmol/L
Ácido cítrico	$C_6H_8O_7(H_2O)$	210.14	Ácido	1.20	Mmol/L
Cafeína	$C_8H_{10}N_4O_2$	194.19	Amargo	0.54	Mmol/L

Para el entrenamiento sensorial se comenzó a manera de guía con el sabor dulce, el cual fue preparado con acesulfame K y agua grado HPLC. El acesulfame K es un poderoso edulcorante 200 veces más potente que la sacarosa y fue elegido debido a que es utilizado en la fabricación de bebidas carbonatadas, al igual que la matriz que se analizó, otro factor por el que se decidió comenzar con el mismo es porque al ser un edulcorante tan potente sería fácil de percibir ya que es la primera vez que una metodología como está se lleva a

cabo con estos compuestos específicos. Considerando que mayormente este edulcorante es usado en combinación con otros edulcorantes como el aspartame, se tomó en cuenta el límite máximo permitido para ambas, el cuál es 0.35 g/L de acuerdo con la NOM-2018-SSA1-2011 aplicada a bebidas saborizadas no alcohólicas. Tomando en cuenta la sinergia entre ambos edulcorantes se decidió aumentar la concentración en vista de que solo sería utilizado uno de ellos, para asegurar una mayor percepción lingual del panelista por lo que se realizó una concentración 2 veces mayor de 0.7 g/L. (NOM-2018-SSA1-2011).

Considerando la cantidad permitida de acesulfame K que se encuentra en las bebidas carbonatadas se prepararon 6 diluciones seriales, usando agua como disolvente, las concentraciones realizadas se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Primeras concentraciones correspondientes a las diluciones seriales de acesulfame K

Compuesto	Concentración (%)
Acesulfame K	0.13, 0.1, 0.07, 0.05, 0.03, 0.01

Los panelistas evaluaron directamente de manera lingual cada una las diluciones realizadas, obteniéndose los resultados obtenidos en la Tabla 7.

Tabla 7. Resultados obtenidos por evaluación sensorial correspondiente al sabor dulce por acesulfame K

DULCE (Acesulfame K)	
CONCENTRACIÓN (%)	PERCEPCIÓN
0.13	Completamente perceptible
0.1	Completamente Perceptible
0.07	Perceptible
0.05	Ligeramente perceptible
0.03	Muy poco perceptible
0.01	No perceptible

Una vez que se eligió la concentración percibida correctamente por ambos panelistas, esta se inyectó en el cromatógrafo de líquidos, a una velocidad de flujo de 3.5 mL/min, sin embargo los panelistas no lograron percibir ningún cambio en el sabor, no detectando el dulzor provocado por el acesulfame, a pesar de que si se detectó correctamente por el detector, lo cual, no fue coincidente con las pruebas antes realizadas, por lo que se analizó con atención el pico en el cromatograma.

Al analizar el pico en el cromatograma llamó la atención que el pico tardó un total de 12 segundos aproximadamente en salir por completo, por lo que, al considerar dicho tiempo, la velocidad de flujo y el volumen inyectado se obtuvo un factor de dilución de 35.

$$12 \text{ seg}/60 \text{ min} = 0.2 \text{ min}$$

Por lo tanto, considerando la velocidad de flujo de 3.5mL/min y volumen inyectado:

$$0.2 \times 3.5 = 0.7 \text{ mL} \times 1000 = 700 \mu\text{L}$$

$$\text{Factor de dilución: } 700 \mu\text{L}/20 \mu\text{L} = 35$$

Con los resultados obtenidos se tomó en cuenta que los 20 μL inyectados se estaban diluyendo 35 veces, debido a esto los panelistas no fueron capaces de percibir el compuesto de manera lingual, por lo que, se optó por concentrar las diluciones realizadas con anterioridad y realizar el entrenamiento sensorial de manera separada en viales, simulando la colección de toda la fracción, es decir, de todo el pico cromatográfico.

Las concentraciones finales se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Concentraciones finales para las diluciones seriales correspondientes a acesulfame K

Compuesto	Concentración (%)
Acesulfame K	1.3, 1, 0.7, 0.5, 0.3, 0.1

Tomando en cuenta el factor de dilución encontrado con las pruebas realizadas con acesulfame K, se consideró cada una de las cantidades sugeridas para el resto de los compuestos seleccionados para los cinco sabores básicos y se concentraron 35 veces más para las soluciones modelo. A partir de estas concentraciones se realizaron diluciones seriales para cada sabor, por lo que al realizar los cálculos correspondientes quedaron de acuerdo con los datos mostrados en la Tabla 9.

Tabla 9. Concentraciones de las soluciones seriales de cada sabor básico.

Compuesto	Concentraciones (%)
Sacarosa	42, 33, 24, 16, 8
Cafeína	1.6, 1.1, 0.95, 0.4, 0.2
Glutamato monosódico	3.5, 2.5, 2.0, 1.3, 0.6
Ácido cítrico	2.1, 1.83, 1.4, 1.1, 0.4
Cloruro de sodio	6.9, 6.13, 3.27, 1.63, 0.69

Una vez realizadas las soluciones de cada concentración correspondiente a cada dilución serial de cada sabor básico se tomaron 20 μ L de cada una y se colocaron en 680 μ L de fase móvil (constituida por 980 mL de agua y 20 mL de etanol, conformando una concentración de 2%). Cada fracción preparada de cada sabor básico fue sometida a una evaluación sensorial realizada por un panel sensorial, donde los panelistas atendieron 2 sesiones para evaluar cada una de las soluciones hasta encontrar aquellas que fueran perceptibles, eligiendo así las concentraciones elegidas para inyectar en el cromatógrafo de líquidos.

Una vez evaluadas sensorialmente se obtuvieron los resultados mostrados en las Tablas 10 a 15, donde se evaluaron desde “no perceptibles” hasta “completamente perceptible”.

Tabla 10. Resultados obtenidos por evaluación sensorial para el sabor dulce correspondiente a acesulfame K con las concentraciones finales.

DULCE (Acesulfame K)	
CONCENTRACIÓN (%)	PERCEPCIÓN
0.13	Completamente perceptible
0.1	Completamente Perceptible
0.07	Perceptible
0.05	Ligeramente perceptible
0.03	Muy poco perceptible
0.01	No perceptible

Tabla 11. Resultados obtenidos por evaluación sensorial para el sabor dulce.

DULCE (Sacarosa)	
CONCENTRACIÓN (%)	PERCEPCIÓN
42	Completamente perceptible
33	Completamente Perceptible
24	Perceptible
16	Ligeramente perceptible
8	Muy poco perceptible

Tabla 12. Resultados obtenidos por evaluación sensorial para el sabor ácido.

ÁCIDO	
CONCENTRACIÓN (%)	PERCEPCIÓN
2.1	Muy perceptible
1.83	Muy perceptible
1.4	Perceptible
1.1	Ligeramente perceptible
0.4	No perceptible

Tabla 13. Resultados obtenidos por evaluación sensorial para el sabor salado.

SALADO	
CONCENTRACIÓN (%)	PERCEPCIÓN
6.9	Muy perceptible
6.13	Muy perceptible
3.27	Perceptible
1.63	Perceptible
0.69	Ligeramente perceptible

Tabla 14. Resultados obtenidos por evaluación sensorial para el sabor amargo.

AMARGO	
CONCENTRACIÓN (%)	PERCEPCIÓN
1.6	Completamente perceptible
1.1	Completamente perceptible
0.95	Perceptible
0.4	Perceptible
0.2	No perceptible

Tabla 15. Resultados obtenidos por evaluación sensorial para el sabor umami.

UMAMI	
CONCENTRACIÓN (%)	PERCEPCIÓN
3.5	Completamente perceptible
2.5	Completamente perceptible
2.0	Perceptible
1.3	Perceptible
0.6	Ligeramente perceptible

Una vez evaluadas sensorialmente cada una de las soluciones se eligieron aquellas que eran perceptibles, siendo 24% para dulce, 1.4% para ácido, 3.27% para salado, 0.95% para amargo y 2.0% para umami. Soluciones con estas concentraciones fueron inyectadas posteriormente en el cromatógrafo de líquidos para coleccionar la fracción directamente del mismo y corroborar su correcta percepción.

6.2 Condiciones cromatográficas para muestras modelo.

El acondicionamiento cromatográfico se llevó a cabo utilizando como primera opción una fase móvil la cual constaba de agua únicamente, puesto que no representa ningún riesgo a la salud, esto se llevó a cabo en una corrida cromatográfica a un flujo de 2.5 mL/min utilizando una columna C18 LiChrosorb, inyectando de manera directa y una cantidad de 20 µL la solución de acesulfame K a una concentración de 0.7 g/L mientras que uno de los panelistas se posicionaba a la salida del efluente cromatográfico para determinar si contaba con la sensibilidad para detectar el sabor analizado.

Al realizar las corridas cromatográficas se apreció que la anchura del pico fue demasiada, lo cual era prueba de que el agua no es la fase móvil idónea para este sistema, ya que es un solvente débil. Esto muy probablemente se debe a que los compuestos no se retenían correctamente, ya que normalmente se utilizan solventes fuertes, lográndose una mala resolución, ya que se ha demostrado que el solvente influye al momento de la detección (Alsehli & Dolan, 2012). Sumado a ello la velocidad fue otro factor influyente, puesto que demostró ser baja para este sistema en particular, a ello también se atribuyó el grosor del pico (Figura 17).

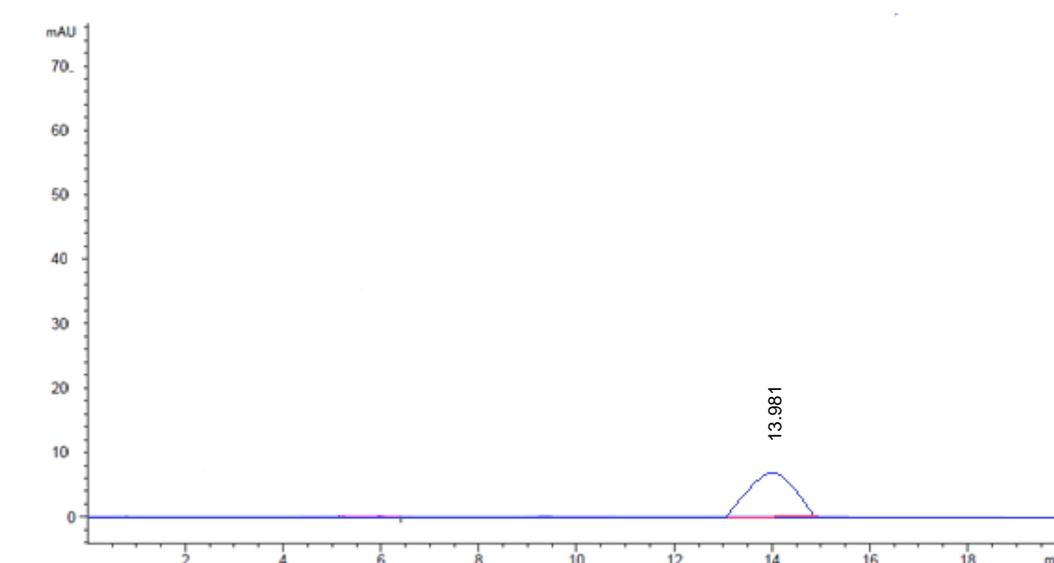


Figura 15. Cromatograma de una solución de acesulfame K a una concentración de 0.7% en fase móvil constada de agua únicamente.

Debido a los puntos considerados anteriormente se optó por añadirle etanol a la fase móvil, para promover la interacción con el recubrimiento interno permitiendo una resolución más fina; por lo que se preparó una fase agua/etanol en una proporción de 25%/75% respectivamente, a una velocidad de 3 mL/min. Esta fase permitió observar el pico de acesulfame K a una mejor resolución, sin embargo, el alcohol enmascaraba en gran medida la percepción del sabor, lográndose percibir muy poco, por lo que la percepción del sabor no fue confiable.

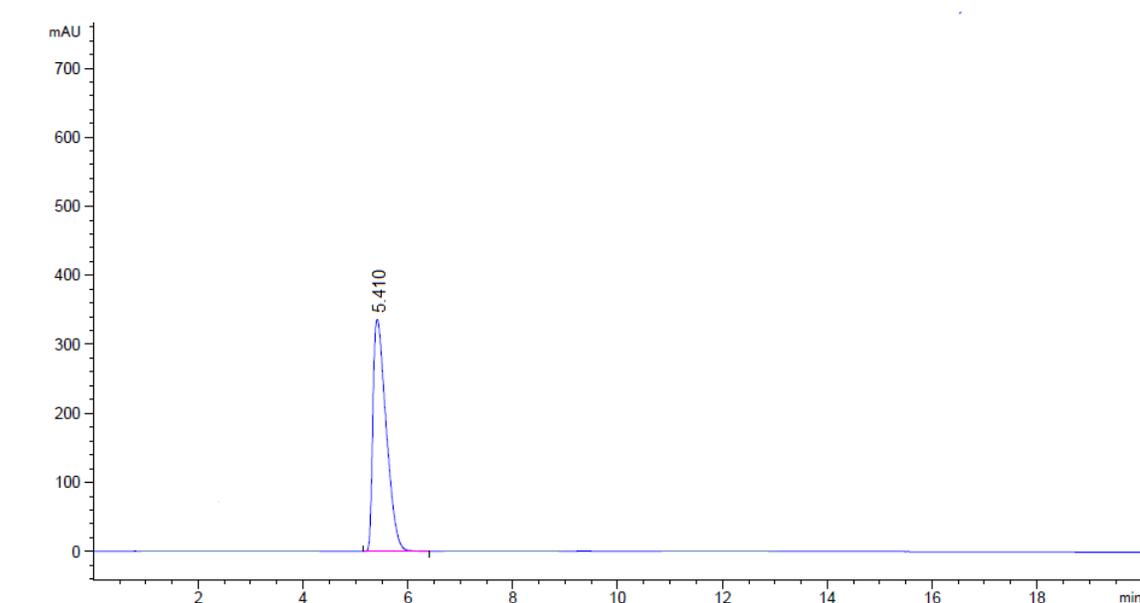


Figura 16. Pico correspondiente a una solución de 0.8 ppm de acesulfame K en fase agua 75%/Etanol 25% a una velocidad de flujo de 3 mL.

Considerando lo anterior se optó por aumentar la velocidad a 3.5 mL/min para disminuir el tiempo de retención y aumentar su probabilidad de percepción. La modificación en las condiciones de análisis permitió obtener una percepción más notable, aunque aún acompañada de enmascaramiento impidiendo a uno de los panelistas percibir el sabor dulce fidedignamente, por lo que se disminuyó la cantidad de etanol en la fase móvil, con la finalidad de disminuir su poder enmascarante. La disminución favoreció en gran manera a la percepción del sabor y ambos panelistas lograron percibir el sabor dulce en la prueba descrita; sin embargo, concluyeron que el sabor se diluía debido a que no salía por el efluente en una sola exhibición, si no que tardaba alrededor de 6 segundos en ser percibido por los panelistas, por lo que se tomó en cuenta tal dilución tal como se describió en la sección de evaluación sensorial.

Para el acondicionamiento de las soluciones modelo se inyectaron las concentraciones que resultaron perceptibles y diferenciables para los panelistas en la evaluación sensorial, tomando en cuenta los resultados obtenidos en acesulfame K se decidió utilizar las mismas condiciones, cambiando únicamente la longitud de onda a la que fueron detectados de acuerdo al compuesto de interés y el detector en el caso de sacarosa.

Para el sabor ácido el compuesto seleccionado fue ácido cítrico, el cual se detectó de manera correcta a una concentración de 1.83% y a una velocidad de flujo de 3.5 mL, se utilizó una columna LiChrosorb C18, a una longitud de onda de 210 nm y un detector UV-VIS, a una temperatura de 60°C y una fase móvil de agua/ etanol con una proporción de 980/20 mL respectivamente (Figura 19).

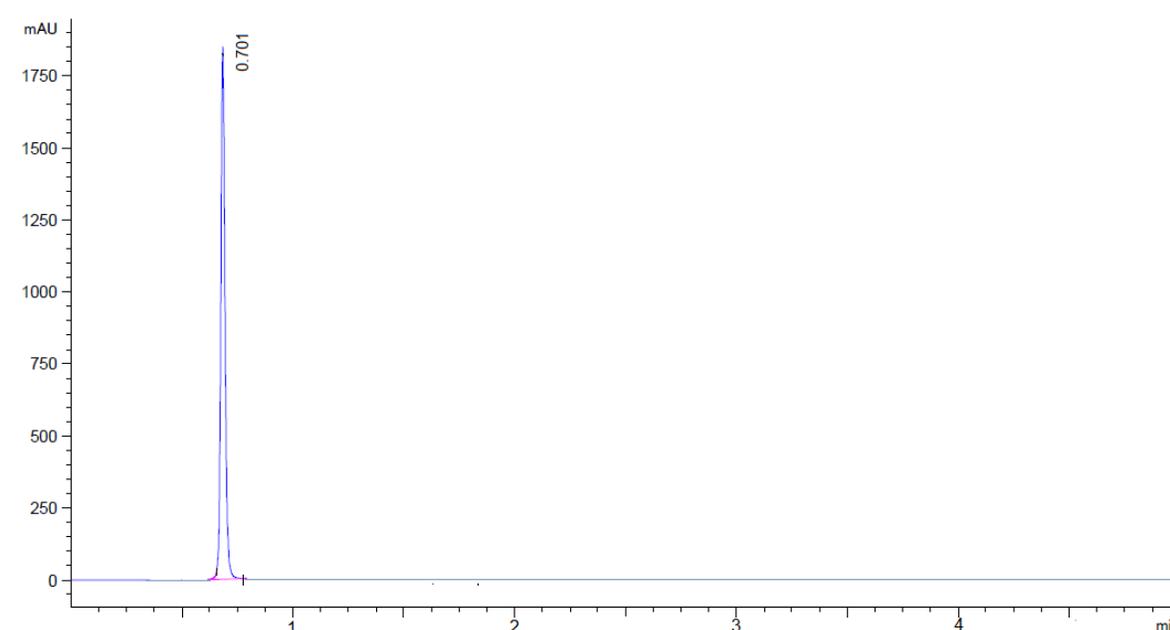


Figura 17. Pico correspondiente a ácido cítrico a una concentración de 1.83%

No hay información de esta detección utilizando esta velocidad de flujo tan alta, sin embargo, la detección con esa longitud de onda se ha registrado en otras publicaciones, por lo que atribuimos una correcta detección (Kelebek, Selli, Canbas, & Cabaroglu, 2009). Al salir el pico tan alargado nos da pauta de que el compuesto esta siendo retenido de manera adecuada saliendo de manera rápida por el flujo tan alto lo cual explica lo delgado del pico, ya que el compuesto sale en menor tiempo.

Para el sabor umami el compuesto seleccionado fue glutamato monosódico, el cual se detectó de manera correcta a una concentración de 2.5% y a una velocidad de flujo de 3.5 mL. Se utilizó una columna Lichrosorb C18, a una longitud de onda de 254 nm con detector UV-VIS, a una temperatura de 25°C y una fase móvil de agua/ etanol con una proporción de 980/20 mL respectivamente (Figura 20).

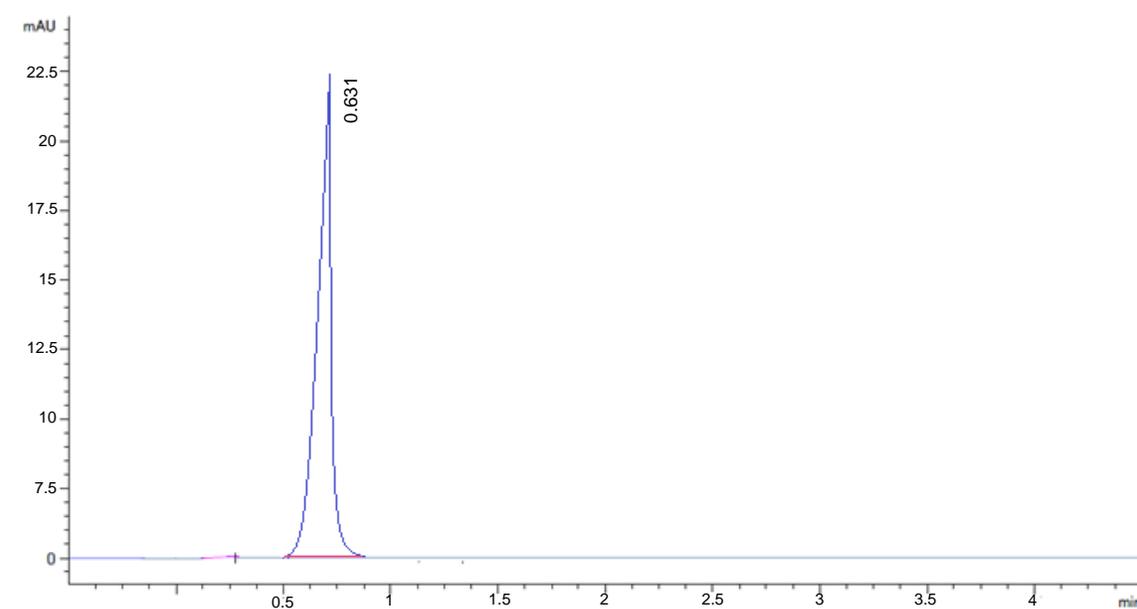


Figura 18. Pico correspondiente a Glutamato Monosódico a una concentración de 2.5%

La detección con esa longitud de onda se ha registrado en otras publicaciones, por lo que la detección es correcta, el tiempo de retención es muy breve comparado a lo encontrado en bibliografía sin embargo esto es debido a la alta velocidad de flujo utilizada (Lateef, Siddiqui, Saleem, & Iqbal, 2012). El pico tan alargado nos muestra que el compuesto está siendo retenido de manera adecuada.

Para el sabor dulce el compuesto seleccionado fue sacarosa, el cual se detectó de manera correcta a una concentración de 24% y a una velocidad de flujo de 2 mL y una temperatura de 40°. Se utilizó una columna amino, con detector RID y una fase móvil de agua/ etanol con una proporción de 980/20 mL respectivamente.

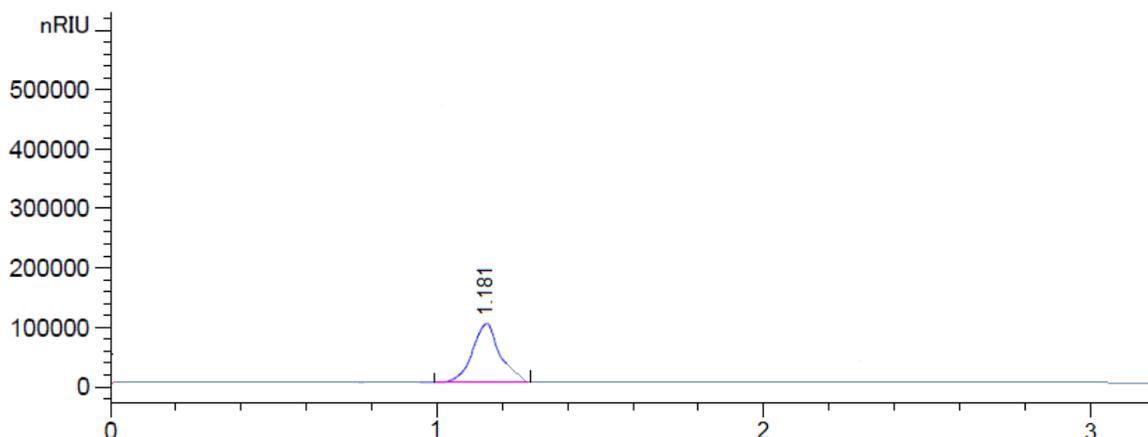


Figura 19. Pico correspondiente a sacarosa a una concentración de 24%

A diferencia de los compuestos anteriores el pico para sacarosa no salió tan alargado, esto puede deberse a que la concentración de la solución inyectada fue muy alta, la cual no pudo disminuirse, debido a que los panelistas solo pudieron percibir a partir de esa concentración y en aumento, esto tiene mucho sentido, ya que de acuerdo a la evolución del ser humano el paladar detecta los sabores dulces a altas concentraciones debido a que en general los azúcares tales como la sacarosa al sintetizarse en el estómago representa una fuente de energía y como el organismo requiere una alta cantidad del mismo una manera evolutiva de asegurar su buen consumo es tener altos niveles para su detección. Por otro lado logró detectarse con las mismas condiciones en otras publicaciones, tales como tipo de columna, aunque disminuyendo un poco la temperatura a la recomendada para evitar confusión al momento de ser detectado por el panelista (Kelebek et al., 2009).

Para el sabor amargo el compuesto seleccionado fue cafeína, el cual se detectó de manera correcta a una concentración de 1.1% y a una velocidad de flujo de 3.5 mL y una temperatura de 60°. Se utilizó una columna LiChrosorb C18, a una longitud de onda de 250 nm en un detector UV-VIS y una fase móvil de agua/ etanol con una proporción de 980/20 mL respectivamente (Figura 22).

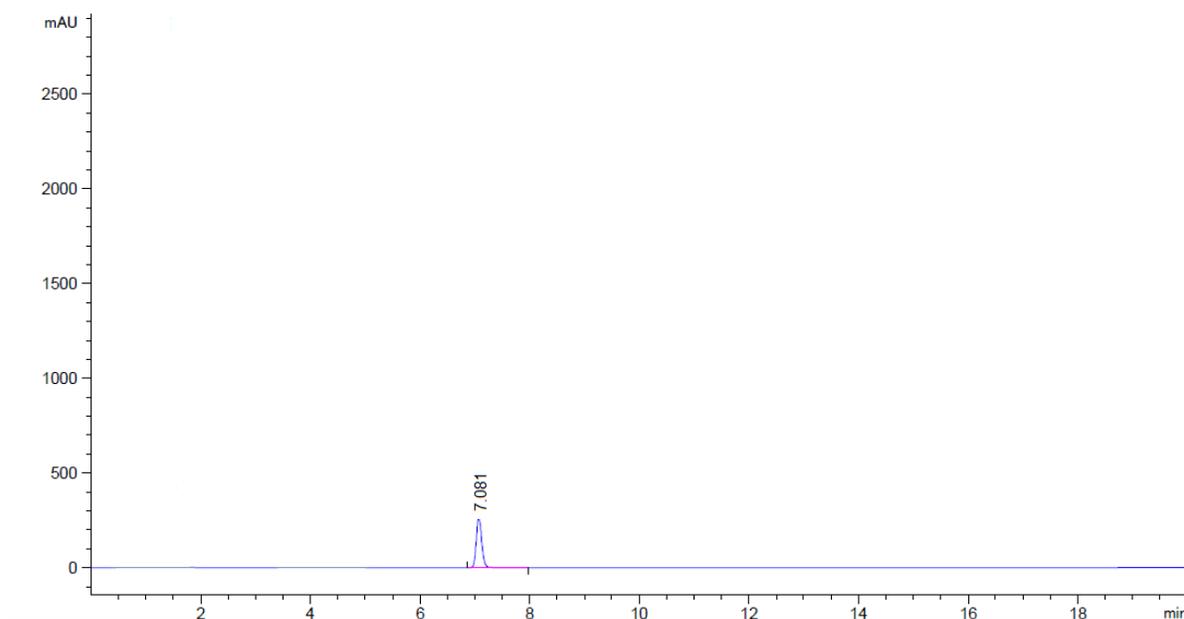


Figura 20. Pico correspondiente a Cafeína a una concentración de 1.1%

El pico cromatográfico no logró alargarse de manera adecuada debido a la alta concentración de esta; ya que se recomiendan cantidades menores para su detección, además de que se utiliza, sin embargo, a una menor concentración no lograba ser perceptible por los panelistas. No obstante fue detectable y perceptible correctamente (Ky et al., 2001) (Li, Simmons, & Mwangela, 2017).

6.3 Aplicación de la metodología de HPLC DSS utilizando panelistas entrenados para el análisis de 1 matriz alimenticia simple.

Una vez obtenidos los resultados para las pruebas de percepción, así como condiciones cromatográficas ideales correspondientes a las matrices modelo se procedió a realizar la siguiente etapa del proyecto. Se aplicó la metodología de HPLC DSS en una bebida carbonatada como ejemplo de una matriz alimenticia simple, así como una comparación con una bebida homóloga de diferente fabricante. Cabe destacar que el sabor de estos era “lima-limón.

No fue necesario realizar ningún tipo de preparación de muestra, ya que éstas fueron inyectadas de manera directa en el cromatógrafo de líquidos.

Para cada sabor de interés a analizar fueron utilizadas cada una de las condiciones cromatográficas ideales para cada uno de ellos anteriormente determinadas de tal manera que el panelista lograra detectarlos de manera correcta y esperada.

El orden para las corridas cromatográficas de acuerdo con el sabor que de interés a detectar fueron el siguientes: dulce, amargo, ácido, umami y salado.

Para la corrida cromatográfica se inyectaron 100 μL de muestra, un loop de la misma capacidad fue utilizado para la inyección, este volumen de inyección fue elegido con la finalidad de tener mayor cantidad de muestra en vista de que a diferencia de las soluciones modelo, esta no se puede concentrar más en caso de no percibirse con 20 μL .

Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 21-28.

Bebida 1

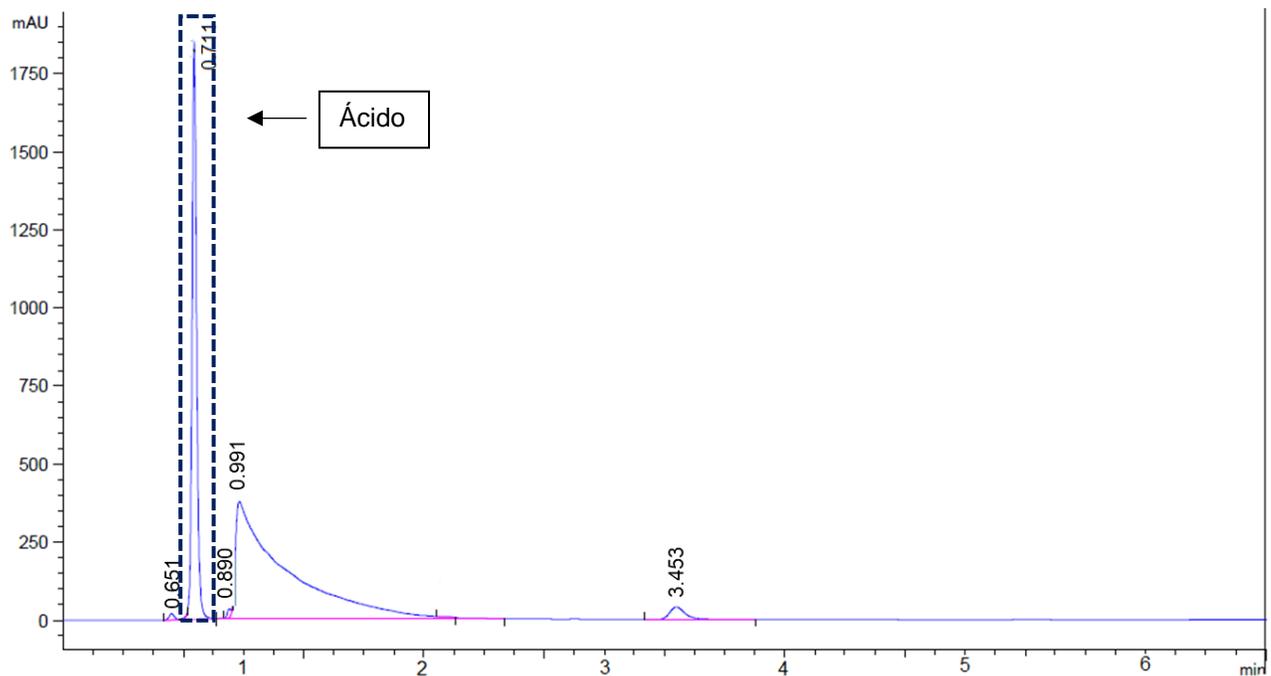


Figura 21. Cromatograma perteneciente al ácido (Ácido cítrico).

No existe información para comparar los resultados obtenidos para ácido cítrico utilizando la metodología de cromatografía de líquidos con detección sensorial simultánea, ya que es la primera vez que se utiliza para este tipo de matriz y compuestos, sin embargo al compararla con el acondicionamiento cromatográfico de las soluciones modelo se observó que el pico correspondiente a ácido cítrico fue detectado en un tiempo muy similar al de la muestra modelo, además de que tomando en cuenta el tiempo en el que aparecía el panelista logró percibirlo de manera correcta a la salida del efluente cromatográfico lo que confirmó que el pico era el correspondiente a ácido cítrico, teniendo una apariencia alargada y muy definida (Figura 21).

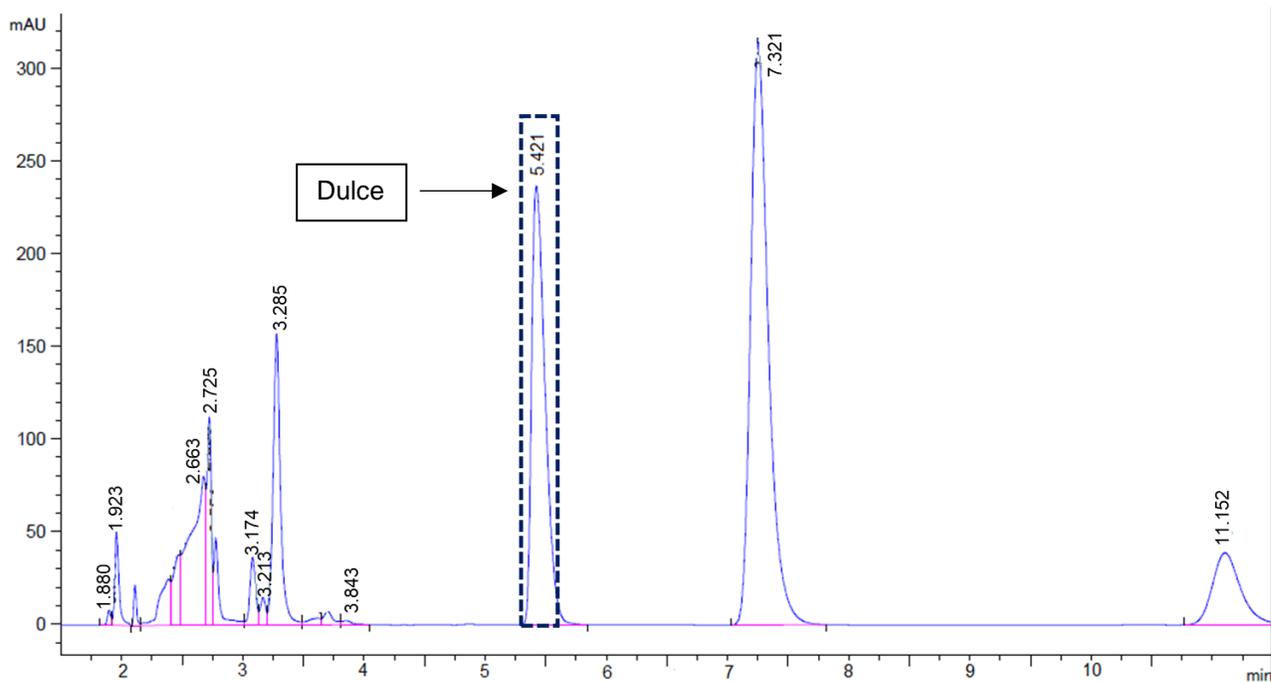


Figura 22. Cromatograma perteneciente al sabor dulce (Acesulfame K).

No existe información para comparar los resultados obtenidos para ácido cítrico utilizando la metodología de cromatografía de líquidos con detección sensorial simultánea, ya que es la primera vez que se utiliza para este tipo de matriz y compuestos, sin embargo al compararla con el acondicionamiento cromatográfico de las soluciones modelo se observó que el pico correspondiente a ácido cítrico fue detectado en un tiempo muy similar al de la muestra modelo, además de que tomando en cuenta el tiempo en el que aparecía el panelista logró percibirlo de manera correcta a la salida del efluente cromatográfico lo que confirmó que el pico era el correspondiente a ácido cítrico, teniendo una apariencia alargada y muy definida (Figura 22).

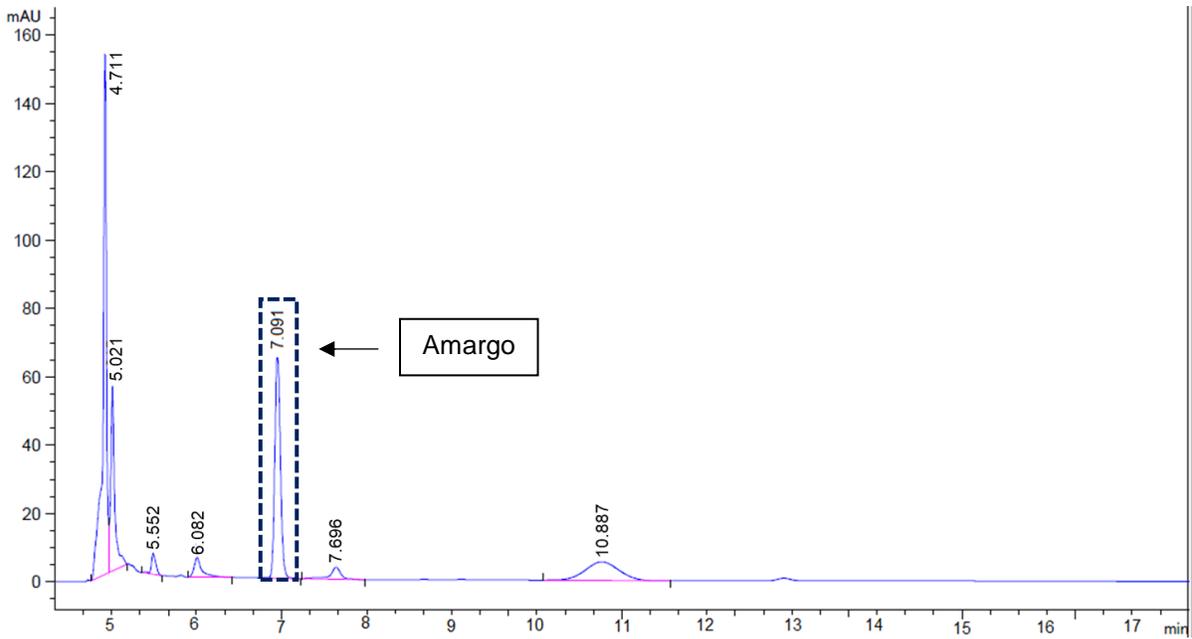


Figura 23. Cromatograma perteneciente al sabor amargo (Cafeína).

No existe información para comparar los resultados obtenidos para cafeína en bebidas carbonatadas utilizando la metodología de cromatografía de líquidos con detección sensorial simultánea, sin embargo al compararla con el acondicionamiento cromatográfico de las soluciones modelo se observó que el pico correspondiente a la cafeína fue detectado en un tiempo muy similar al de la muestra modelo, además de que tomando en cuenta el tiempo en el que aparecía el panelista logró percibirlo de manera correcta a la salida del efluente cromatográfico lo que confirmó que el pico era el correspondiente a cafeína, teniendo una apariencia definida (Figura 23).

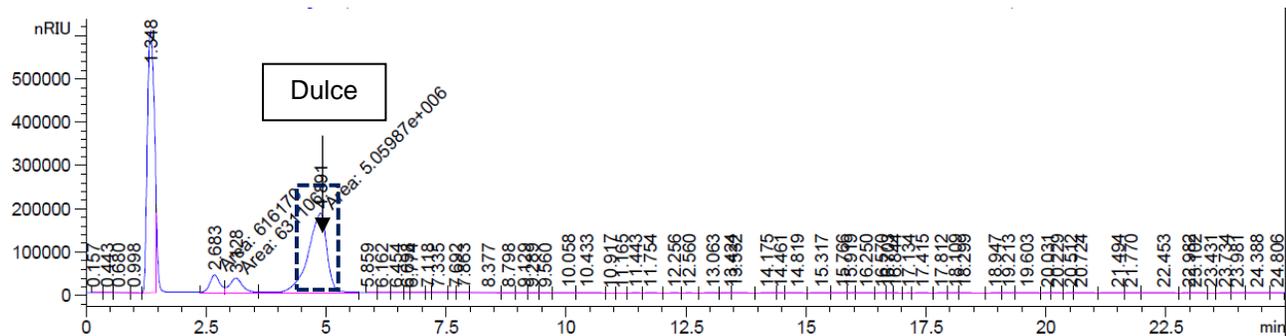


Figura 24. Cromatograma perteneciente al sabor Dulce (Sacarosa).

No existe información para comparar los resultados obtenidos para ácido sacarosa utilizando la metodología de cromatografía de líquidos con detección sensorial simultánea, sin embargo al compararla con el acondicionamiento cromatográfico de las soluciones modelo se observó que el pico correspondiente a sacarosa fue detectado en un tiempo muy similar al de la muestra modelo, además de que tomando en cuenta el tiempo en el que aparecía el panelista logró percibirlo de manera correcta a la salida del efluente cromatográfico lo que confirmó que el pico era el correspondiente a sacarosa, teniendo una apariencia definida. Puede observarse también que la señal del pico es muy similar a la muestra modelo, retrasándose un poco el tiempo el que se retiene el compuesto en el caso de la matriz real se retuvo alrededor del minuto 4 y en la muestra modelo alrededor del minuto 1.20, esto puede deberse a que al haber otros compuestos a los que favorezcan las mismas condiciones el compuesto sale un poco retrasado de la columna cromatográfica (Figura 24).

Bebida 2

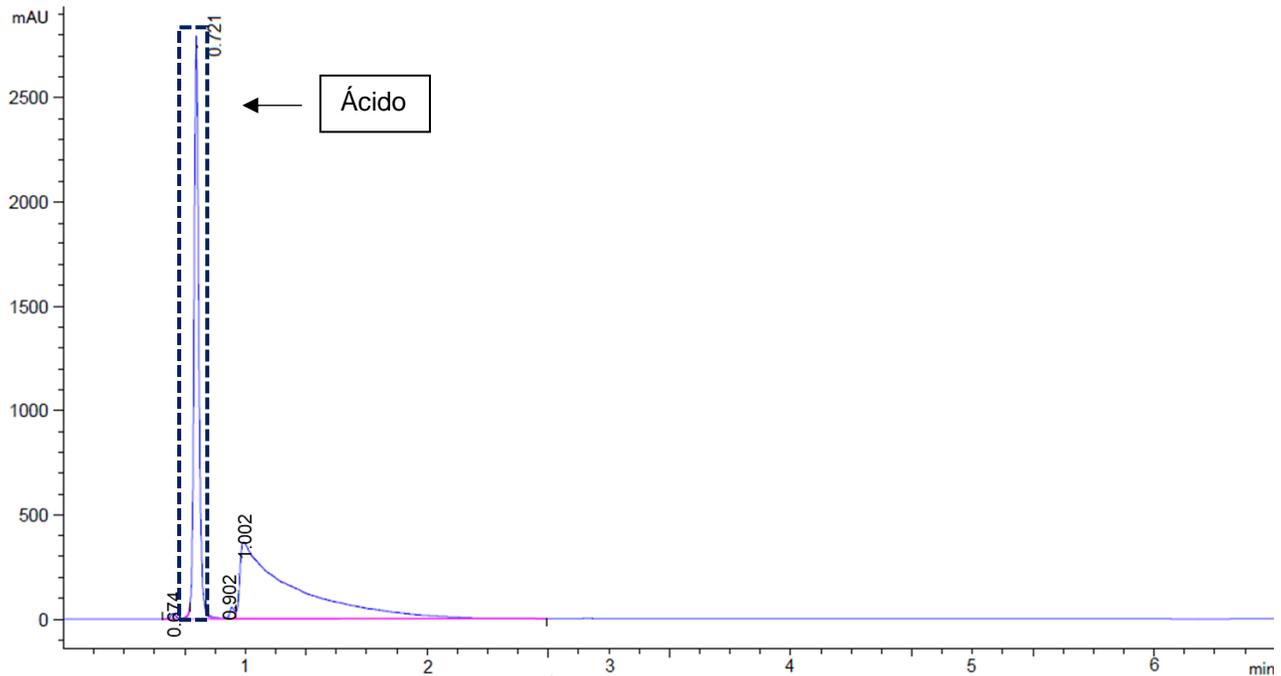


Figura 25. Cromatograma perteneciente al sabor ácido (Ácido cítrico).

Al igual que en la bebida uno, la detección del ácido cítrico comparada con los resultados obtenidos en el acondicionamiento cromatográfico de las soluciones modelo se observó que el pico correspondiente a ácido cítrico fue detectado en un tiempo muy similar al de la muestra modelo, así como también similar al de la bebida uno, el panelista logró detectarlo sin mayor problema, teniendo una apariencia alargada y muy definida, incluso teniendo una señal más alta que la bebida uno que tuvo una señal de 1750 mientras la bebida 2 tuvo una señal de 2850 aproximadamente, lo cual indica, ya que la anchura del pico es muy similar, que el área del pico correspondiente a la bebida uno es poco mayor, lo que señala una posible mayor cantidad de ácido cítrico en la bebida (Figura 25).

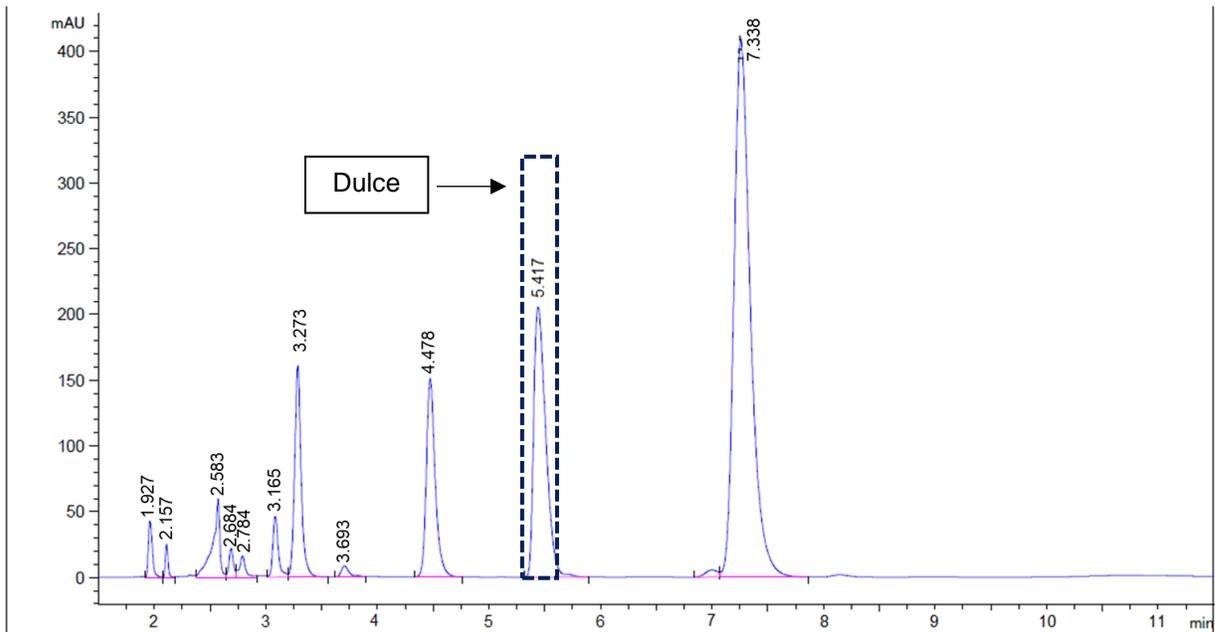


Figura 26. Cromatograma perteneciente al sabor dulce (Acesulfame K).

En la detección de acesulfame K correspondiente a la bebida 2 comparada con los resultados obtenidos en el acondicionamiento cromatográfico de las soluciones modelo se observó que el pico correspondiente a acesulfame K fue detectado en un tiempo muy similar al de la muestra modelo, así como también similar al de la bebida uno, el panelista logró detectarlo sin mayor problema, teniendo una apariencia muy definida, teniendo una señal muy similar a la bebida uno, lo cual indica, ya que la anchura del pico es muy similar, una posible cantidad muy parecida de acesulfame K en ambas bebidas (Figura 26).

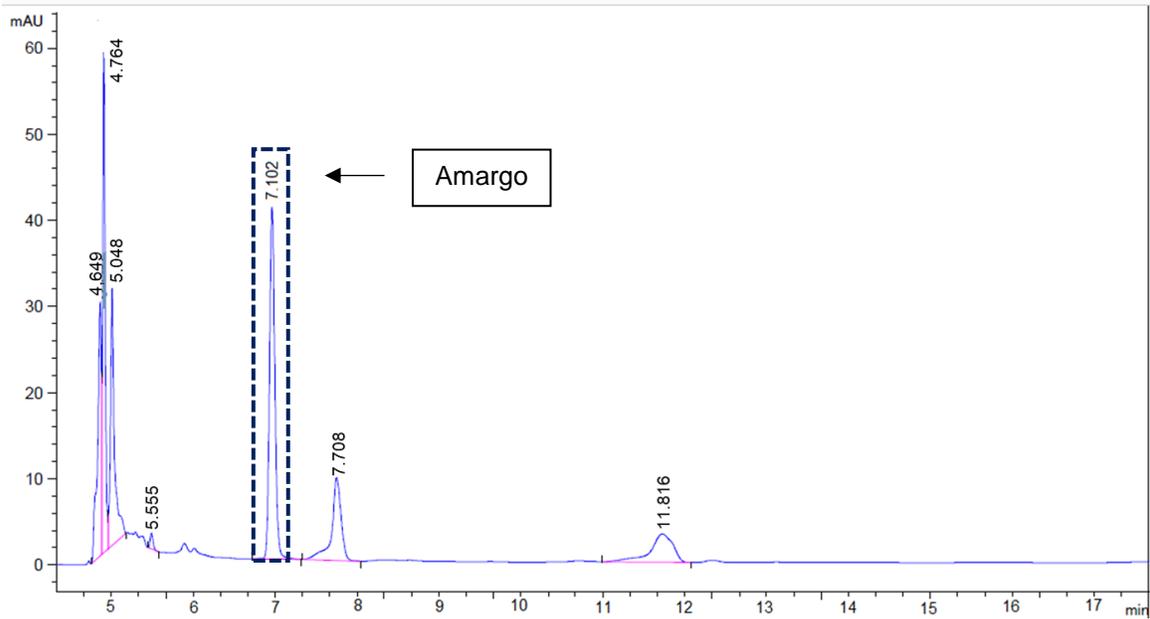


Figura 27. Cromatograma perteneciente al sabor amargo (Cafeína).

En la detección de cafeína correspondiente a la bebida 2 comparada con los resultados obtenidos en el acondicionamiento cromatográfico de las soluciones modelo se observó que el pico correspondiente a cafeína fue detectado en un tiempo muy similar al de la muestra modelo, así como también similar al de la bebida uno, el panelista logró detectarlo sin problema, teniendo una apariencia muy definida, teniendo una señal más alta a la bebida 2, lo cual indica, ya que la anchura del pico es muy similar, indicaría una posible cantidad un poco menor de cafeína en la bebida dos (Figura 27).

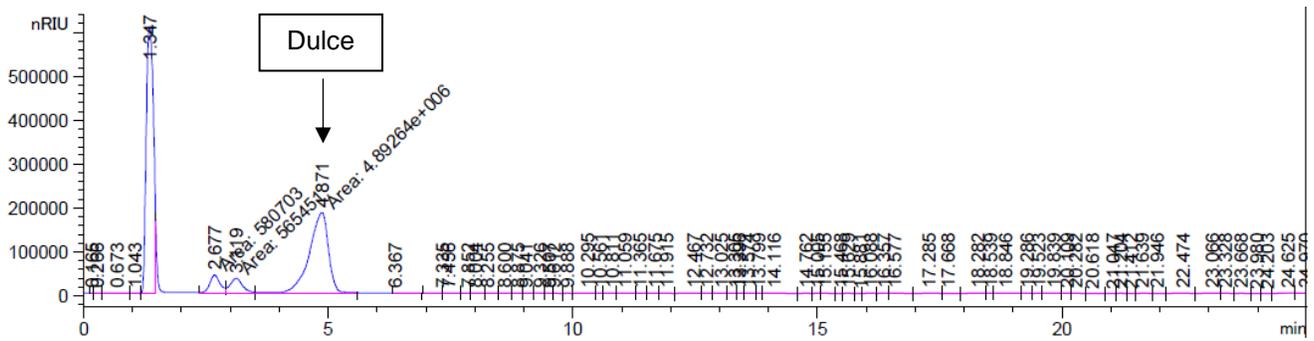


Figura 28. Cromatograma perteneciente al sabor Dulce (Sacarosa).

En el caso de la detección de sacarosa correspondiente a la bebida 2 comparada con los resultados obtenidos en el acondicionamiento cromatográfico de las soluciones modelo se observó que el pico correspondiente a sacarosa fue detectado en un tiempo muy similar al de la muestra modelo, así como también similar al de la bebida uno, el panelista logró detectarlo correctamente, teniendo una apariencia definida, teniendo una señal similar a la bebida uno, lo cual indica, ya que la anchura del pico es muy similar, indicaría una posible cantidad parecida de sacarosa en ambas bebidas (Figura 28).

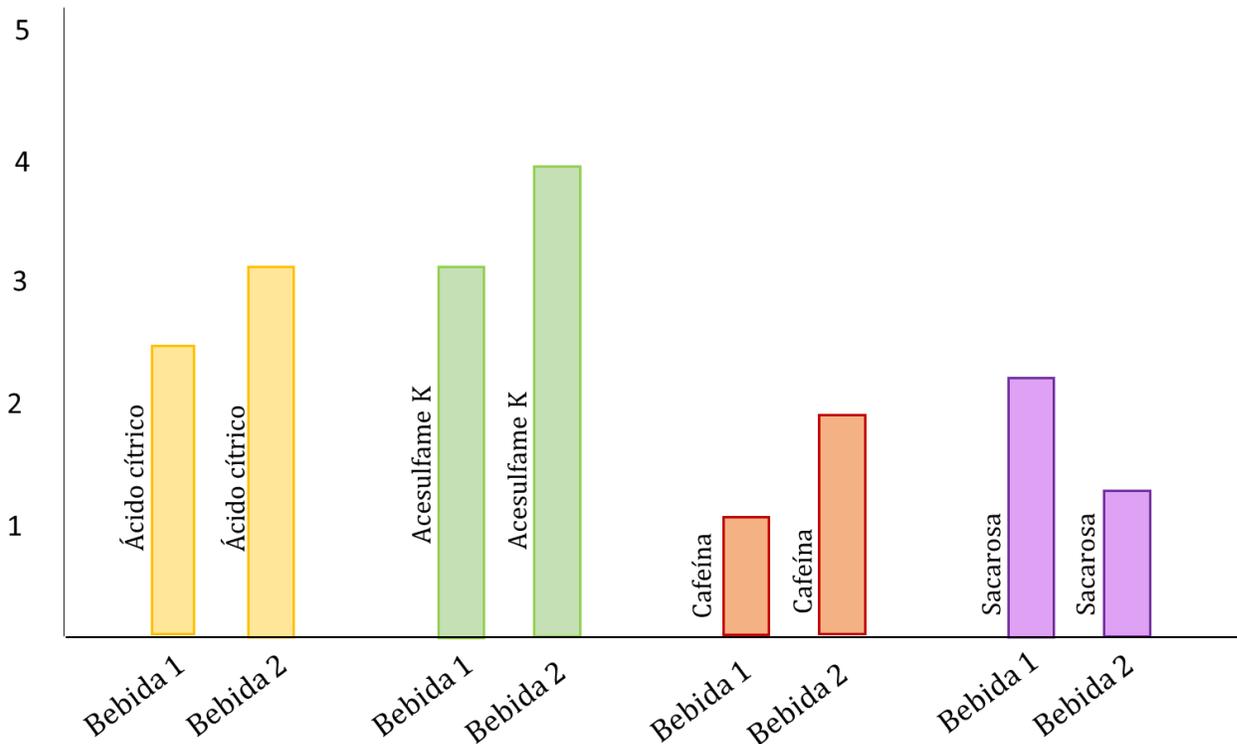


Figura 29. Diferencia en la intensidad de percepción en cada sabor por los panelistas.

Ambos panelistas fueron capaces de detectar el sabor una vez colectada la fracción de acuerdo con el pico cromatográfico sin ningún tipo de dificultad.

Es importante mencionar que, aunque se evaluaron todos los sabores en cada una de las bebidas, solo se tomaron en cuenta aquellas que estuvieron presentes, lo cual era predecible desde el análisis de la etiqueta y que en efecto tuvieron una mejor resolución, por lo que los sabores fueron: ácido cítrico, acesulfame K, sacarosa y cafeína.

Posteriormente se realizó la evaluación en la diferencia de percepción de intensidad utilizando una escala del 1-5 en nivel de intensidad, donde se notó una diferencia significativa en cada uno de los sabores, predominando una mayor intensidad en la bebida dos en lo que fue el análisis de los sabores ácido, acesulfame K y cafeína, diferenciándose únicamente en la evaluación de sacarosa, donde ésta tuvo una mayor intensidad de percepción en la bebida uno.

Es la primera vez que se realiza este tipo de evaluación sensorial bajo esta metodología y sus condiciones, por lo que no hay parámetro para comparar, sin embargo, se espera que en el futuro el camino de esta investigación siga y pueda servir de apoyo a análisis posteriores.

A manera complementaria una vez obtenidos los resultados de la implementación de la metodología de cromatografía de líquidos con detección sensorial simultánea, se obtuvo un perfil aromático de cada una de las bebidas mediante cromatografía de gases con detector de masas, lo cual se realizó con la finalidad de conocer los compuestos presentes en las mismas. El perfil aromático se obtuvo tomando en cuenta un match de 70% así como un empalmamiento de los mismos, para determinar la coincidencia de los compuestos de una bebida respecto a la otra. Los compuestos encontrados se muestran en la Tabla

Tabla 16. Perfil aromático de las bebidas 7up y Sprite. Datos depurados con un match de 70%.

NOMBRE	# DE CAS	ID_SEVEN_UP	ID_SPRITE	Nota aromática	Umbral de detección
Hexano	000110-54-3	362125	1935431	Gasolina	130 ppm
Glicina, N-(ditiocarboxi)-N-metil-	040520-03-4	2348181	0		
Benzeno	000071-43-2	93458535	9732176	Gasolina	4.68 ppm
1S-.alfa.-Pino	007785-26-4	9946425	0	Alcanfor fresco dulce pino terroso leñoso	2100 ppb
Ácido butanoico, etil ester	000105-54-4	9062510	0	Piña	0.001 ppm
Biciclo[2.2.1]heptano, 7,7-dimethyl-2-methylene-	000471-84-1	7252438	4571210	Alcanfor Cítrico Menta verde	500 ppb
Camfene	000079-92-5	21092115	13124346	Maderoso alcanfor	n/a
Biciclo[3.1.0]hex-2-eno, 2-metil-5-(1-metiletil)-	002867-05-2	41954679	24260593	Maderoso Verde herbal	n/a
Ciclohexano, 1-metileno-4-(1-metiletenil)-	000499-97-8	4857612	0	n/a	n/a
.beta.-Pino	000127-91-3	242076968	0	Seco Maderoso resina	140 ppm
(+)-4-Careno	029050-33-7	114941720	0	Dulce pungente	n/a
D-Limoneno	005989-27-5	5328137750	4259387472	Limón	229 ppb
Biciclo[3.1.0]hex-2-eno, 4-metil-1-(1-metiletil)-	028634-89-1	92952458	278093961		
Eucaliptol	000470-82-6	42408774	230499285	Dulce Cremoso	1.0% in ethanol

				Clavo de olor Vainilla	
2,6-Dimetil-1,3,5,7-octatetraeno,E,E-	000460-01-5	38925052	0	n/a	n/a
1,4-Ciclohexadieno, 1-metil-4-(1-metiletil)-	000099-85-4	561993151	176043586	Lima tropical Agridulce	200 ppb
1,3,6-Octatrieno, 3,7-dimetil-, (Z)-	003338-55-4	92204219	71890491	Herbáceo cálido	n/a
Benzeno, 1-metil-2-(1-metiletil)-	000527-84-4	1560176895	1102870307	Cítrico Limón	n/a
Ciclohexano, 1-metil-4-(1-metiletilideno)-	000586-62-9	191210438	260333188	Pino dulce Limón viejo	1%
1,4-Hexadieno 5-metil-3-(1-metiletilideno)-	113687-24-4	10455155	0		
Ácido acético, hexil ester	000142-92-7	13621228	0	Frutal Manzana Cereza Pera Floral	480 ppb
Octanal	000124-13-0	1310263246	1212069106	Cítrico miel	6.4 ppb
5-Hepten-2-ona, 6-metil-	000110-93-0	27687818	0	Verde cítrico	50 ppb
Nonanal	000124-19-6	659371810	970457154	Naranja Rosa	8 ppb
Benzofuran, 2,3-dihidro-2-metil-	001746-11-8	35560327	0	n/a	n/a
Benzeno, 1-metil-4-(1-metiletenil)-	001195-32-0	128322281	362309188	Limón cítrico	n/a
1-Heptanol	000111-70-6	2722771	0	Maderoso Aceitoso Aromático pungente	3 ppb
Ácido acético	000064-19-7	17387320	0	Vinagre Ácido pungente	1.0%

Furfural	000098-01-1	138928259	392634789	Aldehídos cíclicos	8 ppm
Ácido acético, octil ester	000112-14-1	106955103	64823723	Frutal	47 ppb
Benzaldeido	000100-52-7	55089377	132539575	Almendra amarga	100 ppb- 4.6 ppm
Ciclohexeno, 1-metil-3-(formilmetil)-	129993-40-4	5836441	0	n/a	n/a
1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimetil-	000078-70-6	509660776	810654478	Floral	4-10 ppb
1-Octanol	000111-87-5	178960875	285095035	Fresco Naranja- rosa	42-480 ppb
Biciclo[2.2.1]heptan-2-ol, 1,7,7-trimetil-, acetato, (1S- endo)-	005655-61-8	73124438	143707271	Dulce herbal	Fuerza media tipo balsámico
3-Ciclohexen-1-ol, 1-metil-4-(1-metiletil)-	000586-82-3	53625024	0	Seco Maderoso rancio	n/a
Biciclo[2.2.1]heptan-2-ol, 1,3,3-trimetil-	001632-73-1	176496628	0	Dulce templado	n/a
3-Ciclohexen-1-ol, 4-metil-1-(1-metiletil)-, (R)-	020126-76-5	588492050	962607873	n/a	n/a
Dodecanal	000112-54-9	74961964	0	Aceitoso	0.5-1.5 ppb
Ciclohexanona, 2-metil-5-(1-metiletenil)-, trans-	005948-04-9	31793239	0	Herbal	n/a
7-Octen-2-ol, 2-metil-6-metilene	000543-39-5	17942244	0	Floral Lavanda Cítrico	n/a
Ciclohexanol, 1-metil-4-(1-metiletenil)-	000138-87-4	133929064	365057653	Pungente Maderoso- terroso	n/a
2,6-Octadieno, 2,6-dimetil-	002792-39-4	244961504	0	n/a	n/a
2,6-Octadienal, 3,7-dimetil-, (Z)	000106-26-3	466476890	0	n/a	n/a
3-Ciclohexene-1-metanol, .alfa.,.alfa.4-trimetil-	000098-55-5	1666335391	4233113824	Lilas	280-350 ppb
2-Metilbiciclo[4.3.0]non-1(6)-eno	060223-07-6	63984270	0	n/a	n/a
2-Ciclohexen-1-ona, 2-metil-5-(1-metiletenil)-, (S)-	002244-16-8	167751715	0	n/a	n/a

2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimetil-,(Z)-	000106-25-2	1729400188	64407125	Fresco Dulce rosas	680 ppb- 2.2 ppm
2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimetil-,acetato, (Z)-	000141-12-8	611902195	1088866036	Dulce Floral naranja	2-8.5 ppm
1,3-Ciclohexadieno, 1-metil-4-(1-metiletil)-	000099-86-5	36007617	0	Maderoso limón	10%
1,3-Ciclohexadieno, 1-metil-4-(1-metiletil)-	000099-86-5	36007617	0	Maderoso limón	10%
2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimetil-,acetato, (E)-	000105-87-3	1815352469	699818102	Floral	9-460 ppb
Ciclodecano	000293-96-9	292755504	0		
Oxime-, metoxi-fenil-	1000222-86-6	538049906	0		
Ácido propanoico, 2-metil-, 3,7-dimetil-2,6-octadienil ester, (E)-	002345-26-8	12915014	20162405	Ligero olor a rosas	13 ppb
2-Ciclohexen-1-ol, 2-metil-5-(1-metiletenil)-, cis-	001197-06-4	11290726	8034965		
2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimetil-,(E)-	000106-24-1	93572464	121696103	Rosas	4-75 ppb
2-Ciclohexen-1-ol, 2-metil-5-(1-metiletenil)-, trans-	001197-07-5	18010863	0		
Ciclopropano, octil-	001472-09-9	29793564	0		
Ácido butanóico, 3,7-dimetil-2,6-octadienil ester, (E)-	000106-29-6	39357543	0	Fresco Frutal rosa	n/a
Cinnamaldehido, (E)-	014371-10-9	159972283	453500697		
Nerolidol 2	1000285-43-6	18928830	0		
2-Ácido propenoico, 3-fenil-, metil ester, (E)-	001754-62-7	60543915	0		
Ácido octanoico	000124-07-2	43087772	0	Ligeramente desagradable Quemado frutal	10 ppm
Ácido nonanoico	000112-05-0	269208630	283084411	Grasoso	3-9 ppm

Ácido nonanoico	000112-05-0	269208630	283084411	Grasoso	3-9 ppm
n-Ácido decanoico	000334-48-5	64263785	63851923	Grasoso rancio	n/a
Ácido benzoico, 4-[3-(3,4-dimetoxifenil)acriloilamino]-, pentil ester	1000317-25-8	72121004	0		
Ácido undecanoico	000112-37-8	4195845	7676601	Grasoso aldehico	10 ppb
Ácido benzoico	000065-85-0	2324029608	3190584515	Orina almendra	85 ppm
Ácido ftálico, hex-2-in-4-il isobutil ester	1000315-19-9	9854492	9908133		
Vainillin	000121-33-5	6926238	15683395	Vainilla	n/a
Ácido ftálico, hex-2-in-4-il hexilester	1000315-19-3	12503724	0		
15-Corona-5	033100-27-5	=	0		
1,3-Cicloheptadieno	004054-38-0	0	5839601		
3-Careno	013466-78-9	0	1813094	Dulce pungente	n/a
1,3,6-Heptatrieno, 2,5,5-trimetil	029548-02-5	0	11326950		
Biciclo[4.1.0]hept-2-eno, 3,7,7-trimetil-	000554-61-0	0	103650296		
7-Oxabicyclo[2.2.1]heptano, 1-metil-4-(1-metiletil)-	000470-67-7	0	95902569	Canela intensa	50-750 ppb
1,3,8-p-Mentatrieno	021195-59-5	0	69111340		
Benzeno, 1,4-dietil-	000105-05-5	0	104996759		
Ácido butanoico, 3-metilbutil ester	000106-27-4	0	41011708	Frutal Piña plátano	n/a
Benzeno, 1-metil-4-(1-metiletil)-	000099-87-6	0	26260580	Citroso	1% EtoH
2,4,6-Octatrieno, 2,6-dimetil-, (E,Z)-	007216-56-0	0	3919492		
Ciclobuteno, bis(1-metiletilideno)-	003642-14-6	0	21651664		
cis-Linaloloxido	1000121-97-4	0	18558100		
Decanal	000112-31-2	0	2105791200	Dulce Ceroso Floral	0.1-6 ppb

				cítrico	
Biciclo[3.1.1]heptan-3-ona, (1.alfa.,2.alfa.,5.alfa.)-	2,6,6-trimethyl-, 000547-60-4	0	47749125		
Fenchol, exo-	022627-95-8	0	296379968		
Tridecanal	010486-19-8	0	152209768	Fresco Limpio Jabonoso Cítrico pétalos Cáscara de uva	1%
1,5,5-Trimetil-6-metileno-ciclohexeno	000514-95-4	0	66760614		

Borneol	010385-78-1	0	73061529		
Ciclopropano, nonil-	074663-85-7	0	200338727		
cis-.beta.-Terpineol	007299-40-3	0	120001155		
2-Ciclohexen-1-ona, 2-metil-5-(1-metiletenil)-, (R)-	006485-40-1	0	86444460		
Ciclohexeno, 1-metil-3-(1-metiletenil)-, (+/-)-	000499-03-6	0	38393656		
Etanona, 1-(4-metilfenil)-	000122-00-9	0	169326747	Frutal floral	n/a
Ciclooctano	000292-64-8	0	175077259		
1-Ciclohexeno-1-carboxaldehido, 4-(1-metiletenil)-	002111-75-3	0	342026494	Grasoso Especiado Aceitoso herbaceo	30-62 ppb
2,4-Decadienal	002363-88-4	0	15864280	Aceitoso Grasa de pollo naranja	0.07-10 ppb
1-Undecanol	000112-42-5	0	15448682	Floral Cítrico	n/a
Benzil Alcohol	000100-51-6	0	15667064	Frutal Pungente	1.2-1000 ppb
2-Propenal, 3-fenil-	000104-55-2	0	4862624	Canela	50-750 ppb
Feniletil Alcohol	000060-12-8	0	29079005	Rosas	0.015 ppb-3.5 ppm
4H-Piran-4-ona, 2-etil-3-hidroxi-	004940-11-8	0	14398473	Frutal	n/a
2-Ácido propenoico, 3-fenil-, metil ester	000103-26-4	0	149227488	Frutal Balsámico	n/a
Timol	000089-83-8	0	3889982	Herbáceo	86-790 ppb
Ciclotetradecano	000295-17-0	0	5149318		
Ácido ftálico, isobutil tridec-2-in-1-il ester	1000315-44-3	0	12272771		
(Z)-Ácido cinámico	000102-94-3	0	7586150		
2-Butanona, 4-(4-hidroxifenil)-	005471-51-2	0	3392766	Frutal Frambuesa	n/a

2-Butanona, 4-(4-hidroxifenil)-	005471-51-2	0	3392766	Frutal Frambuesa	n/a
---------------------------------	-------------	---	---------	---------------------	-----

El perfil aromático reveló los compuestos de aroma en cada una de las bebidas, teniendo sus variaciones como era de esperarse. Dichas variaciones dan la pauta del por qué se prefiere una bebida por sobre la otra por el consumidor y la correlación existente entre los compuestos de aroma y los compuestos de hidrosolubles, ya que, al ocurrir una sinergia entre ambos tipos de compuestos, así como la percepción del aroma al ingerir la bebida se lleva a cabo el redondeo completo del sabor, determinando el sabor final y la percepción completa. En la Figura 30 se muestra a manera ilustrativa la preferencia a nivel mundial de una bebida contra la otra de acuerdo a una evaluación realizada por CNN New York de este año. Siendo Sprite la más preferida de manera general.



REPORTE GLOBAL DE INTERÉS

7x Mayor Interés

En 7u, en los Estados Unidos

9x Mayor interés

En Sprite Globalmente



Figura 30. Preferencia a nivel mundial entre las marcas Sprite y 7up. (CNNMoney (New York) Primera publicación 20, 2018)

CAPÍTULO 7



Conclusiones

Se logró implementar la metodología de HPLC DSS en una bebida carbonatada así como la comparación con una bebida homóloga, siendo capaces de identificar los compuestos de sabor hidrosoluble presentes, así como la diferencia en la percepción de estos, cumpliéndose de esta manera la hipótesis del proyecto.

Con el desarrollo del perfil aromático se logró determinar que, gracias a la sinergia de los compuestos de aroma contra los compuestos de sabor, los compuestos responsables de aromas dulces o cítricos en sinergia con los edulcorantes se logra una percepción más agradable en el redondeo del sabor, lo cual explica la preferencia de una bebida con respecto a la otra.

Dicha correlación demuestra la importancia de conocer el perfil completo del sabor de un alimento, es decir conocer su composición química, así como las cualidades sensoriales de los compuestos químicos que la conforman. El conocer esta información nos permitirá realizar aplicaciones futuras al sabor en cuestión de ser necesario o requerido, tales como mejora del mismo, duplicación, revisiones de calidad, etc.

CAPÍTULO 8



Referencias Bibliográficas

- Delwiche, J. F., & Warnock, A. R. (2008). Perception and acceptance of sweeteners. *ACS Symposium Series*, 979, 285–295. <https://doi.org/10.1021/bk-2008-0979.ch019>
- Hohl, K., Schonberger, G., & Busch-Stock, M. (2014). Stimulus and recognition thresholds for the basic tastes in deionized water: Are the recommendations for citric acid too high? *Ernahrungs Umschau*, 61(8), 130–136. <https://doi.org/10.4455/eu.2014.023>
- Hortencia Chávez Oseki, V. Javier Vega Galina, Diana Sierra Arango, S. R. F., & Miramontes, Y. H. (n.d.). Fisiología del gusto, 625–631.
- Kelebek, H., Selli, S., Canbas, A., & Cabaroglu, T. (2009). HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan. *Microchemical Journal*, 91(2), 187–192. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2008.10.008>
- Ky, C. L., Louarn, J., Dussert, S., Guyot, B., Hamon, S., & Noiro, M. (2001). Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. *Food Chemistry*, 75(2), 223–230. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00204-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00204-7)
- Lateef, M., Siddiqui, K., Saleem, M., & Iqbal, L. (2012). Estimation of Monosodium Glutamate by Modified HPLC Method in Various Pakistani Spices Formula. *J.Chem.Soc.Pak*, 34(1), 39–42.
- Li, X., Simmons, R., & Mwongela, S. M. (2017). Two-Stage Course-Embedded Determination of Caffeine and Related Compounds by HPLC in Caffeine Containing Food, Beverages and (or) Related Products. *Journal of Laboratory Chemical Education*, 5(2), 19–25. <https://doi.org/10.5923/j.jlce.20170502.02>
- Loescher, C. M., Morton, D. W., Razic, S., & Agatonovic-Kustrin, S. (2014). High performance thin layer chromatography (HPTLC) and high performance liquid chromatography (HPLC) for the qualitative and quantitative analysis of *Calendula officinalis*-Advantages and limitations. *Journal*

of *Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 98, 52–59.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.04.023>

- Pedrero, D., & Pangborn, R. M. (1989). *Evaluación Sensorial de los Alimentos: Métodos Analíticos*.
- Reichelt, K. V., Peter, R., Roloff, M., Ley, J. P., Krammer, G. E., Swanepoel, K. M., & Engel, K. H. (2010). LC Taste® as a tool for the identification of taste modulating compounds from traditional African teas. *ACS Symposium Series*, 1036, 61–74. <https://doi.org/10.1021/bk-2010-1036.ch005>
- Reichelt, K. V., Peter, R., Roloff, M., Ley, J. P., Krammer, G. E., & Engel, K. H. (2008). LC Taste® as a novel tool for the identification of flavour modifying compounds. *Proceedings of the 12th Weurman Symposium; Expression of Multidisciplinary Flavour Science*, 1(Figure 1), 397–401.
- Reineccius, G. (2005). *Flavor Chemistry and Technology*. (T. & F. Group, Ed.), Darwin (Segunda). Boca Raton. <https://doi.org/10.1093/isle/ist137>

