

LOS RETOS DE ANALIZAR Y COMPRENDER EL AROMA DE LOS ALIMENTOS

Vicente Ferreira González

Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza
50009 Zaragoza

1.- El aroma como objetivo analítico

Desde una perspectiva química, el aroma de un alimento está formado por la fracción de sus moléculas constituyentes directamente responsable del conjunto de percepciones olfativas asociadas a la degustación de dicho alimento.

En la mayor parte de los casos, dicha fracción es cuantitativamente minúscula e integra una mínima proporción de los componentes del alimento. Los aromas más complejos están integrados por varias decenas de moléculas odorantes, lo que implica que la proporción de moléculas aromáticamente relevantes en cualquier producto es muy inferior al 0,1% de sus moléculas constituyentes.

Por otro lado, todas las moléculas relevantes desde el punto de vista aromático han de ser volátiles, ya que los receptores olfativos en los animales terrestres sólo son accesibles vía aérea. Pero no todas las moléculas volátiles del alimento forman el aroma, sino tan solo aquellas que se encuentren en concentración suficiente para poder interaccionar con los receptores olfativos emitiendo una señal.

En este respecto, el problema es que existe una gran diversidad entre las capacidades de las distintas moléculas volátiles para activar los receptores olfativos. Dicha diversidad es intrínseca al hecho de que el sentido del olfato es el resultado de la co-evolución de animales, plantas y microorganismos. En el transcurso de la evolución se han ido generando receptores olfativos capaces de producir señales muy potentes para cantidades ínfimas de algunos grupos selectos de odorantes y, concurrentemente y siguiendo patrones dirigidos por el azar, los seres vivos han ido generando moléculas orgánicas con capacidades mejoradas de interaccionar con algunos receptores olfativos. El resultado es que hay varios grupos selectos de moléculas capaces de producir respuestas olfativas a niveles de concentración ínfimos. A la concentración más baja de una molécula odorante que puede ser detectada, bien en aire, agua o en otro sistema, se le conoce como umbral de olfacción.

El caso más extremo está formado por un conjunto de moléculas que combinan una función mercapto con un segundo grupo funcional o con una estructura aromática. Se trata de los mercaptanos polifuncionales, como el 4-metoxi-2-metil-2-butanotiol (grosella negra, pis de gato), la 4-metil-4-

mercapto-2-pentanona (boj, pis de gato), el 2-furfuriltiol (café), o el 3-metil-3-mercaptohexanol (sudor humano). Son moléculas producidas tanto por plantas (fruta de la pasión, boj, uvas, lúpulos) como por animales (gatos, humanos) o por procesado térmicos (café). Nuestro sentido del olfato es capaz de detectar estas moléculas en concentraciones en el aire inferiores al 0,1 ng/m³. Teniendo en cuenta los volúmenes de aire inhalados durante la olfacción y las fracciones de los mismos que son conducidas hacia el epitelio olfatorio, es posible estimar que la mínima masa detectable está en el orden del femtogramo. Trasladado a concentraciones en agua, y en función de la hidrofobicidad y volatilidad de las moléculas, es posible alcanzar valores umbral cercanos al 0,1 ng/L (ppt).

Otros conjuntos de moléculas orgánicas con umbrales de olfacción extremadamente bajos son algunos cloroanisoles y clorofenoles (2,4,6-tricloroanisol o TCA, 2,4,6-tribromoanisol o TBA), que son las moléculas implicadas en olores a corcho o a humedad, junto con la geosmina y el 2-metilisoborneol que son terpenoides. Otras moléculas de aroma muy intenso son los alquenes, alquenas y alquenediales, como el E-2-nonenal (pepino, aceite rancio), la 1-octen-3-ona (champiñón, metálico) o el (E,E)-2,4-decadienal (pepino, melón), generados todos ellos a partir de la peroxidación de ácidos grasos por vía química o enzimática.

Por supuesto, junto a estos grupos selectos de moléculas con masas mínimas detectables inferiores al pg y valores umbrales inferiores al 0,1 ug/L (ppb), nos encontraremos con todo tipo de situaciones hasta llegar a algunas moléculas como el metanol o el hexano, que tan solo son detectadas en concentraciones en aire superiores al g/m³ y cuyos valores umbral pueden superar los g/L. Por tanto, la selectividad analítica de nuestro sistema olfativo supera los 10 órdenes de magnitud.

El otro aspecto relevante para poder definir de manera clara el problema analítico asociado al análisis del aroma, es que la percepción olfativa no es un proceso de detección de moléculas individuales, sino un proceso de reconocimiento de patrones o perfiles cuantitativos. Esto es, aunque las moléculas individuales tienen un olor asociado, la mayor parte de los olores que nos son familiares y que nuestro cerebro emplea como referencias, están constituidos por combinaciones de odorantes en cierta proporción. La consecuencia práctica de este hecho es

que muy a menudo no basta con el análisis de las una o dos moléculas olfativamente más potentes para comprender el aroma de un producto. Esto solo ocurre en los casos en los que el análisis del aroma va dirigido al control de compuestos responsables de malos olores o de desviaciones aromáticas, o en aquellos otros casos en los que el aroma del producto viene muy dominado por una única molécula, como ocurre con la vainilla (vainillina) y con el anís (anisaldehído). Dejando de lado estos casos, para poder interpretar adecuadamente el aroma de un producto necesitamos cuantificar todas las moléculas aromáticamente relevantes del mismo.

Dado que ni los valores umbral representan bien la sensibilidad olfativa en todos los contextos químicos, ni son conocidos con precisión, y dado además que en ocasiones hay fenómenos cooperativos entre odorantes, en el grupo de moléculas relevantes de un producto necesitamos incluir a priori todas las moléculas que estén presentes en el producto en concentraciones no muy inferiores a los correspondientes valores umbral de olfacción. Un valor prudente es considerar como potencialmente relevantes todas las moléculas presentes en concentraciones superiores a 1/10 de su valor de olfacción.

De toda la discusión anterior emergen los dos grandes retos analíticos que debe satisfacer el análisis del aroma:

1. Tener la seguridad de que todas las moléculas potencialmente más relevantes en el aroma del producto han sido convenientemente identificadas antes de proceder al análisis cuantitativo. Para ello se ha de plantear una estrategia de screening químico dirigido olfativamente.
2. Desarrollar estrategias cuantitativas que permitan medir entre 10 y 100 moléculas volátiles, según la complejidad del producto, presentes en rangos de concentración que pueden estar comprendidos entre la sub-ppt y el g/L.

2.- La operación de screening químico dirigido olfativamente

La única manera efectiva de cribar, de entre las decenas de miles componentes volátiles de un producto, aquéllos con más posibilidad de ser aromáticamente relevantes es mediante la cromatografía gas con detección en paralelo por olfatometría. A esta técnica la denominamos GC-O. El objetivo de esta operación de screening no es otro que el de jerarquizar las moléculas volátiles de un producto de acuerdo a su importancia aromática potencial.

La manera más efectiva de realizar esta jerarquización requiere trabajar sobre un extracto o fracción de producto cuya composición refleje de manera precisa la composición de las fases vapor que pueden emanar del alimento cuando lo olemos, o cuando lo consumimos. El problema es que obtener una fracción suficientemente concentrada de dichas características no es sencillo en la actualidad, y todavía era más complicado hace algunos años por limitaciones de la instrumentación. Por ello, la práctica más común hasta el momento presente, realiza el estudio olfatométrico sobre un extracto "total" obtenido por extracciones consecutivas con disolventes orgánicos o por algún otro método de stripping. Dicho extracto contiene idealmente el 100% de todos los componentes volátiles del producto, con la excepción de aquellos más polares o más volátiles, y puede concentrarse por evaporación del disolvente, de manera que puede alcanzar fácilmente factores de concentración superiores a 10000 en productos no excesivamente ricos en materia grasa. En muchos casos será preceptivo incluir una etapa de eliminación del material no volátil mediante evaporación a vacío o mediante alguna técnica de clean-up. El dispositivo que ha mostrado mayor efectividad se denomina SAFE (solvent assisted flavor evaporation).

Una vez que se dispone de un extracto conteniendo todos los volátiles del producto y libre de material no volátil, éste es inyectado en el sistema GC-O. Típicamente se van inyectando diluciones progresivas entre 1:2 y 1:5 del extracto, de manera que se va reduciendo el número de olores percibidos. El estudio prosigue hasta que sólo se perciben uno o dos odorantes. Esta forma de proceder se denomina AEDA (aroma extract dilution analysis) y permite jerarquizar los odorantes presentes en dicho extracto de acuerdo con su potencia aromática, medida a partir del factor de dilución.

El problema de esta forma de proceder es que la jerarquía de aromas que se obtiene está fuertemente sesgada. En el producto original, las moléculas aromáticas pasan a las fases vapor durante la olfacción o el consumo del alimento, en función de sus volatilidades intrínsecas y de las interacciones que establecen con los elementos de la matriz alimentaria. Moléculas muy polares son muy pobremente transferidas desde productos acuosos, por ejemplo. Por el contrario, en la estrategia del extracto total y AEDA, todas las moléculas han sido extraídas y son después vaporizadas sin distinción, por lo que las moléculas más retenidas en la matriz del alimento original son fuertemente sobre-estimadas en los experimentos de este tipo.

Para corregir este efecto, se ha de calcular la concentración normalizada por el valor umbral de todas las moléculas detectadas en el experimento AEDA, lo que puede llevar asociado un fuerte esfuerzo

tanto en la identificación de los odorantes detectados como en su cuantificación. No deja de ser paradójico que se emplee una técnica de screening cuya finalidad es focalizar nuestra atención en las moléculas más relevantes, que obligue en realidad a cuantificar todas las moléculas detectadas, independientemente del valor jerárquico alcanzado.

Como se ha dicho, la alternativa es realizar el experimento olfatométrico sobre fracciones derivadas del espacio de cabeza del producto. Desde luego, la alternativa técnicamente más sencilla es el muestreo SPME del espacio de cabeza. Su sencillez y potencia lo hacen muy atractivo, pero en el análisis de muestras complejas conteniendo mucho material volátil, debe tenerse en cuenta que es casi imposible no trabajar en condiciones de saturación de la fibra. Esto hace que la extracción sea muy dependiente de la composición matricial, lo que debe tenerse en cuenta si el propósito del experimento es comparar entre muestras diferentes. Estos problemas son de menor intensidad en las versiones más recientes de la SPME, como el sistema SPME-arrow.

La mejor alternativa sobre el papel, es la constituida por las estrategias de purga y trampa. Por una parte, los procesos de purga de los espacios de cabeza con caudales altos de gas generan fases volátiles cuya composición se asemeja más a las que se obtienen durante la olfación normal, y que difieren en gran medida de las composiciones obtenidas en sistemas en equilibrio o pseudoequilibrio, como es la SPME. Por otra parte, en los últimos años se han producido mejoras muy significativas en la instrumentación de desorción térmica. Los avances incluyen en algunos sistemas la posibilidad de realizar inyecciones replicadas de un mismo trap. Esto se consigue mediante un sistema de Split y una segunda trampa interna, y permitiría realizar todo el experimento olfatométrico con la fracción de volátiles atrapada en una única trampa.

Finalmente, si el extracto sobre el que se realiza la operación olfatométrica es realmente representativo de las fracciones vapor emanadas por el producto, merece emplear una estrategia de jerarquización olfatométrica más consistente con las reglas de la olfación de lo que lo son las técnicas de dilución como el AEDA. Las técnicas de dilución tienen dos problemas. El primero es que el parámetro que realmente determina la importancia de un odorante en una mezcla es su intensidad y no el factor de dilución necesario para alcanzar el umbral (lo que se denomina FD o potencia aromática). Además, la relación entre la intensidad olfativa y la concentración de odorante varía mucho según la naturaleza de éste. En concreto, dicha relación sigue la función potencial indicada por la expresión:

$$I_x = cte \cdot \left(\frac{C_x}{u_x}\right)^n$$

denominada ley de Stevens, en la que n es un exponente que típicamente toma valores entre 0,2 y 0,6, según el odorante; C_x es la concentración de odorante y u_x es su valor umbral. Esto quiere decir que factores de dilución equivalentes de odorantes con valores de n muy diferentes corresponderán a intensidades olfativas muy diferentes. El segundo problema de las técnicas de dilución es que, como se realizan muchas diluciones progresivas, suelen emplearse solo uno o dos jueces y prácticamente nunca se emplean paneles. Sin embargo, dada la variabilidad inter-personal de nuestros sistemas olfativos, no tiene ningún sentido no emplear un panel.

Es por ello que la mayor eficiencia en la operación olfatométrica se obtiene cuando ésta se realiza sobre un extracto representativo de las fracciones vapor empleando como estrategia de jerarquización la medición de la intensidad de olor medida por un panel de entre 6 y 8 personas. Dada la dificultad de la operación GC-O, suelen ser jueces entrenados que asignan valores de intensidad en escalas de 7 puntos (0 a 3 con valores intermedios permitidos). Raramente se emplean escalas más sofisticadas.

3.- Identificación de odorantes

La operación de screening proporciona un listado jerarquizado de "zonas de olor" cuyos datos de identidad son tan solo, el índice de retención cromatográfico, que típicamente se recoge en dos columnas diferentes, y el propio olor de la molécula. Para asignar la identidad hacemos uso de bases de datos para proponer componentes, e intentamos confirmarla mediante GC-MS y preferentemente mediante GC-O-MS. Esta operación puede ser complicada si el odorante pertenece a algunos de los grupos de odorantes más potentes. Puede estimarse que si un buen GC-MS puede proporcionar un espectro de fragmentación con tan solo 1 pg de compuesto, necesitaremos conseguir un factor de concentración cercano a 10000 para conseguir el espectro de un odorante presente a 0,1 ppt en el producto original. A estos niveles de concentración las interferencias serán tantas que lo más probable es que no baste con la separación en una columna GC, por lo que se habrán de emplear sistemas bidimensionales GC-O-GC-O-MS o otros sistemas de fraccionamiento del extracto. Para considerar una identificación como satisfactoria, será preciso demostrar con un patrón al nivel de concentración detectado que hay una señal olfatométrica de la intensidad y calidad medidas en el experimento.

4.- Cuantificación de odorantes y retos principales

Aquí es donde nos encontramos con las limitaciones de la instrumentación analítica. Los mejores instrumentos permiten cuantificar los volátiles en escalas de 5 órdenes de magnitud, cuando como hemos mencionado al comienzo, en ocasiones es preciso cuantificar componentes cuyas concentraciones pueden diferir hasta 10 órdenes de magnitud. Esto obliga por fuerza a desarrollar distintos métodos analíticos para cuantificar todos los analitos relevantes. En los casos más extremos, con en el del vino, esto nos obliga a emplear al menos 6 métodos de análisis diferentes, en función del nivel de concentración y del grupo funcional. Para realizar estos métodos es preciso disponer de 5 sistemas GC o GC-MS con configuraciones específicas, tal y como se ve a continuación.

1. Analitos más concentrados ($C > 0,1$ ppm): microextracción líquido-líquido e inyección Split con detección FID
2. Analitos “sencillos” en concentraciones intermedias ($1 \text{ ppb} < C < 1 \text{ ppm}$): extracción en fase sólida e inyección Splitless con detección MS
3. Analitos “sencillos” en concentraciones ultratraza ($C < 1 \text{ ppb}$): extracción con twister y desorción térmica en un sistema TD-GC-GC-MS
4. Analitos con funcionalidad carbonilo: derivatización con clorhidrato de pentafluorurobencil-hidroxilamina y análisis GC-NCI-MS
5. Analitos con funcionalidad mercapto: derivatización con bromuro de pentafluorobencilo y análisis por GC-NCI-MS
6. Compuestos azufrados muy volátiles (VSCs): análisis de espacio de cabeza con detección selectiva de azufre

Obviamente esto resulta desde muchos puntos de vista poco práctico y extremadamente caro y constituye un auténtico cuello de botella que dificulta alcanzar el objetivo de explicar y predecir el aroma de los alimentos a partir del estudio de su composición química. Podemos pensar en que las siguientes líneas de investigación merecen la pena ser consideradas en la resolución de este escollo:

1. Desarrollar métodos analíticos más integrales aprovechando al máximo las posibilidades de la instrumentación existente, en particular los sistemas TD-GC-GC-MS. En estos sistemas, es posible combinar la cuantificación de sustancias en concentraciones relativamente altas en la primera dimensión, en la que hay un detector FID, con la de sustancias en concentraciones

más bajas que son transferidas a la segunda dimensión y analizadas por MS.

2. Estudiar procedimientos de derivatización múltiple para la cuantificación simultánea de mercaptanos, carbonilos y tal vez otros grupos funcionales.
3. En conexión con el objetivo anterior, investigar las posibilidades de cuantificación conjunta de sustancias polares y derivatizables mediante HPLC-MS.
4. Explotar los beneficios de la instrumentación más potente, en particular de los nuevos diseños en espectrómetros de masas de alta resolución y alto rango lineal acoplados a sistemas GC.

Sólo cuando se consigan métodos relativamente rápidos y económicamente no prohibitivos, será posible plantear el estudio extensivo de las propiedades aromáticas de los alimentos.

Otra prioridad de investigación que debe abordarse de manera paralela, es seguir progresando en la comprensión de cómo se relacionan los contenidos en compuestos odorantes con las propiedades aromáticas de los alimentos. Recientemente, hemos dado un pequeño paso siendo capaces de sistematizar los tipos de interacciones perceptuales que se pueden dar entre distintas moléculas aromáticas. En este aspecto queda, sin embargo, mucho trabajo por hacer. Por una parte, es preciso adquirir datos cuantitativos creíbles de las intensidades aromáticas de compuestos y sus mezclas y de su relación con la concentración, por otra es necesario comprender mejor las condiciones en las que la mezcla de odorantes conduce a la formación de un nuevo olor, y finalmente, es preciso desarrollar los sistemas de modelización matemática más adecuados para el tratamiento de estos sistemas altamente no lineales.

Referencias recomendadas

- V. Ferreira, A. de-la-Fuente-Blanco, P. Sáenz-Navajas. A New Classification of Perceptual Interactions between Odorants to Interpret Complex Aroma Systems. Application to Model Wine Aroma. *Foods*, 10 (7) 2021. [10.3390/foods10071627](https://doi.org/10.3390/foods10071627)
- A. de-la-Fuente-Blanco, V. Ferreira. Gas chromatography olfactometry (GC-O) for the (Semi) quantitative screening of wine aroma. *Foods*, 9 (12) 2020. [10.3390/foods9121892](https://doi.org/10.3390/foods9121892)
- L. Culleré, R. López, V. Ferreira. The instrumental analysis of aroma-active compounds for explaining the flavor of red wines. En “Red Wine Technology”, editado por A. Morata. Academic Press, 2019, pp. 283-307.