



Doctorado en Biotecnología

ESTUDIOS PRELIMINARES DE LA CONTRIBUCIÓN DE LAS FASES LIPÍDICA Y ACUOSA DE UNA EMULSIÓN CÁRNICA MODELO A LA PERCEPCIÓN DE AROMA A CARNE

M. en C. Victoria Marisol Herrera Jiménez

Comité Tutorial:

Tutora: Dra. Isabel Guerrero Legarreta (UAM-Iztapalapa)

Cotutor: Dr. Héctor Escalona Buendía (CIATEJ, Guadalajara)

Asesora: Dra. Edith Ponce Alquicira (UAM-Iztapalapa)

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón de Posgrados de Excelencia de CONACYT con el Convenio 471-01 Doctorado en Biotecnología

Este trabajo de investigación fue realizado con una beca de grado otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

La etapa final de esta tesis fue financiada con una beca otorgada por la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa para alumnos en la etapa de redacción de tesis.

INDICE GENERAL

1. RESUMEN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	8
2.1. El aroma cárnico	8
2.1.1. Reacción de Maillard	9
2.1.2. Oxidación de Lípidos	11
2.2. Emulsiones	12
2.2.1. Formación de una emulsión	14
2.2.2. Caracterización de una emulsión	15
2.2.2.1. Capacidad de emulsificación	16
2.2.2.2. Índice de estabilidad	16
2.2.2.3. Microestructura	17
2.2.2.4. Tamaño y distribución de partícula	18
2.2.2.5. Viscosidad aparente(n_{ap})	18
2.2.2.6. Densidad	21
2.2.2.7. Fracción volumen de la fase dispersa	22
2.2.2. Emulsiones cárnicas	23
2.2.3. Proteínas como emulsificantes	25
2.2.4. Proteínas Musculares	27
2.2.4.1 El Tejido Muscular	27
2.2.4.2 Proteínas sarcoplasmáticas	29
2.2.4.3 Proteínas miofibrilares	29
2.2.4.4 Proteínas contráctiles	29
2.2.4.5 Proteínas reguladoras	30
2.2.4.6 Proteínas de los filamentos intermedios	31
2.2.5 Participación de las emulsiones en el aroma	32
2.3. Métodos de análisis de compuestos odoríferos	35
2.3.1 Microextracción en fase sólida (SPME)	35
2.3.1.1 Métodos de extracción	37
2.3.1.2 Tipos de fibras	41
2.3.1.3 Fases	41

2.3.2. Extracción con solventes	42
2.3.2.1 Aplicación de la técnica de extracción con solventes para compuestos odorífero	44
3. JUSTIFICACION	46
4. OBJETIVOS	48
Objetivo general	48
Objetivos particulares	48
5. MATERIALES Y MÉTODOS	49
5.1. Formulación y estudio de la emulsión modelo	49
5.1.1. Materia prima	50
5.1.2. Extracción de la grasa de cerdo	50
5.1.3. Extracción de proteínas miofibrilares	50
5.1.3.1. Caracterización del extracto proteico	51
Contenido proteico	51
pH	51
Pesos moleculares de las proteínas extraídas	52
5.1.4. Formación de la emulsión	53
5.1.4.1. Fases	53
Fase dispersa	53
Fase continua	53
Emulsificante	53
5.1.4.2. Determinación de proporciones grasa-proteína y formulación del sistema	54
5.1.4.3. Criterios de elección del sistema modelo	55
5.1.4.4. Capacidad de emulsificación	56
5.1.5. Caracterización de la emulsión	57
5.1.5.1. Distribución de tamaño de particular	57
5.1.5.2. Viscosidad aparente	57
5.1.5.3. Microscopía óptica	57
5.1.5.4. Microscopía de barrido electrónico	58
5.1.6. Ruptura de la emulsión	59
5.1.6.1. Densidad y fracción volumen de la fase dispersa	59
5.1.6.2. Determinación de la concentración de proteína en las emulsiones y fases	60
5.1.6.3. Degradación de proteínas en las fases continua y dispersa	60

5.2. Contribución de las fases de la emulsión a la liberación de compuestos volátiles indicadores	60
5.2.1. Microextracción en fase sólida de los compuestos indicadores de la emulsión, y de fases continua y dispersa	61
5.2.2. Cuantificación de los compuestos indicadores por extracción con solventes	64
5.2.2.1. Extracción de volátiles con cloroformo y metanol	64
5.2.2.2. Curvas de calibración	65
5.2.2.3. Determinación de índices de extracción	66
5.3. Diseño experimental y análisis estadístico	67
5.3.1. Formulación de la emulsión modelo	67
5.3.2. Análisis de volátiles por microextracción en fase sólida	68
5.3.3. Análisis de volátiles por extracción con solventes	68
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	70
6.1. Formulación y estudio de la emulsión modelo	70
6.1.1. Fracción lipídica	70
6.1.2. Fracción proteica	70
Contenido proteico	70
pH	71
Pesos moleculares de las proteínas extraídas	72
6.1.3. Formación de la emulsión	73
Proporciones extracto proteico / aceite de canola	73
Capacidad de emulsificación	74
Distribución del tamaño de partícula	76
Viscosidad aparente	78
Microscopía óptica	81
Microscopía de barrido electrónico	82
6.1.4. Caracterización de las fases de la emulsión	83
Densidad	83
Fracción volumen fase dispersa	84
Degradación de las proteínas en las fases continua y dispersa	86
6.2. Microextracción en fase sólida de los compuestos indicadores de la emulsión, y de fases continua y dispersa	88

6.2.1. Liberación de compuestos volátiles indicadores	88
6.2.2. Efecto de las proteínas miofibrilares	95
6.3. Cuantificación de los compuestos indicadores por extracción con solventes	97
6.3.1. Tiempos de retención	97
6.3.2. Curvas patrón	97
6.3.3. Índices de extracción	98
7. CONCLUSIONES	105
8. RECOMENDACIONES PARA TRABAJOS POSTERIORES	108
9. BIBLIOGRAFIA	110
ANEXOS	121
PRODUCTIVIDAD DURANTE EL DESARROLLO DE LA TESIS	153
ARTICULO DE INVESTIGACION	155

1. RESUMEN

El aroma a carne es una mezcla de compuestos de muy diversas familias químicas, en éste, se han reportado más de 700 compuestos. Entre las reacciones responsables de la producción de compuestos del aroma cárnico están las reacciones de Maillard y la rancidez oxidativa o autoxidación de lípidos. Sin embargo, la percepción del aroma también es el resultado del sistema físico en el cual se encuentran los compuestos odoríferos. Las emulsiones son sistemas muy empleados en alimentos, en especial en productos cárnicos. Debido a la estructura de un sistema emulsionado, los compuestos odoríferos tienen una solubilidad e interacción específicas con la fase dispersa o continua, o ambas. Por tanto, cada fase de la emulsión contribuye en forma diferente al aroma cárnico.

El objetivo de la presente tesis fue estudiar la contribución de las fases de una emulsión cárnica modelo, a través de la liberación de cinco compuestos indicadores, del aroma cárnico en una emulsión modelo.

Se realizó la caracterización de las emulsiones modelo en términos de distribución de tamaño de partícula, viscosidad aparente, ultraestructura, fracción volumen de la fase dispersa, concentración, y degradación de proteínas miofibrilares en las fases dispersa y continua. Posteriormente se añadieron concentraciones conocidas de cinco compuestos indicadores del aroma cárnico: tres aldehídos (hexanal, octanal y nonanal) y dos pirazinas (1-etil-3,5-dimetil pirazina y 2-metil pirazina). En una primera etapa se estudió la liberación de estos compuestos indicadores de cuatro sistemas:

amortiguador de fosfatos, amortiguador de fosfatos añadido con un extracto de proteínas miofibrilares, aceite de canola (fase dispersa) y la emulsión cárnica modelo. En una segunda etapa se estudió la extracción de los cinco compuestos indicadores usando la técnica de extracción con solventes a partir de la fase dispersa (lipídica) empleando metanol, y de la fase continua (solución proteica) empleando cloroformo.

De pruebas preliminares se concluyó que los dos modelos de estudio que mejor describían a la emulsión cárnica eran: Modelo I: pH 7.5 (efecto fijo); % extracto proteico (20, 25, 30 y 35%); Modelo II: 35% extracto proteico (efecto fijo), pH (4.5, 5.5, 6.5 y 7.5).

La capacidad de emulsificación aumentó con el porcentaje de extracto proteico añadido y con el pH debido a que el proceso de homogenización de la paste cárnica desnaturalizó parcialmente a las proteínas, aumentando su capacidad de emulsificación. Las emulsiones modelo mostraron una distribución monodispersa de tamaño de partícula que decreció al aumentar el pH y la concentración de proteína. Los sistemas emulsificados tuvieron un comportamiento pseudoplástico, ya que la viscosidad aparente disminuye a medida que aumentó el esfuerzo cortante. Al emplear un emulsificante comercial, se observó al microscopio de barrido electrónico un tamaño de glóbulo más pequeño y con distribución más homogénea que la emulsión sin emulsificante comercial, la cual fue inestable. La fracción volumen de la fase dispersa en ambas emulsiones modelo tuvo una tendencia al aumento conforme se incrementó la cantidad de extracto proteico añadida y el pH del medio continuo.

Como se esperaba, las proteínas estuvieron presentes en mayor abundancia en la fase continua (amortiguador de fosfatos) que en la dispersa (aceite), debido a la solubilidad de estas en un medio con fuerza iónica media. Sin embargo, la miosinaa estuvo presente en cantidades similares en la fase continua y en la dispersa, posiblemente adsorbida a la interfase.

Empleando la técnica de microextracción en fase sólida, se observó que los índices de liberación (k) de los aldehídos fueron mayores en el amortiguador con o sin proteínas, y significativamente menores en el aceite; el hexanal y el nonanal mostraron bajos índices de liberación en las emulsiones. De forma contraria, el octanal se liberó fácilmente de la emulsión. Las pirazinas tuvieron índices altos de liberación de la solución proteica (amortiguador añadido con proteínas miofibrilares) y del aceite, pero baja liberación de la emulsión modelo y del amortiguador sin proteína. Se puede concluir que las pirazinas contribuyen al aroma cárnico en sistemas lipídicos y en soluciones proteicas, pero no en emulsiones ni en sistemas acuosos sin proteínas. Los aldehídos estudiados, hexanal, octanal y nonanal fueron contribuyentes menores al aroma cárnico en el medio lipídico.

Empleando el método de extracción con solventes, el índice de extracción (k_{ext}) con metanol fue significativamente mayor que con cloroformo; el octanal mostró el más alto índice de extracción. En la fase dispersa (extraída con metanol), los menores índices de liberación se observaron para nonanal y 2-metil pirazina, mientras que en la fase continua (extraída con cloroformo) fueron para el nonanal y el hexanal. Esta

técnica no detectó diferencia significativa entre los índices de extracción de nonanal y 1-etil-3,5-dimetil pirazina, al igual que entre los de hexanal y 1-etil-3,5-dimetil pirazina, a diferencia de los resultados obtenidos con el método de microextracción en fase sólida, en los que sí se detectan diferencias entre compuestos. Por tanto, la técnica de microextracción en fase sólida es más sensible que la técnica de extracción con solventes.

ABSTRACT

Meat aroma is composed of a wide variety of chemical compounds. It has been reported to be made of more than 700 chemicals. Among the most important reactions responsible of meat aroma are Maillard reaction and lipid autoxidation or oxidative rancidity. However, aroma perception is modified by the physical system where the odor-related compounds are trapped. Many food materials are emulsions; a number of meat products are considered being this type of physical system. Odor compounds must be soluble in the disperse or continuous phase, or both, due to the emulsion structure. Therefore, each phase contributes in a different way to the overall aroma of a meat emulsion.

The objective of this work was to study the contribution of disperse and continuous phases of a model meat emulsion by analyzing the release of five aroma indicator compounds, and myofibrillar protein concentration and depletion in the phases. Hexanal, octanal and nonanal were taken as indicators of lipid oxidation whereas 1-ethyl-3,5-dimethyl pyrazine and 2-methyl pyrazine were Maillard reaction indicators. Four systems were studied: I) a model meat emulsion; II) phosphate buffer; III) phosphate buffer+myofibrillar proteins; IV) canola oil. Release of indicator compounds from each of the studied systems was analyzed in the headspace. In a further experiment, the extraction index of the five compounds were analyzed; the disperse (lipid) phase was extracted with methanol, whereas the continuous (aqueous phase) was extracted with chloroform

From preliminary tests, it was concluded that the two models better describing a meat emulsion were: Model I: pH 7.5 (fixed effect), protein extract (20, 25, 30 and 35%); Model II: 35% protein extract (fixed effect), pH (4.5, 5.5, 6.5 and 7.5).

Emulsion capacity increased with protein concentration and pH; proteins were partially denatured during emulsion formation, increasing the ability to emulsify fats. The emulsion showed a monodisperse particle size distribution, decreasing the average size as pH and protein concentration increased. A pseudoplastic behavior was observed as apparent viscosity decreased with increasing shear rate. When a commercial emulsifier was included in the formulation, scanning electron microscopy showed a more homogeneous particle size and high emulsion stability. Disperse phase fraction volume in both model emulsions increased with protein concentration and pH.

As expected, protein concentration was higher in the continuous phase (phosphate buffer) than in the disperse phase (oil) due to their solubility in medium ionic strength solutions. However, actin was present in similar amounts in disperse and continuous phases, probably at the interface.

The solid phase microextraction technique (SPME) showed that aldehyde release indexes (k) were the highest in the buffer system, with or without proteins, but considerably low in the lipid system; hexanal and nonanal had very low release indexes in the emulsion. Conversely, octanal had a high release index in the emulsion. Both pyrazines had very high release indexes in the protein solution

(buffer+protein extract) and in the oil, but low in the emulsion and buffer without proteins. It was concluded that pyrazines mainly contributed to aroma in lipid systems and in protein solutions, but not in emulsions and non protein aqueous systems. Hexanal, octanal and nonanal were minor aroma contributors in lipid media.

The solvent extraction technique showed that extraction indexes (k_{ext}) with methanol were considerable higher than with chloroform; octanal showed the highest extraction index. The lowest index in the disperse phase (extracted with methanol) were for nonanal and 2-methyl pyrazine, whereas in the continuous phase (extracted with chloroform) were for nonanal and hexanal. This method did not detect any difference between nonanal and 2-ethyl-3,5-dimethyl pyrazine indexes, and between hexanal and 1-ethyl-3,5-dimethyl pyrazines; conversely as the results obtained with the SPME. Therefore, SPME was more sensitive than solvent extraction method.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. El aroma cárnico

El aroma cárnico comprende una amplia gama de compuestos químicos; es a la vez el resultado de factores tales como, composición del sustrato, pH, actividad de agua, condiciones de procesamiento y almacenamiento, atmósfera gaseosa, entre otros. Se han reportado cerca de 700 compuestos químicos generados por las fracciones grasa y magra de la carne (Passer y Grosch, 1988; Shahidi, 1994). Sin embargo, el tipo y concentración de compuestos responsables del aroma varían dependiendo de la especie, raza, manejo *premortem* del animal y manejo posterior a la matanza, entre otros factores. El tipo y concentración de compuestos volátiles y no volátiles en la carne, además de las interacciones entre estos, derivarán en un aroma específico (Kato y Nishimura, 1987; Fabbiane, 2000).

El aroma de la carne se ocasiona por varios tipos de reacciones, entre otras:

- **Reacciones de Maillard**

- **Autoxidación de lípidos**
- **Rancidez hidrolítica**
- **Interacción proteína-lípido**
- **Proteólisis y descarboxilación generada por enzimas endógenas y exógenas**
- **Degradación de nucleótidos y aminoácidos libres.**
- **Degradación térmica de tiamina**
- **Metabolismo de microflora nativa**

De estas reacciones, las que más afectan la liberación de compuestos responsables del aroma son las reacciones de Maillard y la rancidez oxidativa o autoxidación de lípidos. En particular esta última da aromas específicos de cada especie animal, debido a la diferente composición de lípidos (Price y Schweigert, 1994)

2.1.1. Reacción de Maillard.

La reacción de Maillard ú oscurecimiento no enzimático tiene diversas vías que resultan en la formación de pigmentos oscuros de elevado peso molecular denominados melanoidinas, además de compuestos volátiles que pueden dividirse en tres grupos:

- Productos derivados de la fragmentación de azúcares como furanos, pironas, ciclopentanos carbonilos y ácidos
- Productos derivados de la degradación de aminoácidos como aldehídos y compuestos azufrados

- Compuestos volátiles producidos de reacciones secundarias como pirroles, piridinas, imidazoles, oxasoles, tiazoles y compuestos de condensación aldólica.

Este grupo de reacciones es uno de los principales mecanismos involucrados en la generación del aroma cárnico, particularmente cuando la carne se expone directamente a una superficie caliente, observándose que la velocidad de reacción es directamente proporcional con la intensidad del tratamiento térmico aplicado.

Los precursores de la reacción de Maillard presentes en carne cruda se derivan de los cambios bioquímicos que se producen en la etapa *postmortem*. La glucólisis y la ruptura de ATP generan azúcares libres y azúcares fosforilados. La etapa inicial de la reacción de Maillard involucra la condensación de un grupo amino libre (de un aminoácido, péptido ó proteína) con un azúcar reductor formando glucosilaminas, éstas se isomerizan a cetosaminas a través del reordenamiento de Amadori; a la vez, las cetosaminas producidas nuevamente se isomerizan a aldosas a través del rearreglo de Heyns. Las aldosaminas y cetosaminas pueden sufrir reacciones de deshidratación por isomerización enólica produciendo furfural y sus derivados. En general, las aldosas y cetosaminas son moléculas altamente reactivas por lo que pueden reaccionar entre sí según las condiciones de acidez, temperatura y humedad existentes (Valdés Martínez, 2006; Berlitz y Grosch, 1999)

Dentro de los compuestos de aroma a carne destacan los compuestos azufrados que se forman mediante la reacción de Maillard a partir de la condensación de

azúcares reductores con cisteína ó metionina vía la degradación de Strecker (Mottram, 1998). Los derivados azufrados obtenidos, pese a su baja concentración, tienen umbrales de percepción muy altos.

Otro compuesto que participa en la reacción de Maillard es la carnosina, ya que debido a su elevada actividad antioxidante reduce la formación de metamioglobina durante el almacenamiento de la carne e influencia el perfil de compuestos volátiles generados durante la cocción. Se ha determinado que la adición de carnosina provoca la reducción del contenido de tiofenos y favorece la formación de pirazinas y tiazoles, compuestos reconocidos como generadores de “notas” a tostado. La carnosina, la anserina y otros dipéptidos conteniendo histidina se unen a aldehídos insaturados evitando la oxidación (Gianelli y col., 2003).

2.1.2. Oxidación de Lípidos

La fuente natural de lípidos en carnes incluyen a triacilglicéridos, fosfolípidos y colesterol, localizados en tejido adiposo y en la grasa intramuscular; esta fracción lipídica es un sustrato fundamental para la generación de volátiles, más de la mitad de los compuestos que componen el aroma a carne provienen de la reacción de lípidos e incluyen a hidrocarburos alifáticos, aldehídos, cetonas, alcoholes, ácidos carboxílicos, ésteres, lactosas y alquifuranos (Mottram 1998).

La autoxidación de lípidos ocurre de forma espontánea en presencia de oxígeno, generando productos intermediarios y finales. El mecanismo de autoxidación comprende reacciones entre radicales libres, en donde el precursor es un lípido que se convierte en una especie química de alta reactividad y que genera, por acción de la luz, el calor ó por la presencia de catalizadores metálicos, al primer radical libre que posteriormente propaga una serie de reacciones en las que se producen radicales peróxido, hidroperóxido y alquilo (R•). La reacción termina cuando los compuestos producidos son especies químicas estables. Los compuestos generados incluyen aldehídos (hexanal, heptanal, octanal, nonanal, undecanal, 2-nonenal, 2-docenal, 3-hexanal, 4-decenal, 2,3-nonadienal, 2,4-decadienal) todos ellos responsables del olor a grasa y rancio, cetonas y más radicales libres que reingresan a la cadena de propagación.

A pesar de que los umbrales de percepción de los compuestos derivados de la autoxidación de lípidos son superiores a los correspondientes de los derivados de la reacción de Maillard, los aldehídos saturados e insaturados de 6 a 10 carbonos en su cadena alifática representan la mayoría de los componentes descriptores del aroma a carne de diferentes especies (Ponce, 2006).

2.2. Emulsiones

Una emulsión se define como la mezcla de por lo menos dos líquidos inmiscibles; el líquido que se dispersa como gotas ó

glóbulos, es la fase interna ó dispersa, mientras que el líquido circundante es la fase continua ó interna; si la fase dispersa es una sustancia no polar (como aceite) y la fase continua una sustancia polar (como agua) se denomina emulsión aceite en agua (O/W, por su siglas en inglés). De manera inversa, si la fase dispersa es agua y la continua un lípido se trata de una emulsión agua en aceite (W/O, por su siglas en inglés) (www.mdp.edu.ar), en la Figura 1 se muestran la simbología, las características más generales y ejemplos de las emulsiones mencionadas:

	emulsión aceite en agua	emulsión agua en aceite
Diagrama	<p>fase externa=agua fase interna=glóbulos de grasa/aceite</p>	<p>fase externa=grasa/aceite fase interna=gotas de agua</p>
Símbolo	aceite/agua, O/W	agua/aceite, W/O
Características	conduce electricidad, puede ser diluida con agua	sensación organoléptica grasa, puede diluirse con aceite o solventes orgánicos
Ejemplo	leche	margarina

Figura 1. Tipos de emulsiones (www.mdp.edu.ar)

Debido a la poca ó nula miscibilidad entre las fases que componen una emulsión se requiere el decremento en la energía libre del sistema, mediante la disminución de la tensión interfacial presente entre la superficie vapor-fase acuosa y la interfase aceite-agua, para estabilizar al sistema. Lo anterior se logra con la adición de agentes con actividad superficial que pueden ser moléculas discretas como emulsificantes y gomas, ó biopolímeros como proteínas y carbohidratos. Otros microcomponentes que generalmente se encuentran dispersos en la fase continua de una emulsión O/W son sales, minerales, colorante y conservadores (MacClemens, 1999).

Por tanto, la estabilidad de una emulsión depende del emulsificante empleado y de su velocidad de adsorción en la superficie ó interfase; si ésta última es grande, se hace una mejor cobertura del glóbulo de aceite, en consecuencia los procesos de desestabilización del sistema como el cremado, la floculación y la coalescencia tardan en aparecer. Es importante mencionar que la estabilización de una emulsión debido al empleo de biopolímeros

está influenciada por el ambiente iónico existente. En el caso de las proteínas empleadas como emulsificantes, en condiciones de pH próximos al punto isoeléctrico de la proteína empleada, y fuerzas iónicas altas, se favorecen las repulsiones electrostáticas, y por tanto la agregación de los glóbulos de aceite existentes.

2.2.1. Formación de una emulsión

Al proceso de mezclar dos líquidos inmiscibles en una emulsión se denomina homogenización. Previo a la elaboración de una emulsión los ingredientes de esta se dispersan en el medio en que son más solubles, la intensidad y duración del proceso de solvatación es importante para potenciar la funcionalidad de algunos componentes. De esta manera el proceso de formación de la emulsión se divide en prehomogenización y homogenización *per se*, en el cual se disminuye el tamaño del glóbulo de la fase dispersa; la duración y severidad del proceso depende del tipo de equipo empleado y de las características finales buscadas en la emulsión.

La Tabla 1 muestra la relación entre el tamaño de partícula obtenido y la viscosidad de la emulsión.

Tabla 1. Tamaño de partícula y la viscosidad de la emulsión obtenida con varios tipos de homogenizador (MacClemens, 1999)

Homogenizador	tamaño de partícula, μm	viscosidad de la emulsión
de alta velocidad	2	Baja a media
molino coloidal	1	media a alta
de alta presión	0.1	baja a media
ultrasónico	0.1	baja a media
microfluidización	<0.1	baja a media
membranas	0.3	baja a media

Asimismo el tamaño de partícula en una emulsión también está influenciado por el tipo y concentración del emulsificante, las propiedades fisicoquímicas de las fases involucradas y la temperatura del proceso.

2.2.2. Caracterización de una emulsión.

Las emulsiones poseen características medibles, tales como la capacidad de emulsificación, el índice de estabilidad, la microestructura y distribución del tamaño de partícula, la densidad, la viscosidad y la conductividad eléctrica, entre otras.

2.2.2.1. Capacidad de emulsificación

La capacidad emulsificación de un agente con actividad superficial se define como la cantidad máxima de aceite que puede ser dispersado en una solución acuosa de concentración conocida de emulsificante antes de que el sistema se rompa ó revierta. Se han reportado algunos métodos de medición de esta propiedad o característica, basándose en una titulación de la fase continua (acuosa) con el aceite a dispersar; el punto final de la titulación se determina a través de medición óptica, reológica ó eléctrica. Este tipo de valor depende más del área interfacial aceite-agua cubierta por el emulsificante que de la concentración de aceite añadida. Asimismo las condiciones experimentales, tales como el tipo de homogenizador empleado, la velocidad de adición de la fase dispersa, el manejo del método para determinar el punto de ruptura

de la emulsión, influyen en forma determinante. Es así que la capacidad de emulsificación es un índice cualitativo, sin embargo si las condiciones experimentales se mantienen controladas puede ayudar a evaluar diferentes tipos de emulsificantes en una forma comparativa con suficiente precisión. (MacClemens, 1999)

2.2.2.2. Índice de estabilidad.

Determina la vida útil de la emulsión elaborada, induciendo la ruptura de la misma al aplicar un tratamiento ya sea mecánico (centrifugación), térmico (calentamiento de la muestra) ó de ultrasónico bajo condiciones experimentales controladas (velocidad de centrifugación, temperatura ó vibración aplicadas en un período de tiempo determinado, Friberg y Larsson, 1997). En forma general, a la muestra tratada se le determina el grado de cremado (unión de las gotas de grasa, sin coalescer, en la superficie de la emulsión). Un índice de estabilidad bajo significa inestabilidad del sistema, Más precisa es la medición de la distribución del tamaño de partícula (MacClemens, 1999), ya que una distribución normal, constante en un intervalo de tiempo determinado, es un indicador de estabilidad de la emulsión. Para este fin se emplean equipos de

análisis de tamaño de partícula por dispersión láser (Rawlee, 2005).

2.2.2.3. Microestructura

La microscopía óptica, las microscopías de barrido electrónico y de transmisión, la microscopía confocal son técnicas que generan información acerca de la estructura, las dimensiones y la organización de los componentes de una emulsión mediante la obtención de imágenes. El principio de los microscopios óptico y electrónico es esencialmente el mismo, tanto uno como otro permiten amplificar aquellos objetos que son indistinguibles a nuestro ojo. La diferencia fundamental entre los dos es la fuente de iluminación; mientras que el microscopio óptico utiliza un haz de luz en el intervalo de longitud de onda visible, el microscopio electrónico emplea un haz de electrones de muy corta longitud de onda que permite obtener una mayor resolución (www.criba.edu.ar).

El microscopio de barrido electrónico (SEM) es similar al microscopio electrónico de transmisión (TEM); ambos tienen características comunes tales como un cañón de electrones donde

se genera el haz de electrones, lentes condensadoras, objetivo y sistema de vacío. La diferencia principal es la manera en que forman y magnifican la imagen, esto hace que la información que se obtenga de cada uno sea distinta. Mientras el TEM permite el estudio de la ultraestructura de muestras delgadas, el SEM posibilita conocer la morfología superficial. El SEM tiene además una gama más amplia de aumentos (de 10 a 100 000 veces), una profundidad de foco 300 veces mayor y varios módulos optativos de presentación de las imágenes, que lo hacen un microanalizador muy práctico (www.criba.edu.ar).

2.2.2.4. Tamaño y distribución de partícula

Los instrumentos para la determinación del tamaño de partícula basados en la difracción láser utilizan el principio físico de la dispersión de las ondas electromagnéticas (Washington, 1992). Las partículas expuestas a un rayo láser paralelo desvían la luz con un ángulo sólido fijo que depende del diámetro de las partículas. Una lente enfoca la luz dispersada en los anillos de un sensor montado en el plano focal de la lente. La luz no difractada converge en el punto focal del eje óptico; la distribución de la intensidad de la

luz dispersada puede utilizarse para calcular la distribución del tamaño de partícula del colectivo de las partículas, obteniéndose como resultado un diámetro de partícula que corresponde a la difracción láser de una partícula esférica con un diámetro equivalente. Se mide el promedio volumétrico de diámetros y la distribución del tamaño de partícula resultante es una distribución en función del volumen (Allen, 1992; Rawlee, 2000).

2.2.2.5. Viscosidad aparente (n_{ap})

La viscosidad de un líquido se define como la resistencia a fluir (Steffee, 1996). En una emulsión, la viscosidad aumenta o disminuye cuando se aplica un esfuerzo cortante (τ), pero no permanece constante como es el caso de un fluido Newtoniano. Las emulsiones alimentarias como la leche, tienen baja viscosidad y fluyen fácilmente; otras son muy viscosas, como la mayonesa. Si embargo, las emulsiones alimentarias comparten la característica de ser fluidos no ideales, por lo que su viscosidad depende del esfuerzo cortante y/o el tiempo en el cual se aplica este esfuerzo (Tung y Paulson, 1995).

Los dos tipos más comunes de fluidos no ideales dependientes del esfuerzo cortante pero no del tiempo, son los fluidos pseudoplásticos y los dilatantes (Figura 2). Los pseudoplásticos son los más comunes en las emulsiones, al aplicar τ se hacen más “ligeros”; la viscosidad aparente disminuye al aumentar el esfuerzo cortante. Esto se debe a varios mecanismos, entre otros a que la distribución espacial de las partículas se alteran por el esfuerzo; a que las partículas no esféricas se alinean al campo de flujo; a que las moléculas del solvente que se eliminan; a la formación y ruptura de flóculos, etcétera (Mewis y Macosko, 1994).

Los fluidos dilatantes se observan en emulsiones muy concentradas o en suspensiones (Hunter, 1986); estos fluidos se hacen mas “espesos” al aplicarles un esfuerzo cortante. La causa supuesta es que a τ medios, las partículas formas “hojas” las cuales se deslizan entre si; a τ altos las “hojas” se rompen y la viscosidad aumenta.

En algunas emulsiones alimentarias la viscosidad aparente aumenta o disminuye con respecto al tiempo de aplicación de τ . Estos son los fluidos tixotrópicos y reopéticos. En los primeros la viscosidad aparente decrece con el tiempo cuando el fluido se sujeta un τ constante; las emulsiones con este comportamiento contienen partículas que se agregan con fuerzas débiles; el esfuerzo cortante causa que estas se deformen y disgreguen, lo que reduce la viscosidad con el tiempo. En los fluidos

reopéticos, la viscosidad aparente aumenta con el tiempo cuando se sujetan a un τ ; esto es debido a la frecuencia y eficiencia de colisiones entre partículas, lo que ocasiona agregación y, en consecuencia, aumento de la viscosidad aparente.

Hay dos métodos para medir viscosidad, el primero es variar la deformación (velocidad de corte) y medir la fuerza resultante. Este tipo de instrumentos se denominan de deformación controlada y son los tipos más comunes. El segundo método consiste en aplicar una fuerza controlada a la muestra y medir la deformación resultante. En ambos casos, la viscosidad medida no es la absoluta, la cual es una propiedad intrínseca del material, independiente del tipo de instrumento utilizado para la medición, por lo que los valores obtenidos se llaman viscosidad aparente.

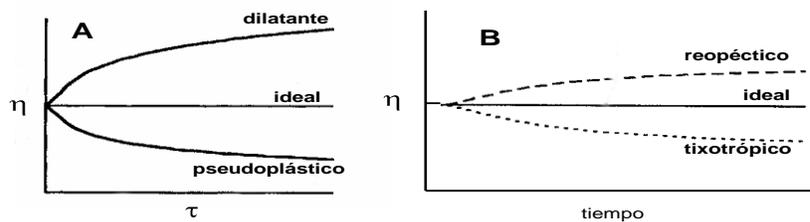


Figura 2. Fluidos no Newtonianos. A: esfuerzo cortante variable; B: tiempo variable, esfuerzo cortante constante (Welty y col., 1998)

2.2.2.6. Densidad

Se define la densidad de un cuerpo, también llamada densidad absoluta; en el caso de un fluido ρ es la cantidad de masa que hay en una unidad de volumen (Welty y col., 1998)

$$\rho = m / V \quad \text{Ecuación 1}$$

La densidad del agua es la densidad clave para definir la densidad relativa de un cuerpo sólido ó líquido ya que expresa la relación que existe entre la densidad de una sustancia y la densidad del agua, resultando una magnitud adimensional:

$$\rho_{rel} = \rho_{abs} / \rho_{H_2O} \quad \text{Ecuación 2}$$

Dado que la densidad de un cuerpo sólido ó líquido es el resultado de dividir la masa de ese cuerpo por el volumen que ocupa. Su medición requiere: a) medir la masa del cuerpo, expresada en gramos, b) medir el volumen del mismo cuerpo, expresado en mililitros. Este valor numérico es característico de cada sustancia aunque varía con la temperatura ya que aunque la masa de una determinada cantidad de sustancia permanece invariable el calor dilata a los cuerpos y, consecuentemente, su volumen depende de la temperatura que tengan.

2.2.2.7. Fracción volumen de la fase dispersa

La viscosidad de un líquido aumenta con la adición de esferas rígidas debido a que las partículas alteran el flujo normal del fluido causando disipación de la energía, debido a la fricción (Hunter, 1986).

La ecuación 3 relaciona a la viscosidad de una suspensión de esferas rígidas con su composición

$$\eta = \eta_0 (1+2.5\phi) \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

η - viscosidad intrínseca

η_0 – viscosidad del líquido que rodea a las partículas

ϕ – fracción volumen de la fase dispersa.

Sin embargo, esta ecuación supone que se trata de un fluido Newtoniano, que las partículas son rígidas y esféricas, y que no hay interacción entre partículas. Esta ecuación puede considerarse si la concentración de la fase dispersa es muy baja, donde el aumento de η es lineal con la fracción volumen. A mayores concentraciones de la fase dispersa, o fracción volumen crítica (ϕ_c), las gotas están empacada más cercanamente, de tal forma que no pueden fluir, la emulsión tiene propiedades más cercanas a un gel. La dependencia de viscosidad la fracción volumen de la fase dispersa esta determinada por interacciones coloidales entre los glóbulos o gotas de la fase dispersa (MacClemens, 1999).

2.2.2. Emulsiones cárnicas

Las emulsiones cárnicas contienen, además de las fases ya mencionadas en emulsiones típicas, otros elementos como sólidos dispersos, geles, grasas parcialmente cristalizadas o gases. El tamaño de partícula de la fase dispersa está entre 0.1 a 100 μm (Dickinson, 1992) Algunos productos cárnicos son emulsiones, tales como salchichas, boloña, pasteles, etcétera (Totosaus y Guerrero, 2006).

En éstos la fase dispersa son gotas de grasa, y la fase continua proteínas solubles, proteínas miofibrilares, saborizantes, sales, aditivos y otros, en un medio acuoso. Como emulsificantes se emplean proteínas miofibrilares. Sin embargo, la acción emulsificante únicamente de las proteínas, por lo que se emplean también emulsificantes comerciales. Los más empleados en alimentos incluyen a los monoacilglicéridos, diacilglicéridos, ácidos grasos de polietileno de sorbitano (Tween^{MR}), esteres de ácidos grasos de sorbitano (Spam^{MR}), lecitina y algunas proteínas; todos estos compuestos tienen regiones hidrofílicas e hidrofóbicas. Los emulsificantes se clasifican según sea su habilidad para formar emulsiones agua/aceite o aceite en agua, en un sistema llamado balance hidrofílico/lipofílico (HLB, por sus siglas en inglés) que los numera de 1 a 20. Los emulsificantes con números bajos se usan en emulsiones agua/aceite, mientras que los de número alto se usan en emulsiones aceite/agua. Para seleccionar un emulsificante hay que considerar su número HLB, estructura y su interacción con otros componentes como polisacáridos o proteínas. En productos cárnicos se usan combinaciones de emulsificantes comerciales con HLB alto, generalmente basadas en pirofosfatos, además de la participación de las proteínas miofibrilares como emulsificantes (Smith y Culberson, 2000).

Otros factores se relacionan principalmente con las propiedades fisicoquímica de la proteína:

- **Carga superficial**

- **Hidrofobicidad,**
- **Flexibilidad molecular,**
- **Estabilidad térmica y comportamiento de asociación / disociación proteica.**
- **Habilidad de la proteína para formar películas flexibles pero resistentes debido a asociaciones intermoleculares es también fundamental para al estabilidad de la emulsión.**

Los parámetros de procesamiento también que afectan a la estabilidad de la emulsión. Algunos autores (Jones, 1984; Sherman, 1976) indican como principales factores que afectan a la estabilidad de la emulsión los siguientes:

- **Tamaño de partícula: las emulsiones cárnicas se crean al proporcionar grandes cantidades de energía al sistema; entre menor sea el tamaño de partícula, más energía se necesita. Por otra parte, un tamaño de partícula demasiado pequeña necesitará grandes cantidades de emulsificante (proteína o de otro tipo) hasta llegar a un punto en donde no hay suficiente cobertura de los glóbulos de grasa, desestabilizando a la emulsión**
- **Tipo de lípido usando como fase dispersa: en las emulsiones cárnicas se emplean como fase dispersa grasas de alto punto de**

fusión, lo que permite formar a los glóbulos de grasa con mayor facilidad. Las grasas de bajo punto de fusión no forman emulsiones estables en productos cárnicos

- **Temperatura del procesamiento:** las operaciones de emulsificación de los productos cárnicos se llevan a cabo por medio de corte con navajas girando a alta velocidad, lo que ocasiona calentamiento de la masa cárnica. Al calentar las proteínas pueden desnaturalizarse y las grasas pasar a un estado semifluido, ambos fenómenos ocasionan que no se forme o se desestabilice la emulsión

2.2.3. Proteínas como emulsificantes

Los emulsificantes son moléculas que contienen regiones hidrofílicas e hidrofóbicas y que migran a zonas del sistema alimentario donde hay interfases. Debido a que las proteínas contienen cadenas laterales de los aminoácidos tanto hidrofílicas como hidrofóbicas, pueden funcionar como emulsificantes. En la interfase, las cadenas no polares de los aminoácidos tienden a orientarse a grasa, aceite o aire. Las cadenas polares se orientan

hacia el agua. Al cubrir la superficie de una gota de grasa con moléculas proteicas se baja la tensión superficial del sistema a tal grado que las gotas individuales pueden permanecer separadas por períodos largos de tiempo (Ngapo y col., 1992).

Para funcionar como emulsificante, las proteínas deben de migrar a la interfase, orientar sus cadenas laterales a las fases polar y no polar y formar una película estable alrededor del glóbulo de grasa, para ello, la proteína debe de migrar a través de la fase acuosa, por lo tanto, los factores que afectan a la solubilidad, tales como viscosidad de la fase continua, pH, fuerza iónica y temperatura, también afectan a la estabilidad de la emulsión, cabe mencionar que la proteína adsorbida también reduce el área de contacto entre las moléculas de agua y de aceite, lo cual disminuye la tensión interfacial (Dickinson 1992). La conformación adquirida por una proteína al adsorberse en una superficie vapor-agua y/o en una interfase aceite-agua y las propiedades fisicoquímicas de la membrana generada dependen de su estructura e interacciones por lo que las proteínas flexibles adoptan un arreglo semejante a membranas delgadas de baja viscoelasticidad (Damodaran 1994;

Dickinson 1992). Este tipo de proteína flexible reorienta su conformación al ser adsorbida con más fácilmente que una proteína globular; en el caso de esta última, se exponen los grupos no polares orientados inicialmente hacia el interior de la macromolécula interaccionando con otras proteínas en el medio a través de interacciones hidrofóbicas y de formación de puentes disulfuro (McClements y col., 1993). Su gran peso molecular y conformación más rígida influyen para que se formen membranas más compactadas, de mayor viscoelasticidad y resistencia.

En los sistemas alimentarios se emplean como emulsificantes una gran variedad de proteínas. Estas proteínas emulsificantes tienen la característica de una alta proporción de grupos no polares, por lo cuales presenta actividad superficial. Comparativamente, el uso de polisacáridos es más restringido ya que son predominantemente hidrofílicos y, debido a ello, no son muy activos superficialmente con pocas excepciones como algunas gomas como la guar o la arábica, o almidones modificados que tienen un ligero carácter hidrofóbico.

2.2.4 Proteínas Musculares.

Existen varias clasificaciones de las proteínas cárnicas: en cuanto a su forma (globulares o fibrosas), localización celular (extracelulares, intracelulares), localización y solubilidad (sarcoplásmicas, miofibrilares, conectivas) (Forrest y col., 1974), ésta es la clasificación más aceptada. En este sentido, se clasifican como del sarcoplasma, solubles en solución salina diluida (se incluyen enzimas hidrosolubles y pigmentos); del tejido conectivo, solubles en medio neutro (elastina, colágena y reticulina) y las miofibrilares, solubles en solución salina concentrada. Estos últimos se subdividen en proteínas contráctiles, reguladoras y de los filamentos intermediarios (Lawrie, 1985).

2.2.4.1 El Tejido Muscular

Las canales de los animales están formados por 3 tipos de tejidos: muscular, adiposo y óseo. El tejido muscular es capaz de producir energía química para convertirla en movimiento mecánico y de trabajo. Los músculos se clasifican en función de su estructura. De esta forma el músculo estriado comprende al

músculo esquelético y al músculo cardiaco; y el músculo liso comprende a los órganos internos (Cheftel y col., 1989; Forrest y col., 1974). La carne corresponde a los músculos estriados, (Cheftel y col., 1989) estos tipos de músculos son responsables del movimiento y se fijan al tejido óseo ó a otro músculo estriado. El músculo estriado del ganado vacuno tiene alrededor de 70-75% de agua, 20-25% de proteínas, 4-8% de lípidos y alrededor de 1% de sales minerales. La relación agua / proteína se mantiene constante y es un parámetro que indica la calidad de la carne, por otra parte el contenido de los lípidos varía dependiendo de la procedencia del músculo. Uno de los principales objetivos del tejido conectivo en el músculo es el de soporte de las fibras musculares y transmisión de la fuerza contráctil para la producción del movimiento, por lo anterior es una estructura mecánicamente resistente. El tejido conectivo existe en forma de láminas o bandas compuestas de hilos de fibras las cuales están formadas por tres tipos de proteínas: la colágena, la elastina y la reticulina (Valin, 1995).

La colágena es la proteína más abundante del tejido conectivo conteniendo 30% de glicina y 25% de prolina e hidroxiprolina. La

abundancia de estos aminoácidos es la causa de la rigidez de la colágena. La unidad básica de la colágena es la molécula de tropocolágena, estructura larga y delgada, formada por tres cadenas de polipéptidos fuertemente enlazados que dan firmeza y forma. Estos enlaces se rompen durante el cocimiento de la carne (López de Torre y Carballo, 1991).

La elastina es una proteína presente en proporciones menores en la piel, en el tejido adiposo y en el tejido conectivo, esta proteína provee resistencia y elasticidad (Alarcón-Rojo, 1992). La reticulina es poco conocida, se sabe que es más firme que la colágena y bioquímicamente parecida a esta, probablemente une a la colágena en el endomisio constituyendo ligamentos flexibles (Swatland, 1996).

2.2.4.2 Proteínas sarcoplásmicas

Las proteínas del sarcoplasma son solubles en agua, y están disueltas en el sarcoplasma de la célula muscular. Tiene pocas propiedades funcionales, pero son importantes por su actividad enzimática y de transporte y almacenamiento de oxígeno; desde el punto de vista de calidad de carne como alimento, la más

importante es la mioglobina. La mioglobina es un pigmento intracelular que se sintetiza en las mitocondrias (Kanner,1994), estructuralmente esta formada de una proteína globular compacta llamada globina, unida a un grupo prostético hemo. El grupo hemo es una ferroporfirina, capaz de realizar reacciones reversibles de oxidación y reducción. Cuando se oxigena la molécula de hierro forma el compuesto llamado oximioglobina (color rojo brillante en la carne al entrar en contacto con el oxígeno); cuando se reduce en ausencia de oxígeno forma la desoximioglobina (color púrpura de la carne); al oxidarse se forma la metamioglobina dando el color marrón de la carne oxidada (Forrest y col., 1974).

2.2.4.3 Proteínas miofibrilares

Las proteínas miofibrilares, como su nombre lo indica se encuentran localizadas en la miofibrilla de la fibra muscular y se dividen en contráctiles y las de los filamentos intermediarios.

2.2.4.4 Proteínas contráctiles

Las proteínas contráctiles se encuentran directamente relacionadas con la contracción y relajación muscular ya que son

las responsables de la conversión de energía química a mecánica, también son responsables de la textura de la carne. La miosina y la actina son las más abundantes ya que constituyen en conjunto aproximadamente el 75-80% de las proteínas de la miofibrilla (Forrest y col., 1974).

La miosina es la proteína más abundante, ya que constituye más de una tercera parte de la proteína del músculo, su peso molecular es de aproximadamente 500 kDa y está conformada por 2 tipos de subunidades: meromiosina ligera ó L y meromiosina pesada ó H, este valor depende de la especie del animal y del músculo (Lawrie, 1985)

La actina comprende el 20% del total de la proteína contenida en la miofibrilla, tiene un peso molecular aproximadamente de 42 kDa. Los filamentos delgados están formados prácticamente solo por actina. La conversión de energía química a mecánica se basa en que la miosina es transportadora de una molécula de ATP que es desdoblada por la miosina a ADP mas fósforo proporcionando la energía para la contracción muscular.

2.2.4.5 Proteínas Reguladoras

Las proteínas reguladoras promueven el inicio o terminación de la reacción contráctil. Son clasificadas en reguladoras mayores y reguladoras menores (Lawrie, 1985):

Reguladoras mayores son la troponina y la tropomiosina, la troponina tiene un peso molecular de 78 kDa y comprende tres fracciones: troponina C, troponina I, y la troponina T, con un peso molecular aproximado de 18, 23 y 37 kDa respectivamente (Zhao y col., 1995). La troponina T se une a la tropomiosina, mientras que la troponina C une a la troponina T con la I, caracterizándose por el secuestro de iones de calcio (Putter y Gergely, 1975). La troponina es una proteína globular, que constituye del 8 al 10 % de la proteína total de la miofibrilla. La tropomiosina es una proteína de aproximadamente 68 kDa, constituye cerca del 5% del contenido total de proteína miofibrilar. Está compuesta por dos cadenas polipeptídicas que se enrollan a lo largo de la actina. Su composición de aminoácidos es similar a la miosina con ausencia de prolina y triptófano y bajo contenido de histidina.

Las proteínas reguladoras menores comprenden a la α -actinina y a las proteínas M, C, H, F, I. La función de algunas de estas proteínas

es desconocida, pero se cree que forman una conexión entre los filamentos miofibrilares. La α -actinina se encuentra en la línea Z y su función es regular el ancho de los filamentos (Vigoreaux, 1994).

2.2.4.6 Proteínas de los filamentos intermedios

En la estructura del sarcómero se puede distinguir a los filamentos gruesos y a los filamentos delgados. Se ha propuesto la existencia de filamentos longitudinales (T y S) que unen a ambos filamentos de un extremo a otro del sarcómero y están constituidos por las proteínas titina, desmina y nebulina (Rodson y Huiatt, 1983). La titina anteriormente llamada conectina es una proteína miofibrilar de aproximadamente 2.8×10^6 kDa (Wang y Ramirez-Mitchell, 1979). Una molécula de titina atraviesa la mitad del ancho de un sarcómero, es decir desde la línea M hasta la línea Z, formando así un tercer filamento en la miofibrilla (Nave y col., 1989). Ocupa el tercer lugar en abundancia de las proteínas miofibrilares y tiene un papel en la integridad de las miofibrillas (Trinick y col., 1984).

La desmina es una proteína de un peso molecular aproximadamente de 55 kDa, se ha reportado que está presente en las líneas Z del músculo, aunque no solo se ha encontrado en este lugar sino también en los espacios intermiofibrilares (Tokuyashu y col., 1991 y Vigoreaux, 1994) y en el músculo cardiaco de las células de los vertebrados. La desmina comprende un filamento de aproximadamente 10 nm de diámetro (O'Shea y col., 1981). La nebulina es una proteína que al igual que la titina fue descubierta por Wang y Williamson, (1980), es de alto peso molecular que varía entre 600 y 900 kDa y se encuentra presente en el músculo estriado pero no en el cardiaco. El contenido de nebulina en el músculo es de alrededor del 3 al 4 % del total de la proteína miofibrilar

2.2.5 Participación de las emulsiones en el aroma

El término "flavor" se refiere a los componentes volátiles en alimentos que pueden ser percibidos por los receptores de la nariz, así como a los no volátiles que son percibidos por los receptores en la lengua y la parte interna de la boca (Thompson, 1986). "Flavor" es por tanto una combinación de aroma, gusto y sabor (Linthorpe y col., 1996). En la presente tesis, se referirá a "flavor" como "aroma".

A diferencia de la gran cantidad de estudios sobre la composición química del aroma

de los sistemas cárnicos y sus derivados que se encuentran en la bibliografía, existen pocas referencias a las variables fisicoquímicas que afectan a los aromas cárnicos. Esta área de la ciencia de los alimentos resulta relativamente nueva, empleando en su estudio sistemas modelo cuyo objetivo es obtener información la distribución de los compuestos que potencialmente conforman al aroma en la matriz alimenticia. Dicha distribución depende en gran medida de la estructura química de los compuestos químicos participantes de un aroma determinado ya que ésta a su vez define algunas de sus propiedades fisicoquímicas tales como carácter polar, solubilidad, reactividad y en consecuencia el tipo de interacciones que pueden desarrollar con las macromoléculas presentes en el sistema bajo estudio.

El aroma es determinado por la presencia de volátiles en la fase vapor de las emulsiones (Taylor y Linforth, 1996). Algunos compuestos odoríferos están asociados con la región interfacial, la cual altera su concentración en las fases vapor y acuosa, por lo que importante establecer la partición de estos compuestos en la emulsión. Sin embargo, el aroma también puede estar presente en la interfase aire-emulsión (MacClemens, 1999). La concentración de los volátiles en cada región de la emulsión depende de la estructura de la molécula y propiedades de cada fase, además de otros factores (Bakker y col., 1996):

- La matriz en la que las moléculas odoríferas se encuentran (lípido, acuoso, interfaces, etcétera)
- Estado físico del medio ambiente (gas, líquido o sólido)
- La organización estructural de los componentes (emulsión, gel, etcétera)

- El estado químico de las moléculas (grado de ionización, asociación, etc.)
- Interacciones físicas o químicas de los compuestos odoríferos con otras moléculas (proteínas, carbohidratos, surfactantes, o minerales)
- La rapidez de movimiento de un sistema a otro de las moléculas odoríferas)

El contenido y tipo de lípidos parece ser determinante en la liberación de volátiles (Doyen y col., 2001). Miettinen y col. (2002) estudiaron el efecto de diferentes fracciones volumen de aceite y emulsificante y presión de homogenización en la liberación de compuestos polares y no polares, encontrando que el contenido de grasa afecta fuertemente la liberación de compuestos no polares pero no afecta considerablemente la liberación de compuestos polares. En general, la liberación de compuestos odoríferos de la fase oleosa ocurre a menor velocidad que de la fase acuosa (de Roos, 1997). Por otro lado, los triglicéridos bajan la presión de vapor de compuestos odoríferos lipofílicos, aumentando su umbral de percepción, principalmente en lípidos de cadena corta e insaturada (Leland, 1997).

Con respecto a las proteínas, las dos principales interacciones proteína-compuesto odorífero son a través de adsorción reversible

por interacciones de Van der Waals, y reacciones químicas por interacciones covalentes o electrostáticas. Las primeras son interacciones débiles y las segundas fuertes incluyendo formación de amidas y esteres, y condensación de aldehídos con grupos amino o sulfhidrilo, o con grupos libres de lisina e histidina (Fischer y Widder, 1997). Por su parte, Seuvre y col. (2000) encontraron que los compuestos odoríferos tienen afinidad por las proteínas, si los lípidos están presentes a bajos niveles (0.5%); estos autores reportan que la interacción entre macromoléculas en alimentos cambia la afinidad de los compuestos relacionados con el aroma al modificarse la naturaleza y número de sitios de unión de los compuestos odoríferos. La hidrofobicidad de los compuestos odoríferos y su afinidad por las proteínas juega un papel importante en la retención de estos; es el resultado de un efecto combinado de la afinidad del compuesto odorífero por los medios lipídico y acuoso y de la capacidad de las proteínas para fijar a estos compuestos (Phillipe y col., 1994).

La viscosidad de las emulsiones pare ser otro factor determinante de la liberación de los compuestos odoríferos, mayor viscosidad,

menor liberación (Cook y col., 2003); Los espesantes afectan la liberación de compuestos odoríferos impidiendo su transporte a la fase vapor, de tal forma que espesantes muy eficientes como la pectina, la goma guar o los alginatos pueden inhibir a la volatilidad (Leland, 1997). La liberación de compuestos no polares también se afecta por el tamaño de partícula, aumentando con el tamaño de partícula (Van Ruth y col., 2002).

2.3. Métodos de análisis de compuestos odoríferos

2.3.1 Microextracción en fase sólida (SPME)

La microextracción en fase sólida (SPME por sus siglas en inglés) se basa en la extracción de los analitos de la matriz de la muestra mediante una fibra de sílice fundida que está recubierta de un adsorbente, en la mayoría de los casos polimérico (Aguilar y col., 1998; Schimming y col., 1999) seguida de la desorción de los analitos mediante temperatura ó un disolvente orgánico (Alpendurada, 2000). El tamaño pequeño de la fibra y su geometría cilíndrica permiten incorporarla en una jeringa. De esta forma, se facilita su manipulación y al mismo tiempo se protege la fibra

cuando no se utiliza, ya que ésta permanece dentro de la aguja de la jeringa.

La Figura 3 muestra un esquema del dispositivo comercial de SPME.

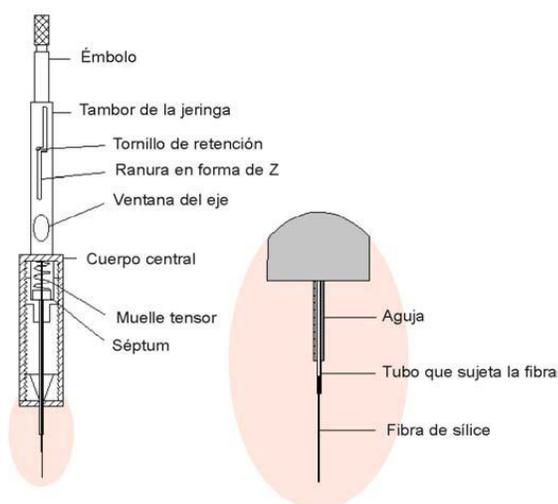


Figura 3. Esquema del dispositivo comercial de SPME

Esta técnica presenta una serie de ventajas frente a las técnicas de preconcentración ya que es muy simple, de bajo costo, puede ser automatizada, requiere volúmenes pequeños de muestra y generalmente no necesita del uso de disolventes orgánicos para llevar a cabo la preconcentración. Otra ventaja que presenta es la posibilidad de utilizarse con todos los tipos de muestras, ya sean gaseosas, líquidas como aguas o bebidas, o sólidas como

sedimentos, alimentos, etcétera. Además, se puede aplicar a la determinación de compuestos de diferente volatilidad (Ulrico, 2000; Ebeler y col., 2001). Sin embargo, tiene el inconveniente de tener una capacidad limitada de las fibras, ya que la cantidad de recubrimiento es muy pequeña; además, en ocasiones se obtienen límites de detección bajos, sobre todo si la SPME se utiliza combinada con la cromatografía de líquidos (Pawliszyn, 1997; Song y col., 1998).

El principio teórico en el que se basa la SPME es la partición de los analitos entre la matriz de la muestra y el recubrimiento de fibra. Así, el transporte de los analitos desde la matriz de la muestra hasta la fibra comienza cuando la fibra entra en contacto con la muestra y la extracción se considera completa cuando la concentración de analito ha alcanzado el equilibrio de distribución entre la muestra y la fibra (Simplicio y Boas, 1999).

2.3.1.1 Métodos de extracción

Existen básicamente dos métodos de extracción posibles en SPME, introduciendo la fibra directamente en la muestra o bien en

el espacio vacío (“headspace”). El modelo matemático que explica la dinámica del proceso de absorción cuando la fibra se introduce directamente en la muestra fue desarrollado por Louch y col. (1992), en él se confirma la relación lineal que existe entre la cantidad de analito absorbida por la fibra en el estado de equilibrio y la concentración de éste en la muestra.

En SPME también se debe tener en cuenta la cinética del proceso ya que los analitos deben ser transportados desde la matriz de la muestra a la fibra en inmersión o desde la matriz de la muestra al espacio de cabeza y de allí hacia la fibra, en el caso de que la extracción se realice mediante extracción del espacio vacío de la muestra. Para aumentar la velocidad de la extracción es necesario utilizar un sistema de agitación de manera que se facilite la difusión de los analitos hacia la superficie de la fibra (Constant y Collier, 1997). Esto no es necesario con muestras gaseosas ya que la propia convección del aire es suficiente para llegar al equilibrio de forma rápida.

En muestras líquidas, sin embargo, se han utilizado diferentes modos de agitación como por ejemplo barras magnéticas

agitadoras, ultrasonidos o movimientos de la fibra o del vial. Estos sistemas de agitación sirven para disminuir el efecto causado por la zona estática que se forma alrededor de la fibra y que disminuye la velocidad de extracción, así como para compensar los bajos coeficientes de difusión de las matrices líquidas (Pawliszyn, 1997). La agitación con barras magnéticas agitadoras es la más frecuente aunque algunos autores han comparado los diferentes modos de agitación concluyendo que el más efectivo es la agitación por ultrasonido pero tiene como inconveniente que debido a la elevada cantidad de energía suministrada, se produce un calentamiento de la muestra que puede provocar la degradación de los analitos (Pawliszyn, 1997; Santos y col., 1997). En el proceso de SPME se diferencian dos etapas: en la primera de extracción, la fibra recubierta del adsorbente se pone en contacto con la muestra durante un tiempo y temperatura determinadas de manera que se produce una migración de los analitos desde la solución a la fibra hasta que se alcanza la situación de equilibrio; en una segunda etapa se desorben los analitos retenidos por la fibra.

La Figura 4 esquematiza estas etapas.

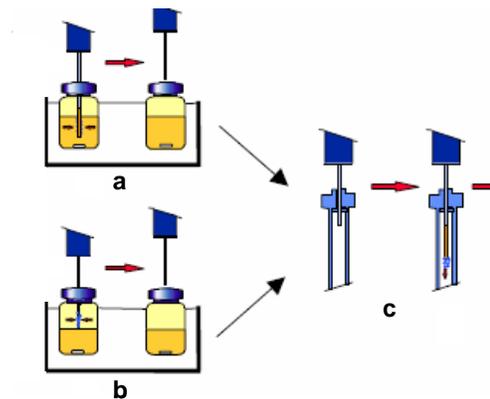


Figura 4. Esquema del proceso de SPME: (a) inmersión directa; (b) en espacio vacío; (c) desorción térmica en cromatografía de gases (Pawliszyn, 1997).

La etapa de desorción se realiza térmicamente o bien por adición de un solvente orgánico, dependiendo de la técnica analítica que se utilizará a continuación. Así, si la SPME se acopla a cromatografía de gases la desorción se realiza térmicamente, en este caso, los

puertos de inyección, generalmente son del tipo “split/splitless” (Muller y col., 1999; Chien y col., 2000; Hyspler y col., 2000; Koziel y col., 2001); si se combina con HPLC, se lleva a cabo mediante el uso de un solvente orgánico y, en general, utilizando una interfase (Wu y Huang, 1999; Aranda y Burg, 1999; González-Toledo y col., 2002). Aunque la combinación de la SPME con cromatografía de gases es la que se ha utilizado más frecuentemente, también se han publicado trabajos en los se acopla con HPLC (Pawliszyn, 1999; Li y Weber, 1997; Nguyen y Luong, 1997; Wang y Pawliszyn, 1998). La Tabla 2 muestra la compatibilidad de la SPME con los diferentes tipos de inyectores usados en cromatografía de gases (Universidad de Waterloo, 2002).

La desorción térmica es el modo más sencillo de desorber los analitos de la fibra pero hay compuestos que son térmicamente inestables o poco volátiles y por lo tanto no se pueden determinar directamente mediante cromatografía de gases (Cam y Gagni, 2001; Liu y col., 2001). En estos casos la combinación de SPME con HPLC es más adecuada siendo necesario utilizar un disolvente orgánico para desorber los analitos. Ésta se puede llevar a cabo en línea (on-line) o bien fuera de línea (off-line) con el sistema cromatográfico

(Eisert y Pawliszyn, 1997; Negrao y Alpendurada, 1998; Pawliszyn, 1999). El modo de extracción de SPME permite proteger la fibra de compuestos de elevado peso molecular u otras interferencias no volátiles. Además permite modificar la matriz de la muestra, por ejemplo, variando el pH sin dañar la fibra. Este modo de extracción es muy útil para el análisis de muestras sólidas como sedimentos ó alimentos ó muestras biológicas (Pawliszyn, 1997) donde la interferencia de la matriz es crítica, pero está restringido a compuestos volátiles o semivolátiles.

Tabla 2. Compatibilidad de la SPME con los inyectores de cromatografía de gases (Universidad de Waterloo, 2002).

Tipo de inyector	Compatibilidad
Split/splitless	<p>Puede ser usado con SPME</p> <p>No son necesarios insertos (<i>liners</i>) con gran volumen</p>
On-column	<p>Inserto con el menor volumen posible</p> <p>No adecuado para SPME a no ser que se disponga de un sistema de calentamiento Independiente</p>
PTV	Puede ser usado con SPME

Generalmente no son necesarios insertos
de gran volumen

2.3.1.2 Tipos de fibras

Los primeros recubrimientos comercializados fueron los de polidimetilsiloxano (PDMS) y poliacrilato (PA) pero los tipos de recubrimientos han ido aumentando progresivamente y actualmente cubren un amplio conjunto de aplicaciones. Además de las fibras comerciales, algunos autores han fabricado otros recubrimientos para aplicaciones más específicas, como los de carbón (Mangani y Cenciarini, 1995; Aranda y cols., 2000), C8, C18, polipirrol (Aranda y col., 2000), o fibras recubiertas con polímetros de huella molecular (MIP) (Wu y col., 2000; Koster y cols., 2001). Las fibras de PDMS, un polímero líquido, son las más utilizadas ya que fueron las primeras fibras introducidas para SPME. Las fibras de PDMS se comercializan en diferentes espesores (100µm, 30 µm y 7 µm), pero se recomienda utilizar las fibras de mayor espesor, para compuestos con coeficientes de partición bajos y de poco espesor para los que presenten coeficientes de partición elevados.

2.3.1.3 Fases

La Figura 5 muestra la clasificación de las fibras comerciales de acuerdo al proceso de extracción (absorción o adsorción).

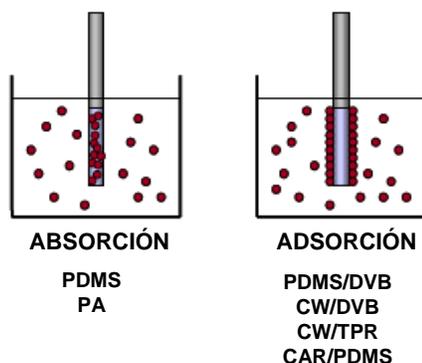


Figura 5. Clasificación de las fibras de SPME de acuerdo al proceso de extracción

La extracción de los analitos de la muestra mediante las fibras de PDMS se debe principalmente a un fenómeno de absorción aunque algunos autores (Grote y Pawliszyn, 1997; Gerecke y col., 2001) han indicado que la extracción de algunos analitos, sobre todo si son no polares, puede realizarse vía adsorción ya que existe competitividad entre ambos efectos. Las fibras de PA son adecuadas para analitos polares y, aunque el recubrimiento es un polímero sólido, su baja densidad hace que los analitos sean absorbidos por la fibra al igual que en las fibras de PDMS (Arthur y col., 1990)). Sin embargo, los coeficientes de difusión de los analitos en las fibras de PA son menores que los que poseen los analitos en las fibras de PDMS por lo los tiempos de extracción son mayores para los compuestos

volátiles en el espacio vacío. Las fibras en las que se combina más de un polímero, como las de PDMS/DVB ó CW/DVB, son más adecuadas para la determinación de analitos volátiles ya que a diferencia de las fibras de PDMS y PA, la principal interacción entre la fibra y los analitos se produce por adsorción, ya que son polímeros sólidos (Pawliszyn, 1997; Gorecki y col., 1999).

2.3.2. Extracción con solventes

Se basa en el reparto selectivo del soluto entre dos fases no miscibles, que pueden ser una acuosa y una orgánica. La distribución del soluto entre las dos fases inmiscibles es un fenómeno de equilibrio que se describe por la ley de distribución, cuya constante de equilibrio se denomina coeficiente de distribución ó coeficiente de reparto. Las constantes de distribución permiten calcular la concentración del soluto que permanece en una solución después de un número de extracciones y permiten determinar la manera más eficiente de realizar una separación por extracción. Es importante tener en cuenta que las sustancias iónicas y los compuestos orgánicos polares están en mayor

proporción en la fase acuosa, mientras que los compuestos orgánicos no polares, lo están en la fase orgánica (www.utadeo.edu.co).



$$KD = [S(\text{fase2})] / [S(\text{fase1})] \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde:

KD: coeficiente de reparto

S (fase2), S (fase1): concentraciones molares en las fases

Si KD es grande, el soluto pasa de la fase 1 a la fase 2; si es pequeño el soluto permanece en la fase 1. Para extracciones líquido-líquido, donde una fase es orgánica (org) y otra es acuosa (ac) se utilizan las siguientes ecuaciones (Pawliszyn, 1997; Alpendurada, 2000). La fracción de soluto presente en la fase acuosa $q(\text{ac})_1$ en la extracción número 1 es:

$$q(\text{ac})_1 = \frac{V_{\text{ac}}}{D V_{\text{org}} + V_{\text{ac}}} \quad \text{Ecuación 5}$$

$$q(\text{org}) = 1 - q(\text{ac}) = \frac{D V_{\text{org}}}{D V_{\text{org}} + V_{\text{ac}}} \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde:

D - relación de distribución

q org – fracción del soluto en la fase orgánica

q ac – fracción del soluto en la fase acuosa

V ac –volumen de la fase acuosa

V or – volumen de la fase orgánica

En el equilibrio: S ac ↔ S org

Por tanto: $D = \frac{S_{org} (total)}{S_{ac} (total)}$ Ecuación 7

Donde:

S ac - concentración molar del soluto en la fase acuosa

S org - concentración molar del soluto en la fase orgánica

Se pueden observar algunas desviaciones de la ley de distribución cuando se producen otro tipo de equilibrios, como disociación, dimerización o formación de complejos con alguno de los solventes o con otro componente.

2.3.2.1 Aplicación de la técnica de extracción con solventes para compuestos odorífero

La técnica de extracción con solventes se emplea para el

aislamiento y concentración de muestras que posteriormente serán cuantificadas mediante cromatografía de gases, sin embargo, la obtención de muestras para esta técnica es complicada y debe considerar los siguientes factores (Jenning y Filsoot, 1977).

1. Nivel de concentración. Los niveles de concentración de los compuestos odoríferos en un alimento ó muestra generalmente son bajos, lo que debe tomarse en cuenta tanto para el aislamiento como para la concentración de la muestra a tratar.

2. Tipo de matriz. Algunos de los compuestos odoríferos de las muestras alimenticias se encuentran de manera intracelular o en glóbulos de aceite, como es el caso de las emulsiones. Además del tratamiento mecánico que se aplica, la presencia de otros compuestos no volátiles como proteínas, carbohidratos y lípidos complican el proceso de extracción.

3. La complejidad del aroma a aislar. El aroma de un alimento es sumamente complejo sobre todo por que los compuestos que lo forman abarca un intervalo muy amplio de polaridades, solubilidades, volatilidad y reactividad.

La extracción de compuestos odoríferos depende en gran medida

de la cantidad de muestra que se dispone. Si es suficiente el empleo de embudos de separación es común. Se han sido empleados una variedad amplia de solventes al efectuar una extracción líquido-líquido (Weurman, 1969; Teranishi y col., 1971), los más comunes son éter, mezclas éter/pentano, hidrocarburos, freones y cloruro de metileno, los dos últimos presentan la ventaja de que no son inflamables.

La selección del solvente ó mezcla de éstos es un factor muy importante para efectuar una buena extracción, las siguientes sugerencias pueden considerarse (Kato y Nishimura, 1987):

- a) Los solventes no polares, como freones e hidrocarburos, deben usarse cuando la muestra no contiene alcoholes
- b) El éter y el cloruro de metileno reportan buena aplicación como solventes en el caso de muestras alimenticias, sobre todo éste último, ya que a diferencia del éter no forma peróxidos, aunque es ligeramente tóxico.

3. JUSTIFICACION

Aunque el tipo y concentración de compuestos volátiles presentes en la carne son el resultado de condiciones diversas, los aldehídos, derivados de reacciones de oxidación (como hexanal, octanal y nonanal) (Shahidi y Pegg, 1993; Kerscher y Grosch, 1997a), y las pirazinas, productos de la reacción de Maillard (Mottram, 1998; Pérez Chabela y col., 2003), son responsables de la percepción de aroma cárnico. Por otro lado, la contribución de estos volátiles al aroma cárnico depende de su liberación de la matriz alimentaria, la cual, a su vez, es función de parámetros tales como la fuerza iónica, la temperatura, la presencia y concentración de otros compuestos, y la hidrofobicidad de los mismos. Las proteínas, en particular, afectan a la percepción de aroma cárnico debido a las interacciones de estas con los compuestos relacionados con el aroma (Kinsella, 1982, Fischer y Widder, 1997). Los lípidos influyen en gran medida al aroma a través de su efecto en la percepción del aroma (sensación bucal, sabor y aroma) (De Roos, 1997), mientras que los carbohidratos aumentan la retención de aroma en la matriz (Goubert y col., 1998). La estructura está altamente asociada a la liberación de los compuestos relacionados con el aroma (Doyen y col., 2001; Linforth y col., 1996). En un sistema de dos fases, tal como una emulsión proteica, la concentración de los compuestos de aroma en las fases continua y dispersa, al igual que en la interfase, tienen una contribución específica debido a la difusión de estos hacia la fase gaseosa (Miettinen, y col., 2002; Cook y col., 2003), donde las percibe el consumidor, o hacia el espacio de cabeza, si esta emulsión está siendo analizada. Si bien la literatura reporta

numerosos trabajos sobre el aroma cárnico, no se ha reportado la contribución de las fracciones, magra y grasa, a la percepción total del aroma.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este trabajo consistió en estudiar la contribución a la percepción del aroma cárnico de las fases acuosa y lipídica de una emulsión cárnica modelo a través de la liberación e índices de extracción de cinco compuestos volátiles indicadores del aroma cárnico: tres aldehídos (hexanal, octanal y nonanal) relacionados con reacciones de autooxidación de lípidos, y dos pirazinas (1-etil-3,5-dimetil pirazina y 2-metil pirazina), productos de la reacción de Maillard

OBJETIVOS PARTICULARES

- Desarrollar una emulsión cárnica modelo para el estudio de la liberación de volátiles indicadores de cada fase.
- Estudiar la desnaturalización de proteínas miofibrilares en las fases dispersa, continua e interfase de una emulsión cárnica modelo.
- Determinar la liberación de los compuestos indicadores del aroma cárnico en diferentes medios dispersantes (amortiguador de fosfatos pH= 7.5, incorporado con proteínas miofibrilares, aceite de canola), así como en la fase continua y en la fase dispersa.
- Estudiar los índices de extracción de los cinco compuestos volátiles indicadores del aroma cárnico de las fases dispersa y continua de la emulsión modelo.

5. MÉTODOS Y MATERIALES

5.1. Formulación y estudio de la emulsión modelo

La Figura 6 muestra la estrategia experimental para la formulación y estudio de la emulsión modelo.

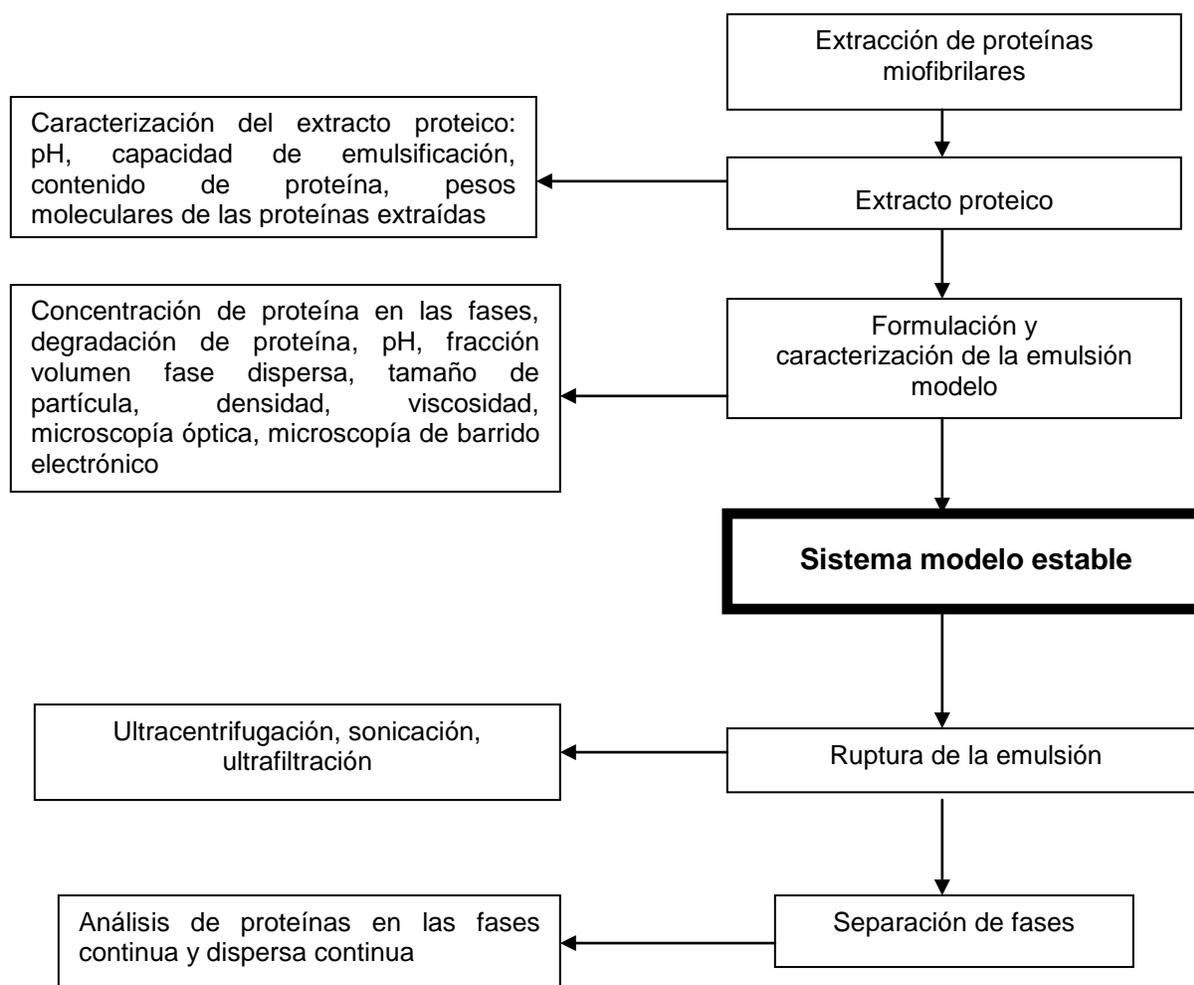


Figura 6. Formulación y estudio de las emulsiones modelo

5.1.1. Materia prima

La carne se compró en uno de los establecimientos de un mercado popular (Coyoacán, México D.F), el mismo día en que la surten para la venta al público, el tiempo transcurrido después de la matanza fue no es mayor a las 6 h según información de los expendedores. Se tomaron muestras del músculo *Longissimus dorsi*, las cuales se transportaron al laboratorio de Bioquímica de Macromoléculas de la UAM-Iztapalapa en hieleras portátiles, a 6 a 8°C dentro de los siguientes 20 min de la compra de muestras. Una vez en el laboratorio, la carne se cortó en cubos de 2 cm³, se empacó al vacío en porciones de 100 g empleando una empacadora al vacío Multivac D-8941 (Koch, Kansas City, Oklahoma) a -700 mBar, y se almacenó a -20°C hasta su uso.

5.1.2. Extracción de la grasa de cerdo

Con el fin de obtener una fracción lipídica a partir de carne de cerdo, la cual representaría la fase dispersa de la emulsión, la carne de cerdo se molió en una licuadora doméstica, junto con una mezcla de cloroformo y metanol (2:1 v / v), de acuerdo con la técnica reportada por Folch (1957), no se realizaron combinaciones entre mas solventes con el fin de mejorar el rendimiento de esta extracción.

5.1.3. Extracción de proteínas miofibrilares

Las proteínas miofibrilares están presentes en emulsiones cárnicas, tanto en la fase dispersa como en la interfase. Por tanto, en la formulación del modelo cárnico se incluyeron proteínas miofibrilares extraídas de la carne de cerdo de acuerdo a la

técnica reportada por Ngapo y col. (1992). Veinticinco gramos de carne, 25 g de hielo y 25 g de agua destilada se homogenizaron empleando una licuadora doméstica, el homogenizado obtenido se agitó durante 10 min en baño de hielo, y posteriormente se pasó por un colador con el fin de retirar el tejido conectivo. El filtrado obtenido se diluyó en una proporción 1:3 con agua destilada fría y nuevamente se sometió a agitación en baño frío por 15 min más. Posteriormente, la solución se centrifugó a 4000 rpm a 3°C durante 20 min. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado obtenido (proteínas miofibrilares) se disolvió en 20 mL de solución amortiguadora de fosfatos al 0.05%, 3.5% de NaCl y pH 7.5.

5.1.3.1. Caracterización del extracto proteico

Contenido proteico

Se determinó de acuerdo al método de Biuret, reportado por Peterson (1983), el cual se describe en el Anexo I.

pH

Se efectuó empleando la técnica de Owen y col. (1982). Diez gramos del extracto proteico se homogenizaron en una licuadora doméstica con 100 mL de agua destilada durante 1 min. Se calibró un potenciómetro (Beckman, Fullerton), empleando una solución reguladora de fosfatos, pH 7.0 (Baker, Xalostoc, México) y se procedió a determinar el pH de la dispersión, por triplicado.

Pesos moleculares de las proteínas extraídas

Los pesos moleculares se determinaron por SDS-PAGE conforme a la técnica reportada por Laemmli (1979), modificada por García Barrientos (2001), empleando una cámara de electroforesis Mini-Protean II Stab (Bio-Rad, Richmond, California) con geles de concentración de 4% y de 12% en geles de separación. Se aplicaron muestras de 13 ± 2 μL de extracto proteico tratado de la siguiente forma: 5 ± 2 mg/mL se diluyeron en una relación 1:3 con solución amortiguadora muestra, (10% SDS+5% mercaptoetanol+0.05% azul de bromofenol +10% glicerol+0.125% solución Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8); esta mezcla se calentó a 97°C por 3 min. Se aplicaron también 15 μL de los siguientes marcadores de peso molecular: miosina (205 kDa), β -galactosidasa (116 kDa), fosforilasa b (66 kDa), albúmina sérica bovina (66 kDa) y albúmina de huevo (45 kDa) (Bio-Rad) . El análisis se llevó a cabo a 200V de voltaje constante a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Los geles se fijaron y tiñeron durante 1 h con una solución de azul de Coomassie R-250 (Bio-Rad) al 0.1%+40% metanol+10% ácido acético por 30 min, y se destiñeron con 40% metanol+10% ácido acético. Finalmente, se digitalizaron usando un equipo Gel-Doc 2000 (Bio-Rad) acoplado con un software Quantity One^{MR}, versión 4 (Bio-Rad) y analizadas con un software Dscan EX versión 3.1.0.

5.1.4. Formación de la emulsión

5.1.4.1. Fases

Fase dispersa

El bajo rendimiento obtenido al efectuar la extracción de lípidos a partir de lardo de cerdo, definió la elección de aceite de canola comercial marca “Capullo” (Unilever de México, Tultitlán, México) como fase dispersa de la emulsiones elaboradas. Aunque el aceite de canola es rico en ácidos oleico y linoléico (63 y 20%, respectivamente), mientras que la grasa de cerdo contiene cantidades elevadas de ácidos oleico y palmítico (47 y 25%, respectivamente) (Badui, 2006), se supuso que, siendo el ácido oléico el más abundante en ambos lípidos (grasa de cerdo y aceite de canola), las reacciones de autooxidación podían tener mecanismos similares.

Fase continua

Consistió de una mezcla de amortiguador de fosfatos, proteínas musculares en diferentes porcentajes (15,20,25,30,35 %), dextrosa anhidra en polvo (Baker, Xalostoc, México) al 0.01% y NaCl, a una fuerza iónica (Γ) = 0.6 (Lawrie, 1985; Prince y Schweigert, 1994; Day y Underwoods, 1989). El pH se estudió a los siguientes valores: 4.5, 5.5, 6.5 y 7.5 con el fin de observar la mejor funcionalidad de las proteínas musculares en la proximidad de su punto isoeléctrico.

Emulsificante.

Las proteínas miofibrilares extraídas actuaron como emulsificantes, por lo tanto, se

empleó el extracto proteico obtenido a partir de carne de cerdo en diferentes porcentajes con el fin de obtener una emulsión cárnica estable.

5.1.4.2. Determinación de proporciones grasa-proteína y formulación del sistema modelo

Algunos autores (Price y Schweigert, 1994) reportan que los porcentajes de grasa y de proteína encontrados en cortes de carne de diferentes especies varían entre 5 y 30% de grasa; mientras que la proteína se encuentra en una concentración entre 20 a 25 %. Con base en esta información, se llevaron a cabo pruebas preliminares en la formulación de la emulsión usando de 5 a 25% de aceite de canola y 15 a 25% de extracto proteico en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.5 (Tabla 3).

Tabla 3. Formulaciones iniciales para el sistema modelo

	% grasa		
	15	20	25
% proteína			
15			
20			
25			

La elaboración de cada emulsión se efectuó en dos pasos:

1. Prehomogenización, durante la cual se adicionó el aceite de canola a una velocidad de 1.3 mL/min empleando agitación mecánica de líquidos en una sola fase.
2. Homogenización en la cual se añadió aceite de canola a 1 mL/min al sistema hasta una concentración final de 25% de aceite a un amortiguador de fosfatos conteniendo 5% de dextrosa y extracto proteico. La mezcla se homogenizó en

un equipo ESGC (Mettlen, Suiza) at 13,000 rpm por 3 min a temperatura ambiente. La concentración proteica final de la emulsión se determinó por el método de Biuret. La dextrosa se incorporó a la emulsión con el fin de imitar a una emulsión comercial y también para promover la reacción de Maillard.

5.1.4.3 Criterios de elección del sistema modelo

Las formulaciones de los sistemas que no presentaran formación de cremado a las 24 h de elaborados a temperatura ambiente (aproximadamente 18° C) fueron elegidos, de esta manera, se determinó, estudiar dos modelos experimentales incluyendo una fuente de variación y tres variables fijas, dichos modelos experimentales en describen en la Tabla 4.

Tabla 4. Modelos experimentales de emulsiones cárnicas modelo

	Fuentes de variación	Variables fijas	Variables fijas en ambos modelos
Modelo 1	Extracto proteico (%) 20, 25, 30, 35	pH: 7.5	Aceite: 25% $\Gamma = 0.6$
Modelo 2	pH 4.5, 5.5, 6.5, 7.5	Extracto proteico: 35%	Aceite: 25% $\Gamma = 0.6$

Los porcentajes de extracto proteico añadido se eligieron considerando los valores de proteína en tejido muscular para diferentes cortes y especies (Price y Schweigert, 1994) considerando su incremento con el fin de asegurar la obtención de un sistema estable , mientras que la variación del pH en el medio continuo estudió del medio la funcionalidad de las proteínas miofibrilares a valores próximos de su punto

isoeléctrico ($pI=5.2$)

5.1.4.4. Capacidad de emulsificación

La capacidad de emulsificación de los sistemas modelo se evaluó por la resistencia eléctrica que presenta la fase acuosa (proteica) durante la adición de la fase dispersa (lipídica). La técnica empleada fue una modificación de la reportada por Swift y col. (1961) y Hall (1996), modificado por Totosaus (1996) basada en la resistividad eléctrica. Diez mililitros de las formulaciones proteínas miofibrilares-amortiguado (1:4) a pH entre 4.5 y 7.5 se colocaron en un cilindro de de acrílico de 32 mm de diámetro por 100 mm de alto, con un extremo cerrado, al cual se le adaptaron dos alambres de cobre a 10 mm del extremo cerrado (Figura 7); los alambres de conectaron a un multímetro digital (Sanwa Meter, Kowloon, Hong Kong). Se añadió lentamente aceite de canola, con agitación continua de 13,000 rpm. La capacidad de emulsificación se reportó como el número de mililitros de aceite añadidos por gramo de proteína cuando la resistividad se interrumpió. La resistencia eléctrica se evaluó por triplicado, cabe mencionar que esta prueba ayudó a definir los tiempos de la prehomogenización y la homogenización del sistema bajo estudio.

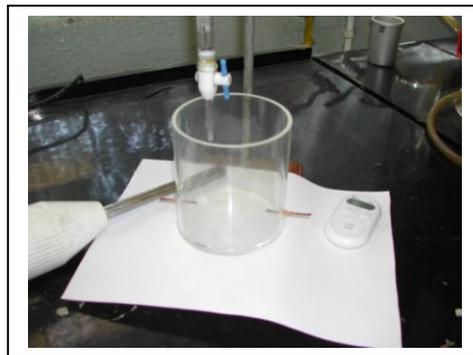


Figura 7. Aditamento empleado para la determinación de la capacidad de emulsificación

5.1.5. Caracterización de la emulsión

5.1.5.1. Distribución de tamaño de partícula

Se llevó a cabo empleando un equipo Malvern Mastersizer, Serie 2600 (Malvern Instruments, Malvern, Inglaterra), en una muestra de la emulsión con una concentración de 0.2% aproximadamente empleando un modelo log normal (MacClemens, 1999) que generó una gráfica de distribución normal del tamaño de partícula así como una tabla con los valores correspondientes al diámetro promedio, diámetro volumétrico y diámetro superficial.

5.1.5.2. Viscosidad aparente

La viscosidad aparente (η_{ap}) se analizó en un viscosímetro Brookfield LVDV-1 (Brookfield Engineering Laboratory, Middleboro, Massachusetts) a una velocidad de deformación de 0.6 rpm, calculando el torque respectivo por una regresión lineal en la región entre 20 y 60% (Steffe, 1996)

5.1.5.3. Microscopía óptica

Una gota de cada una de las emulsiones se colocó directamente sobre un portaobjetos limpio, cuidando de no introducir burbujas al colocar el cubreobjetos sobre la muestra. Se empleó un microscopio Olympus modelo CH30/CH40 (Melville, Nueva York) adaptado con una cámara de 35 mm marca Olympus modelo SC 35. Las observaciones y microfotografías se efectuaron a un aumento de 200x.

5.1.5.4. Microscopía de barrido electrónico

El sistema más estable fue observado con microscopía de barrido electrónico, con el fin de conocer más sobre su estructura, se comparó comparando con otro sistema de formulación semejante a la cual se añadió 0.01% de un emulsificante comercial formulado con una mezcla de polifosfatos (Hamine^{MR}, Proveedores de Empacadoras, México D.F.). Las muestras fueron congeladas empleando un baño de hielo seco y acetona (Kalab, 1983) y se cortaron con un microtomo; se fijaron empleando una solución de formaldehído al 3.5% en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.5, durante 24 h; se eliminó el formaldehído enjuagando 3 veces con la misma solución amortiguadora. Las muestras se deshidrataron empleando una serie de soluciones de etanol (20, 50, 70, 90, 95 y 100%). La postfijación se llevó a cabo empleando una solución de tetróxido de osmio al 1% en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.5. La muestras se secaron con CO₂ (1070 psi a 30°C) en un secador a punto crítico Samdri-780 B (Tousimis Research, Rockville, Maryland), se montaron en portamuestras de aluminio y cubrieron con una capa de carbono, con una segunda capa de 200 a 300 Å de oro, usando un recubridor Bal-Tec SCD 005 (Lichtenstein, Lichtenstein). Finalmente, las muestras fueron observadas en un microscopio Carl Zeiss, modelo DSM-940 A (O'berkohen, Alemania) 30 kV voltaje máximo aplicado; se probaron varias magnificaciones hasta obtener la imagen adecuada.

5.1.6. Ruptura de la emulsión

Con el fin de estudiar la densidad y fracción volumen de la fase dispersa, y la degradación de las proteínas contráctiles en las fases dispersa y continua, y en la interfase, la emulsión se rompió empleando un baño ultrasónico (Danbury, Connecticut) a 25 Hz por 2 h. La emulsión rota se centrifugó a 4,000 rpm por 30 min a 3°C para separar las fases continua y dispersa. Posteriormente se ultrafiltraron las muestras sonicadas empleando tubos Amicon modelo Ultra-15 (Millipore, Carrigtwohill, Irlanda) con membrana de celulosa regenerada, área activa 7.6 cm² y diámetro nominal de corte de 10,000 Da. Los tubos se centrifugaron a 4000 g durante 30 min a 3°C. En el retenido se tuvieron las proteínas miofibrilares (contráctiles y reguladoras) mientras que en el permeado estaban polipéptidos de menor peso molecular y péptidos.

5.1.6.1. Densidad y fracción volumen de la fase dispersa

La determinación de las densidades se efectuó con un picnómetro de vidrio marca Brand (Wertheim Main, Alemania) que se llevó a peso constante. Asimismo se determinó previamente el volumen interno del picnómetro empleando agua destilada como material de referencia; posteriormente se tomó una alícuota de 25 mL de muestra de cada emulsión con los cuales se llenó el picnómetro, se registró la correspondiente lectura del peso, igualmente se efectuó la medición de la densidad correspondiente a cada uno de las fases continuas propuestas. Las densidades de la emulsión antes de la ruptura, así como la densidad de las fases dispersa y continua se relacionaron con la fracción volumen de la fase dispersa por la ecuación MacClemens (1999):

$$\Phi_{FD} = \frac{\rho_e - \rho_1}{\rho_2 - \rho_1}$$

Ecuación 8

donde:

Φ_{FD} – fracción volumen de la fase dispersa

ρ_e – densidad de la emulsión

ρ_1 – densidad de la fase continua

ρ_2 – densidad de la fase dispersa

5.1.6.2. Determinación de la concentración de proteína en las emulsiones y fases

Se determinó como se describe en la Sección 4.1.3.1., salvo que se analizaron diluciones 1:50 emulsión-amortiguador de fosfatos 0.01M, pH=7.5

5.1.6.3. Degradación de proteínas en las fases continua y dispersa

El peso molecular de las proteínas en las fases dispersa y continua se llevó a cabo en el retenido y perneado obtenidos de la ultrafiltración en tubos Amicon modelo Ultra-15 (Millipore, Carrigtwohill, Irlanda), por electroforesis SDS, según se describe en la Sección 4.1.3.1.

5.2. Contribución de las fases de la emulsión a la liberación de compuestos volátiles indicadores

La Figura 8 muestra la estrategia experimental para el estudio de la contribución de los volátiles en las fases dispersa y continua de la emulsión modelo, a la percepción del aroma cárnico (Bodrero y col., 1981; Bading y De Jong, 1984), a través del estudio de cinco compuestos odoríferos indicadores.

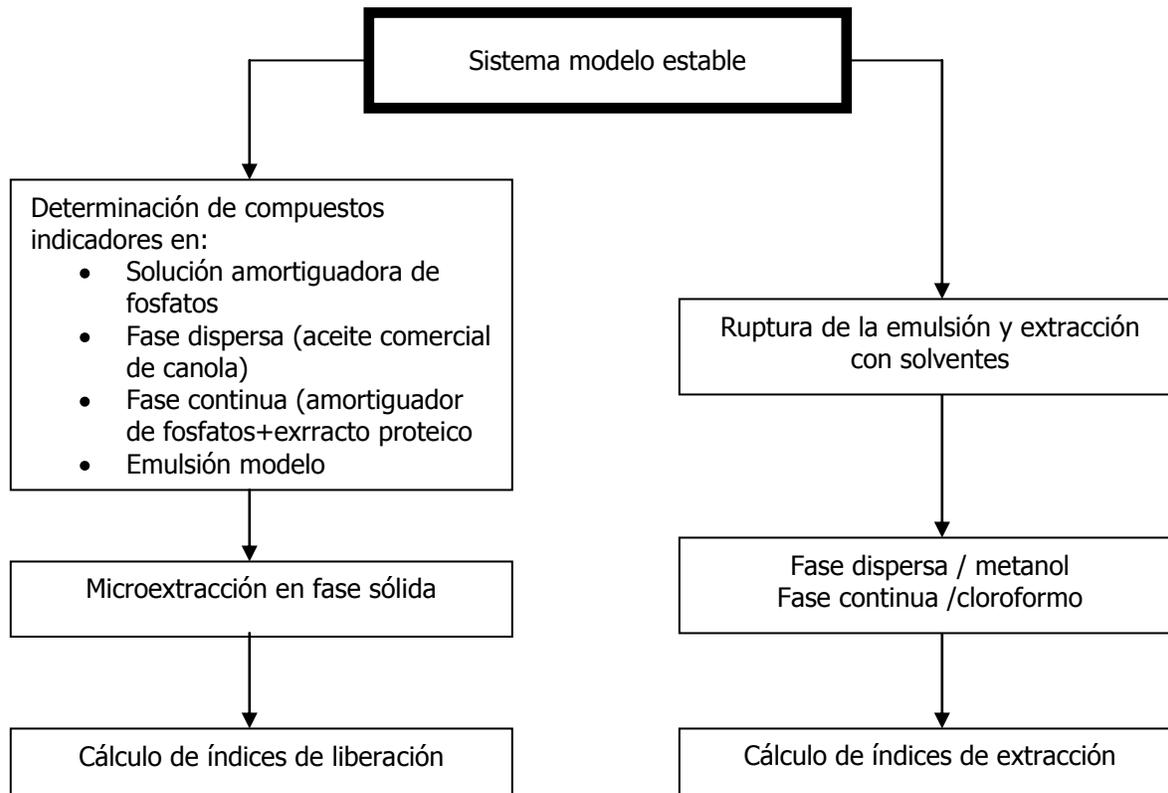


Figura 8. Estrategia experimental para estudiar la contribución a la percepción del aroma cárnico de las fases continua y dispersa de la emulsión.

5.2.1. Microextracción en fase sólida de los compuestos indicadores de la emulsión, y de fases continua y dispersa

Con el objetivo de conocer los índices de liberación de los cinco compuestos indicadores de aroma cárnico, se llevó a cabo un proceso de microextracción en fase sólida. Los sistemas estudiados fueron los siguientes:

- I) aceite comercial de canola
- II) amortiguador de fosfatos 0.01 M, pH=7.5
- III) amortiguador de fosfatos 0.01 M, pH=7.5 + extracto proteico al 35% (3.189 mg_{proteína}/mL)
- IV) emulsión cárnica modelo, definida como la más estable a partir de las

pruebas indicadas en la Sección 4.1.; esta consistió en la siguiente formulación:

Fase dispersa: extracto de proteínas miofibrilares: 35% (3.189 mg_{proteína}/mL)

amortiguador de fosfatos 0.01 M, pH =7.5

dextrosa anhidra: 0.01%

Fase continua: aceite comercial de canola: 25%

pH 7.5, $\Gamma=0.6$ (con NaCl)

A cada sistema se incorporaron los tres aldehídos indicadores de aroma (hexanal, octanal y nonanal, con 98% de pureza (Sigma, Toluca, México) y dos pirazinas (1-etil-3,5-dimetil pirazina y 2-metil pirazina, 96% de pureza (Sigma) en concentraciones de 0, 2.0, 3.25, 5.0, 6.25 y 7.5 ppm.

Cada uno de los sistemas estudiados, una vez que se les incorporaron los volátiles indicadores, se colocaron en viales ámbar de 22 mL cuya boca se adaptó con un septo PTFE/silicón (Supleco, Bellefonte, Pensilvania) y se cerró con un tapón mono horadado; para evitar fugas se hizo un recubrimiento con película parafilm M. Los viales se dejaron en reposo por 5 min a 25°C para lograr un equilibrio entre las fases líquida y gaseosa, hacia la cual se liberó el compuesto volátil. Los cinco compuestos indicadores se recolectaron de la fase gaseosa por microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés, solid phase microextraction), empleando la técnica de análisis estático en espacio vacío (Escalona y col. 1999; Estévez y col., 2003),

para lo cual se emplearon fibras de adsorción PDMS/DVB (Supleco, Bellefonte, Pensilvania), expuestas por 2 min en el espacio vacío a 20°C. La desorción de los volátiles se llevó a cabo colocando la fibra durante 5 min a 250°C en el inyector de un cromatógrafo de gases, marca Shimadzu, modelo GC-21010 (Kyoto, Japón); las condiciones de operación fueron: 31.69 psi; flujo total del gas acarreador: 4.1 mL N₂/min; temperatura inicial del horno: 40°C con un incremento de 4 min hasta una temperatura final de 200°C. El equipo estaba adaptado con una columna HP-Wax, 0.2 μm diámetro interno, 0.2 μm grosor del recubrimiento, 50 m de longitud. El detector de ionización de flama trabajó a 260°C, flujo de H₂ de 35 mL/min, flujo aire de 350 mL/min y flujo de la mezcla gas de 35 mL/min

La concentración de los compuestos liberados de cada sistema estudiado en el espacio vacío se comparó con una concentración conocida de compuestos puros. La liberación de los compuestos indicadores se calcularon a partir de la siguiente ecuación (Seuvre y col., 2002):

$$k = C_v/C_L \quad \text{Ecuación 9}$$

donde:

k – índice de liberación

C_v – concentración de compuestos puros añadidos al sistema

C_L – concentración de compuestos indicadores liberados del sistema

5.2.2. Cuantificación de los compuestos indicadores por extracción con solventes

La distribución de los compuestos indicadores de las fases continua (fase lipídica) y dispersa (fase acuosa) del sistema modelo a través del análisis de los índices de extracción de dichos compuestos, por extracción con dos solventes: cloroformo y metanol

5.2.2.1. Extracción de volátiles con cloroformo y metanol

Se elaboraron emulsiones modelo, como se describe en la Sección 4.1. En éstas se añadieron las mismas concentraciones de compuestos indicadores empleadas en la microextracción en fase sólida descrita en la Sección 4.2.1. (0, 2.0, 3.25, 5.0, 5.25 y 7.5 ppm), para cada compuesto odorífero (hexanal, octanal y nonanal, con 98% de pureza; 2-etil-3,5-dimetil pirazina y 2-metil pirazina con 96% de pureza (Sigma). Se determinó previamente el tiempo de retención al analizarlo por cromatografía de gases

La extracción de compuestos en la fase lipídica se llevó a cabo con metanol, mientras que para la fase acuosa se empleó cloroformo, lo anterior, considerando los valores de polaridad de cada solvente empleado y el carácter de la fase a tratar.

Un gramo de la emulsión se mezcló con 4 mL de metanol (Baker grado HPLC, Xalostoc, México). Las emulsiones se rompieron en un baño ultrasónico, por el método reportado por De Pereda y col. (2001) que consiste en sonicar por 10 min a 47 KHz. Las fases se separaron empleando 2 ciclos de 1 h de centrifugación a 3000 rpm. Las muestras obtenidas, tanto las extraídas con metanol como con cloroformo,

se guardaron en viales de vidrio (Alltech, Deerfield, Illinois) cerrados con sellos de aluminio y tapón plástico 144/PK (Alltech).

Las disoluciones se analizaron en un cromatógrafo de gases marca Hewlett Packard, modelo 6890, con un inyector de tipo split (relación 1.0), con flujo de 35 mL/min. El gas acarreador (N₂) tuvo un flujo total de 41.9 mL/min, a 250°C, presión 14.9 psi. El horno tuvo una temperatura inicial de 40°C, con temperatura final de 200°C e incrementos de 7°C/min, se empleó una columna HP-Wax, 0.2 µm diámetro interno, 0.2 µm grosor del recubrimiento, 50 m de longitud y el detector de ionización de flama trabajó a 260°C, flujo de H₂ de 35 mL/min, flujo aire de 350 mL/min y flujo de la mezcla gas de 35 mL/min

5.2.2.2. Curvas de calibración

La extracción de los compuestos indicadores de la fase dispersa (lipídica) se llevó a cabo con un solvente polar. En forma inversa se empleó cloroformo, un solvente no polar, para extraer los compuestos indicadores de la fase polar continua (acuosa). La curva de calibración se elaboró a partir de soluciones madre de 10 ppm de cada uno de los aldehídos y las pirazinas estudiadas, empleando metanol como disolvente para la fase dispersa y cloroformo para la continua. A partir de la solución madre se tomaron diluciones con el fin de tener concentraciones de 2.5, 3.25, 5.0, 6.25 y 7.5 ppm, las cuales fueron analizadas por cromatografía de gases con las condiciones descritas anteriormente, inyectando 1 µL en el puerto del inyector. De esta forma se obtuvieron las áreas bajo la curva para cada compuesto indicador, extraídos de las

fases dispersa y continua del sistema modelo.

5.2.2.3. Determinación de los índices de extracción

Los resultados de las extracciones de compuestos indicadores empleando metanol en la fase lipídica y cloroformo en la fase dispersa se reportaron como índices de extracción (k_{ext}). De forma similar al índice de liberación, el de extracción se calculó de la siguiente ecuación:

$$k_{ext} = C_{ext_v} / C_{ext_L} \quad \text{Ecuación 10}$$

donde:

k_{ext} – índice de extracción

C_{ext_v} – concentración de compuestos puros extraídos del sistema

C_{ext_L} – concentración de compuestos indicadores extraídos del sistema

5.3. Diseño experimental y análisis estadístico

5.3.1. Formulación de la emulsión modelo

Con el fin de obtener la formulación de la emulsión más estable, se estudiaron dos diseños experimentales, que se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5. Formulaciones de las emulsiones cárnicas modelo

Emulsión modelo*	Fuente de variación	Variables fijas
1	Extracto proteico (%) 20, 25, 30, 35	pH 7.5
2	pH 4.5, 5.5, 6.5, 7.5	35% extracto proteico

* variables fijas en ambos modelos: 25% aceite de canola; $\Gamma=0.6$

Las variables de respuesta para ambos diseños fueron: pH, capacidad de emulsificación, tamaño de partícula, distribución de tamaño de partícula, viscosidad aparente, densidad y fracción volumen de la fase dispersa.

5.3.2. Análisis de volátiles por microextracción en fase sólida

Las muestras se asignaron a un diseño totalmente al azar (Steel y Torrie, 1988) en el que se confundieron los efectos de concentración inicial del volátil (2.5, 3.25, 5.0, 6.25 y 7.5 ppm), sistema empleado (amortiguador, amortiguador+proteínas, aceite de canola y emulsión modelo) y compuestos indicadores (hexanal, octanal, nonanal y 1-

etil-3,5-dimetil pirazina y 2-metil pirazina). Posteriormente se emplearon tres diseños de bloques divididos (Steel y Torrie, 1988), con la siguiente distribución:

Tabla 6. Microextracción en fase sólida: diseño en bloques subdivididos

Diseño Experimental	Bloque principal	Subbloques	
I	Concentración inicial de volátiles	Compuestos indicadores	Sistema empleados
II	Sistemas empleados	Concentración inicial de volátiles	Compuestos indicadores
III	Compuestos indicadores	Concentración inicial de volátiles	Sistemas empleados

5.3.3. Análisis de volátiles por extracción con solventes

El diseño experimental fue similar al descrito en la Sección 4.3.2. En un primer análisis, se confundieron los efectos de solventes (metanol y cloroformo), concentraciones iniciales de volátiles (2.5, 3.25, 5.0, 6.25 y 7.5 ppm) y compuestos indicadores estudiados (hexanal, octanal, nonanal y 1-etil-3,5-dimetil pirazina y 2-metil pirazina). En un segundo análisis se empleó un diseño de bloques divididos, como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Extracción con solventes: diseño en bloques subdivididos

Diseño Experimental	Bloque principal	Subbloques	
I	Concentración inicial de volátiles	Compuestos indicadores	Solventes
II	Solvente	Concentración inicial de volátiles	Compuestos indicadores
III	Compuestos indicadores	Concentración inicial de volátiles	Solventes

Los datos obtenidos de las Secciones 4.3.1., 4.3.2. y 4.3.3. se sujetaron a un procedimiento de Análisis de Varianza (ANOVA) y Prueba Múltiple de Medias de Duncan, empleando un programa SAS (SAS Institute, 1999, Cary, Carolina del Norte), los análisis se llevaron a cabo por triplicado a $\alpha = 0.05$.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Formulación y estudio de la emulsión modelo

6.1.1. Fracción lipídica

La extracción de la fase lipídica de cerdo llevada cabo en forma directa con disolventes dio como resultado una cantidad muy pequeña de lípidos

(0.9167 mL/100 g carne), por lo que se consideró para la sustitución de esta fuente, al aceite de canola por su composición lipídica (61% de grasas monoinsaturadas, 11% de ácidos grasos omega 3 y 21% de ácido linoléico) (Badui, 2006) lo que lo coloca como una buena opción para el desarrollo de productos bajos en grasa, asimismo, los estudios de vida de anaquel para este aceite informan que el desarrollo de rancidez oxidativa es menor, al compararse con otros aceites tales como el de maíz, girasol y oliva (www.canola-council.org), de esta manera, se empleó para conformar la fase dispersa de las emulsiones.

6.1.2. Fracción proteica

Contenido proteico

Tuvo una concentración de 3.189 mg_{proteína}/mL de extracto obtenido, se analizó por el método de biuret (Anexo I). Considerando esta concentración de proteína en el extracto proteico, las concentraciones promedio de proteína en las emulsiones formadas fueron las indicadas en la Tabla 8.

Tabla 8. Concentración promedio de proteína de las emulsiones estudiadas (25% aceite de canola)

pH	extracto proteico (%)	Proteína (mg/mL)
7.5	20	0.495
	25	0.827
	30	1.016
	35	2.209
4.5		1.765
5.5		2.018
6.5	35	2.448
7.5		2.209

*media de tres determinaciones

pH

El pH del extracto proteico obtenido fue 5.66 (± 0.0208). Este valor sugirió que el animal había sido sacrificado hacía pocas horas, ya que el pH final de la carne obtenida en condiciones adecuadas de sacrificio es 5.5. Cuando se inician los procesos de descomposición, el pH puede subir a valores superiores a 6.0

(Lawrie, 1985). Dado que el punto isoeléctrico para las proteínas miofibrilares es cercano a 5.5 (Totosaus, 1996) se presenta una tendencia a la precipitación (Borderías y Montero, 1988) lo que disminuye su solubilidad y, en consecuencia, su funcionalidad; de acuerdo con el pH del extracto proteico las proteínas miofibrilares presentes potencialmente mantuvieron su funcionalidad.

Pesos moleculares de las proteínas extraídas

La Figura 9 presenta los pesos moleculares obtenidos en el extracto proteico.

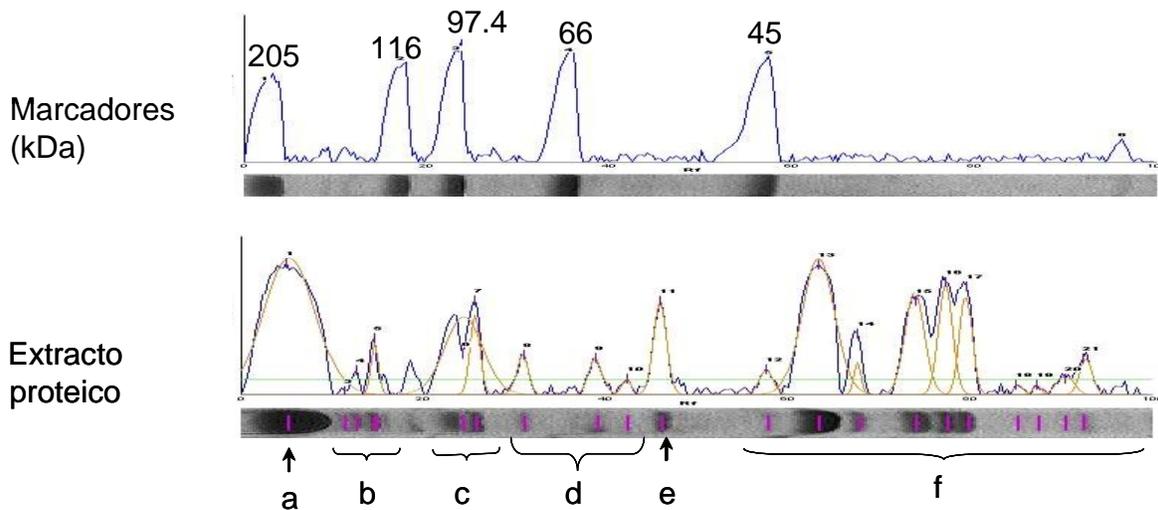


Figura 9. **Pesos moleculares de proteínas en el extracto proteico**
a: miosina; b: 100 80 kDa; c: 80 a 65 kDa;
d: proteínas intermediarias o reguladoras; e: <45 kDa

En el extracto proteico se observaron miosina (>200 kDa) (a), picos menores entre 120 y 100 kDa (b); 100 y 80 kDa (c) y 80 a 65 kDa (d), correspondientes a proteínas intermediarias (alrededor de 100 a 75 kDa) o reguladoras (80 a 60 kDa); así como las correspondientes a 60 a 50 kDa (e) y <45 kDa (f), relacionadas con productos de degradación. La banda de miosina (a) es la más abundante, determinando la capacidad de emulsificación del sistema; su degradó se evidenció con la disminución del pico correspondiente y la aparición de bandas de menor pesos molecular <45 kDa (f) Este hecho fue reportado por Lawrie, (1985) quien lo atribuye a un proceso de desnaturalización iniciado cuando ocurre la muerte del animal; además que los procesos de homogenización también contribuyeron a la degradación.

6.1.3. Formación de la emulsión

Proporciones extracto proteico / aceite de canola

Inicialmente, se observó la estabilidad de emulsiones con las proporciones de aceite de canola y extracto proteico indicadas en la Tabla 9, empleando proporciones de 5 al 25% de aceite, de 15 al 25% de extracto proteico y el porcentaje restante de amortiguador de fosfatos; a estas mezclas se les realizó una prueba preliminar de cremado ó formación de un anillo. Los sistemas más estables fueron los compuestos

de 20 a 25% de extracto proteico y 25% de aceite.

Tabla 9. Formación de anillo en los emulsiones preliminares (25% de aceite)

	% extracto proteico			
	20	25	30	35
pH				
4.5	si	si	si	si
5.5	si	si	si	si
6.5	si	si	no	no
7.5	no	no	no	no

Con base en esta prueba preliminar, se decidió diseñar dos sistema modelo, cuyas proporciones de fase continua/fase dispersa, pH y fuerza iónica se muestran en la Tabla 9. Estas emulsiones se caracterizaron, con los resultados que se discuten a continuación.

Capacidad de emulsificación

Como se esperaba, la capacidad de emulsificación aumentó con la concentración de proteína (desde 8.89 a 11.74 mL_{aceite}/g_{proteína}) (Figura 5); se observó una diferencia significativa ($P < 0.001$) entre las concentraciones 30 a 35% de extracto proteico; la capacidad de emulsificación también aumento con el pH (6.32 a 8.581 mL_{aceite}/g_{proteína} a pH 4.5 y 7.5, respectivamente). Aunque el punto isoeléctrico de las proteínas miofibrilares es alrededor de 5.5, donde la capacidad de emulsificación está en su

mínimo valor, en el intervalo de pH entre 4.5 y 5.5 no se observó diferencia significativa ($P>0.01$) con respecto a la capacidad de emulsificación a una concentración fija de proteína; de forma inversa, entre pH 6.5 y 7.5 si se observó una diferencia significativa (Tabla 10).

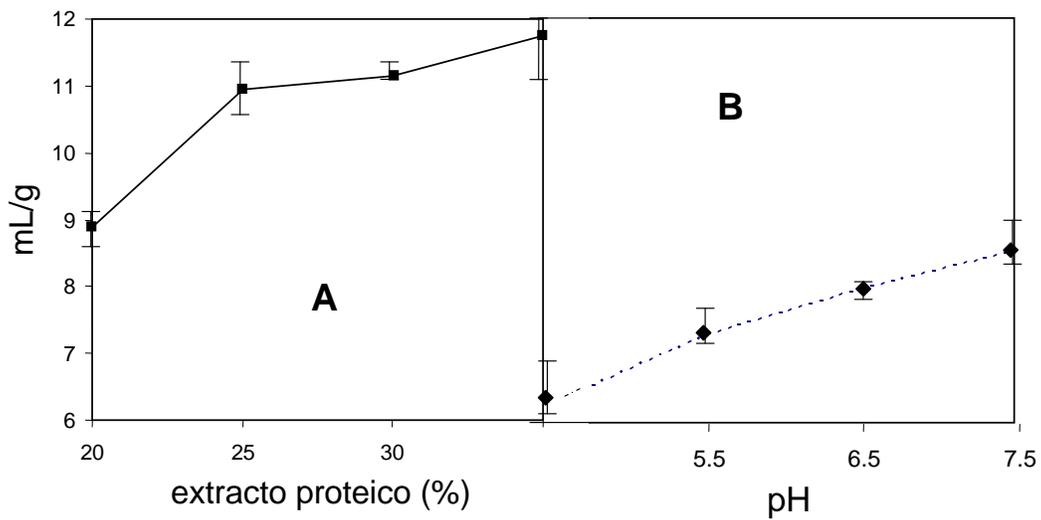


Figura 10. Capacidad de emulsificación en los sistemas estudiados
A: pH fijo (7.5); B: % extracto proteico fijo

Tabla 10. Comparación múltiple de medias de Duncan: capacidad de emulsificación (CE), viscosidad aparente (η_{ap}), tamaño medio de partícula ($D_{3,2}$), densidad (ρ) y fracción volumen de la fase dispersa (ϕ_{FD}) de emulsiones modelo, variando pH y concentración proteica.

volumen	CE	$D_{3,2}$	η_{ap}	ρ
	Fracción (mL _{aceite} /g _{proteína})	(μm)	(poise)	(g/mL)
				(ϕ_{FD})

Variables fijas: 25% aceite de canola, 35% extracto proteico,

$\Gamma=0.6$

pH

4.5 6.329a* 37.6a 62.1a 1.0184a

0.2692a

5.5 7.338a 36.2a 93.1a 1.0284a

0.3067a

6.5 8.016b 5.5b 112.5b 1.0275a

0.4311c

7.5 8.581c 3.4c 212.0c 1.0274a

0.7713d

Variables fijas: 25% aceite de canola, pH 7.5, $\Gamma=0.6$

**% extracto
proteico**

20 8.89a 27.1a 50.5a 0.9196a**

0.0664a

25 10.94a 26.9b 131.2b 0.8751a

0.4419b

30 11.15a 2.9c 157.0b 0.8547a

0.6689c

35 11.74b 2.8c 212.3c 0.8456a

0.7713d

* valores medios

** diferentes letras en una columna indican diferencia significativa ($\alpha=0.05$)

El proceso de emulsificación desnaturaliza parcialmente a las proteínas, aumentando su capacidad de emulsificación (Voutsinas y col., 1983). Fischer y Widder (1997) reportaron que la desnaturalización parcial de proteína en medio acuoso cambia la configuración tridimensional exponiendo sitios reactivos, ya sean

hidrofílicos o promotores de interacción dipolo-dipolo, por lo que aumenta la capacidad de las proteínas de formar interfases. La degradación parcial de las proteínas observada por electroforesis, que se discute a continuación, aumenta la capacidad de emulsificación. Por tanto, la homogenización llevada a cabo para la formación de las emulsiones tuvo un efecto profundo en la configuración de las proteínas, pero también contribuyó a aumentar la capacidad de emulsificación.

Distribución del tamaño de partícula

En una prueba preliminar se analizaron los tamaños de partícula de las emulsiones cuya formulación se indica en la Tabla 3; los resultados de tamaño de partícula se reportan en la Tabla 10. Se encontró que en algunos casos las emulsiones fueron muy inestables y por tanto no se pudo llevar a cabo su análisis.

Tabla 11. Valores medios de tamaño de partícula de emulsiones preliminares, μm (media, σ)

pH	% extracto proteico			
	20	25	30	35
4.5	N.A	N.A	N.A	N.A
5.5	N.A	N.A	N.A	37.595 (0.289)
6.5	53.24 (0.565)	40.795 (0.021)	34.345 (0.516)	6.4 (0.084)
7.5	37.67 (0.028)	32.475 (0.148)	3.55 (0.014)	3.5 (0.014)

* valores medios de dos determinaciones
 NA – emulsiones inestables, no analizadas

A partir de estos resultados, se repitió el análisis con las formulaciones indicadas en la Tabla 4, cuyos valores medios y comparación de medias de Duncan se indica en la Tabla 10; la Figura 11 muestra los valores medios del tamaño de partícula en las emulsiones modelo. Las emulsiones modelo mostraron una distribución de tamaño monodispersa (Anexo III) que decreció significativamente ($P < 0.001$) al aumentar el pH y la concentración de proteína.

Con una distribución de tamaño de partícula similar en un medio con fuerza iónica media, las diferencias en la viscosidad de la emulsión se debió a la forma y carga de las partículas (Miettinen y col., 2002). Debido a que las proteínas miofibrilares son moléculas de muy alto peso molecular, se comportan como partículas en suspensión (Li-Chan y col. 1985), por tanto, la estabilidad del sistema depende de factores coloidales como la fuerza iónica, la forma de las partículas, así como a carga superficial y la distribución de estas (Van Ruth y col., 2002; Dickinson, 1992).

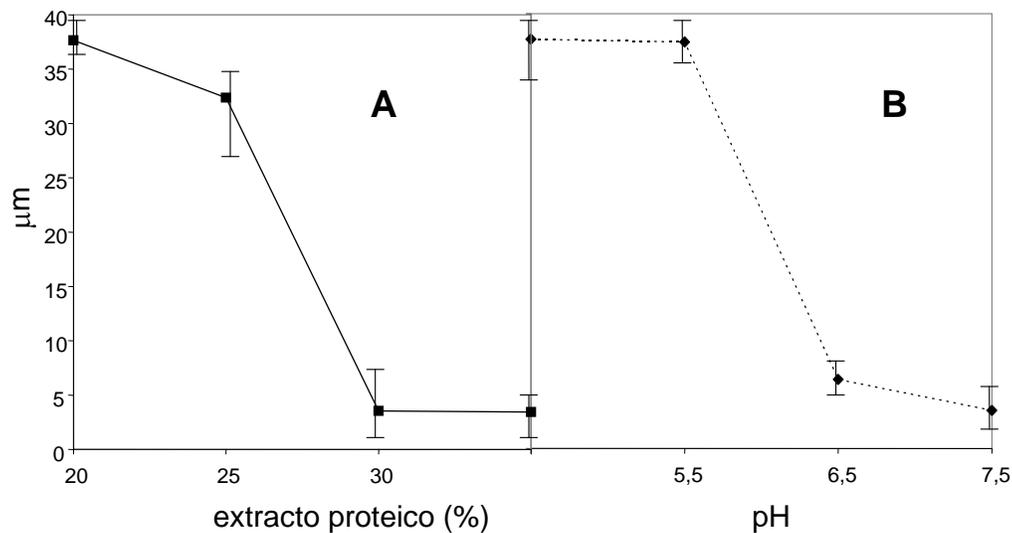


Figura 11. **Tamaño medio de partícula (μm) en los sistemas estudiados**

Viscosidad aparente (η_{ap})

La Figura 12 muestra la viscosidad de las emulsiones modelo, a

diferentes torques. De estas condiciones de análisis, se eligió una agitación de 6 rpm ya que con este torque se localizaba el inicio de la región lineal. Se observó un comportamiento pseudoplástico en las emulsiones, ya que la viscosidad aparente disminuye a medida que aumenta el esfuerzo cortante (Muller, 1973).

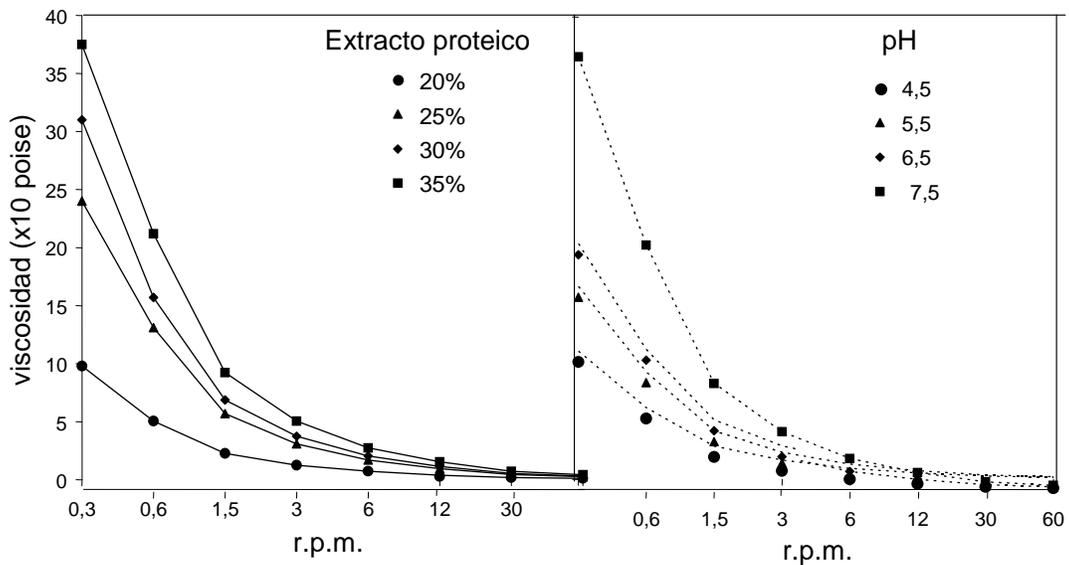


Figura 12. Viscosidad aparente (η_{ap}) de las emulsiones modelo, a diferentes torques

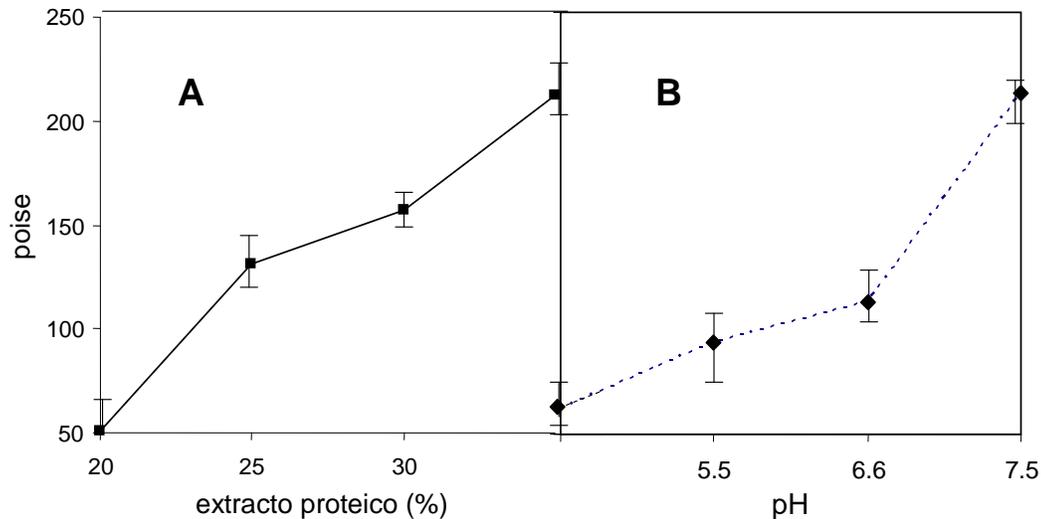


Figura 13. Viscosidad aparente (η_{ap}) de los sistemas estudiados

Tanto con el incremento del porcentaje de proteína como de pH, la viscosidad de las emulsiones aumentó, registrándose las mayores variaciones con 35% de extracto proteico y pH 7.5. Este comportamiento concuerda con el reportado por Li-Chan y col. (1985); estos autores también observaron un incremento marcado en la viscosidad aparente de soluciones de actomiosina de cerdo. El incremento de viscosidad, conforme el pH del medio continuo se aleja del punto isoeléctrico de las proteínas miofibrilares, se debe a la desnaturalización de las proteínas, produciéndose mayor hidratación y volumen hidrodinámico de estas (MacClemens, 1999). Lo anterior afecta su conformación y exhibe tanto regiones hidrófobas como hidrofílicas, éstas últimas se repelen entre sí, por lo que la fricción intrínseca del sistema se incrementa; dicho mecanismo se presenta a nivel intermolecular (interacciones proteína-proteína) ya que el número de moléculas de proteína en la

fase dispersa se incrementa. Aunque la viscosidad de los sistemas con 35% aumentó considerablemente con el pH (Anexo II y Tabla 10), estos valores observados fueron consistentemente menores que los observados en los sistemas en los que se varió la concentración de proteína (pH fijo 7.5). Un aumento no significativo ($P > 0.01$) en η_{ap} (62.1 a 93.1 poise) se observó a pH 4.5 y 5.5, respectivamente, lo que se debió a que no se generó una carga superficial. De forma inversa, el aumento a pH 6.5 dió como resultado una reducción de las cargas positivas netas, y una reducción del tamaño de partícula a $D_{3,2} = 5.5$, mientras que η_{ap} aumentó a 112.5 poise. Este aumento fue más marcado cuando el pH aumentó de 6.5 a 7.5, cuando η_{ap} aumentó a 212 poise, y $D_{3,2}$ decreció significativamente ($P < 0.001$) a $3.43 \mu\text{m}$.

Microscopía óptica

En las microfotografías de las emulsiones en que se varió el porcentaje de extracto proteico se observó que conforme se incrementa éste, el tamaño del glóbulo es más pequeño (Figura 14), las observaciones hechas corrobora también el aumento en la fracción volumen de la fase dispersa. Asimismo, al incrementar el pH del medio, el tamaño de glóbulo disminuyó.

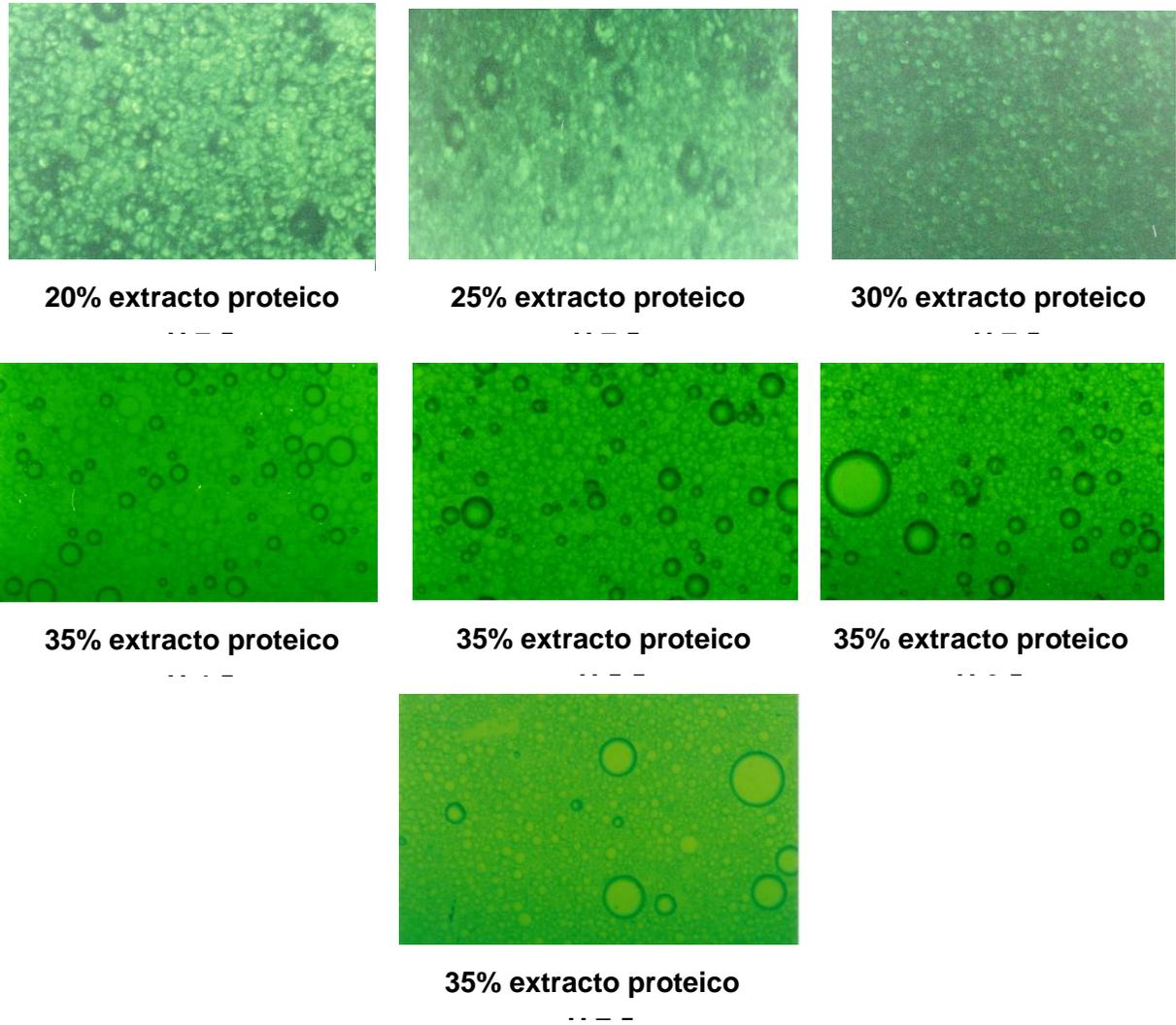


Figura 14. **Microscopia óptica de emulsiones modelo**

Microscopía de barrido electrónico

El sistema más estable correspondió a la formulación con 35% extracto proteico y 25% aceite, pH 7.5 y se observó con microscopio de barrido electrónico; esta estructura se comparó con una formulación añadida con un emulsificante comercial

(Figura 15).

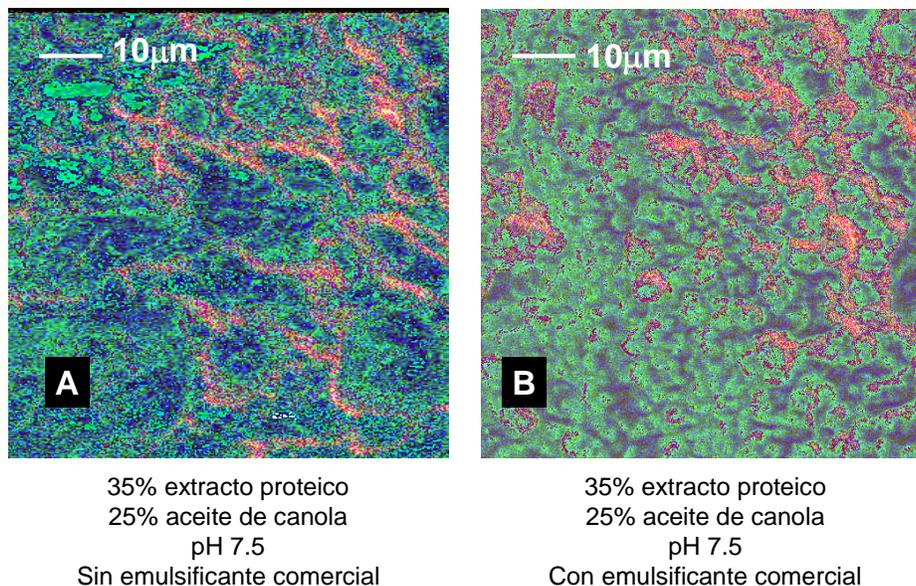


Figura 15. Microscopía de barrido electrónico de la emulsión modelo más estable y una emulsión formulada con un emulsificante comercial.

Al emplear un emulsificante comercial, mezcla de polifosfatos, se observó una distribución más homogénea del tamaño de glóbulo (Figura 10-B) y de menor tamaño. La emulsión sin emulsificante comercial (Figura 10-A) mostró tamaños irregulares de partícula, y glóbulos de tamaño considerablemente mayor, lo que contribuyó a su inestabilidad.

6.1.5. Caracterización de las fases de la emulsión

Densidad

La densidad de los sistemas estudiados fue un dato necesario para calcular la

fracción volumen de la fase dispersa. La Figura 16 muestra las densidades en ambos sistemas. Es de hacer notar que la densidad en el sistema a pH constante fue inferior a la del sistema con una concentración de extracto proteico constante. En ambos casos, la densidad permaneció dentro de un intervalo pequeño al incrementar la concentración de proteína o al aumentar el pH, por lo que los valores medios no fueron significativamente diferentes en las dos emulsiones modelo (Anexo II). A mayor cantidad de proteína mayor cantidad de aceite emulsificado (Tabla 10), y por tanto menor densidad (MacRichie, 1990).

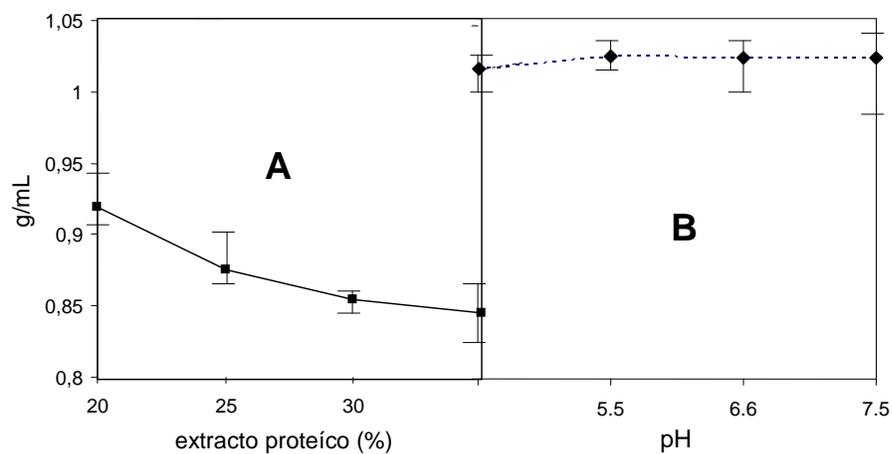


Figura 16. Densidad de los sistemas estudiados
A: pH fijo (7.5); B: % extracto proteico fijo

Fracción volumen fase dispersa

La Figura 12 muestra la variación en la fracción volumen de la fase dispersa en las dos emulsiones modelo estudiadas.

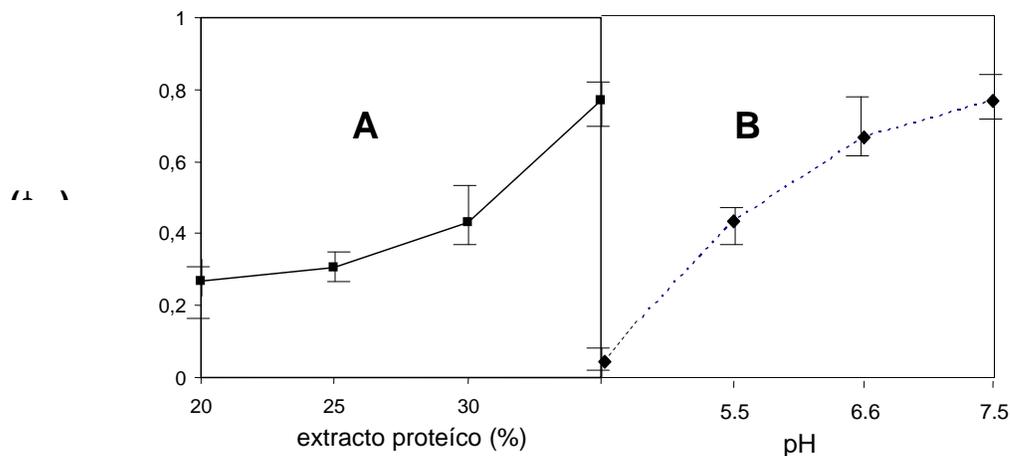


Figura 17. Fracción volumen de la fase dispersa (ϕ_{FD}) de los sistemas estudiados

La fracción volumen de fase dispersa en ambas emulsiones modelo tuvo una tendencia al aumento conforme se incrementó la cantidad de extracto proteico añadida, y el pH del medio continuo, mostrando diferencias significativas ($P < 0.001$) (Tabla 10 y Anexo II). Se observó un incremento mayor en la emulsión modelo con diferentes porcentajes de extracto proteico ($\Delta\phi_{FD} = 0.7123$) que en la emulsión con pH variable ($\Delta\phi_{FD} = 0.5721$), debido a que al variar la concentración de proteína hubo mayor incremento en la actividad interfacial, dando como resultado una disminución en el tamaño de partícula, como se discute con anterioridad, por lo tanto se aumentó la incorporación de la fase dispersa. De forma contraria, al variar el pH la incorporación de aceite a la emulsión fue menor (Tabla 10); el mayor incremento se tuvo a pH 7.5, valor en el cual las proteínas miofibrilares, al encontrarse lejos del punto isoeléctrico aumenta su capacidad de emulsificación.

Degradación de las proteínas en las fases continua y dispersa

La Figura 18 muestra los pesos moleculares de las proteínas en las fases dispersa y continua de una emulsión con 35% de proteína a pH 7.5.

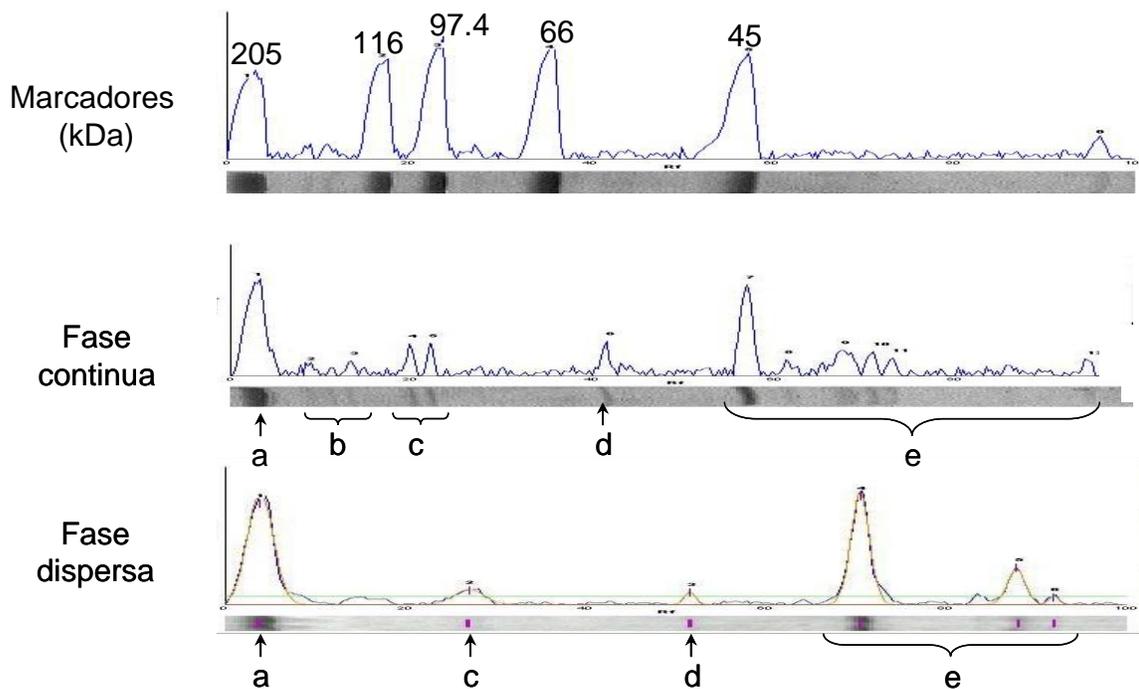


Figura 18. **Pesos moleculares de proteínas en las fases continua y dispersa**

**a: miosina; b: 100 80 kDa; c: 80 a 65 kDa;
d: proteínas intermediarias o reguladoras; e < 45 kDa**

Los Anexos IV a VII muestran las electroforesis de las proteínas presentes en las fases continua y dispersa de las dos emulsiones

modelo. Como se esperaba, las proteínas estuvieron presentes en mayor abundancia en la fase continua (amortiguador de fosfatos) que en la dispersa (aceite de canola), debido a la solubilidad de estas en un medio con fuerza iónica media. Sin embargo, la miosina (a) estuvo presente en cantidades similares en la fase continua y en la dispersa; esta proteína se adsorbe en interfaces aceite/agua, y se solubiliza parcialmente en la fase acuosa. La miosina, junto con la actomiosina, se han reportado como las principales proteínas responsables de las propiedades funcionales del sistema muscular estriado (Li-Chan y col., 1985). La presencia de proteínas menores, de 100 a 80 kDa y de 80 a 65 kDa, fue también evidente en la fase dispersa, posiblemente unidas a la interfase. Las proteínas miofibrilares se repartieron entre la interfase y la fase continua. La concentración proteica alta en las emulsiones favorece la interacción proteína-proteína (Gianelli y col., 2003), aunque también se favorece la interacción proteína-lípido a través de grupos no polares en la interfase (Phillipe y col., 2003). Por otro lado, la degradación parcial de las proteínas debida a los procesos de homogenización y de centrifugación aplicados se observó por la presencia de picos de peso molecular de 66 kDa o menos, favoreció

el aumento en la capacidad de emulsificación.

6.2. Microextracción en fase sólida de los compuestos indicadores de la emulsión, y de fases continua y dispersa

6.2.1. Liberación de compuestos volátiles indicadores

De acuerdo a la ecuación reportada por Seuvre y col. (2002) (Sección 5.2.2.3) se calculó el índice de liberación k . Las Figuras 19 a 23 muestran los índices de liberación de los cinco compuestos indicadores estudiados.

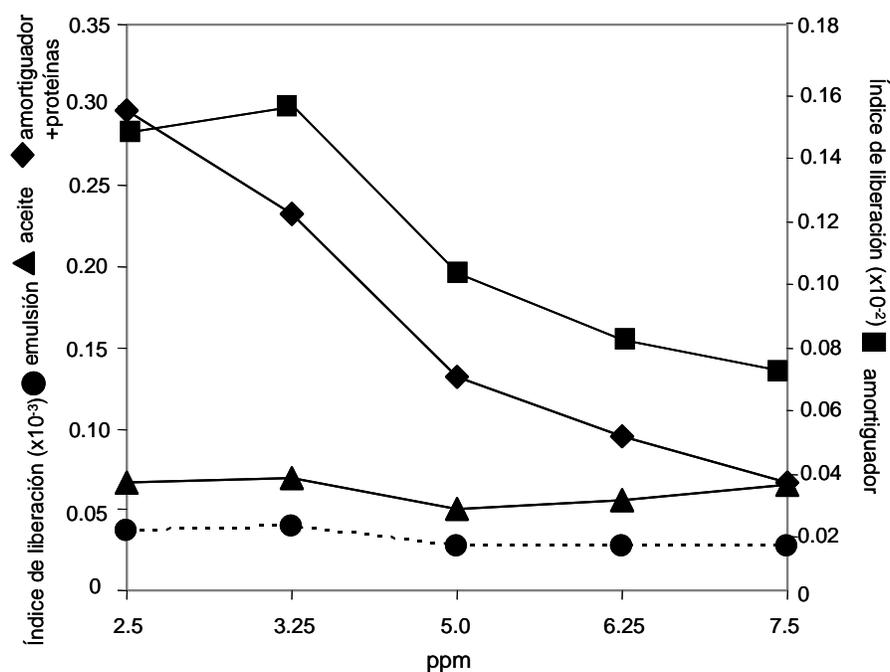


Figura 19. Índices de liberación (k) de 2-metil pirazina en los cuatro

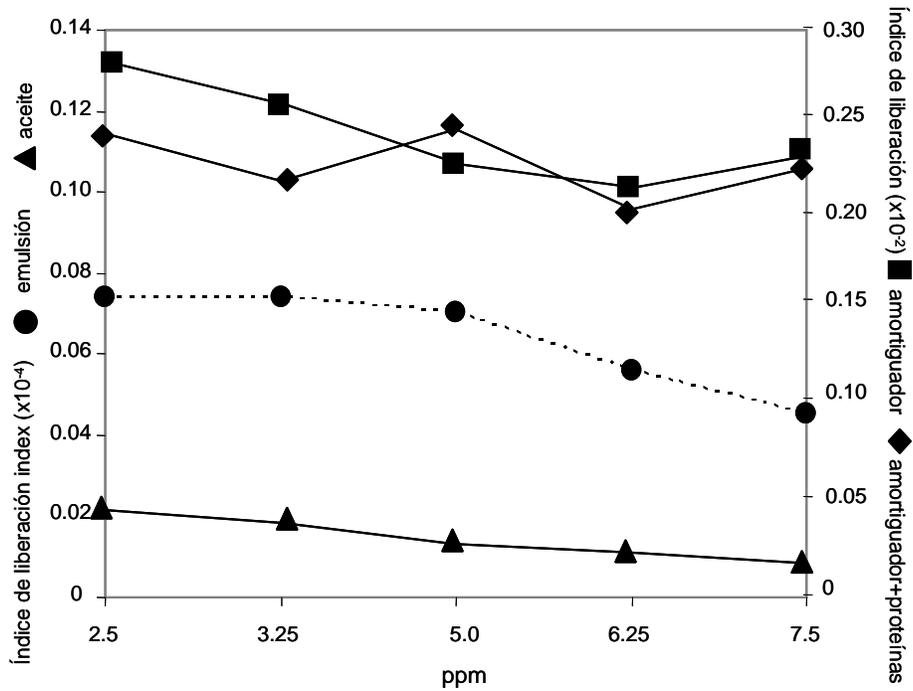


Figura 20. Índices de liberación (k) de 2-etil-3,5- pirazina en los

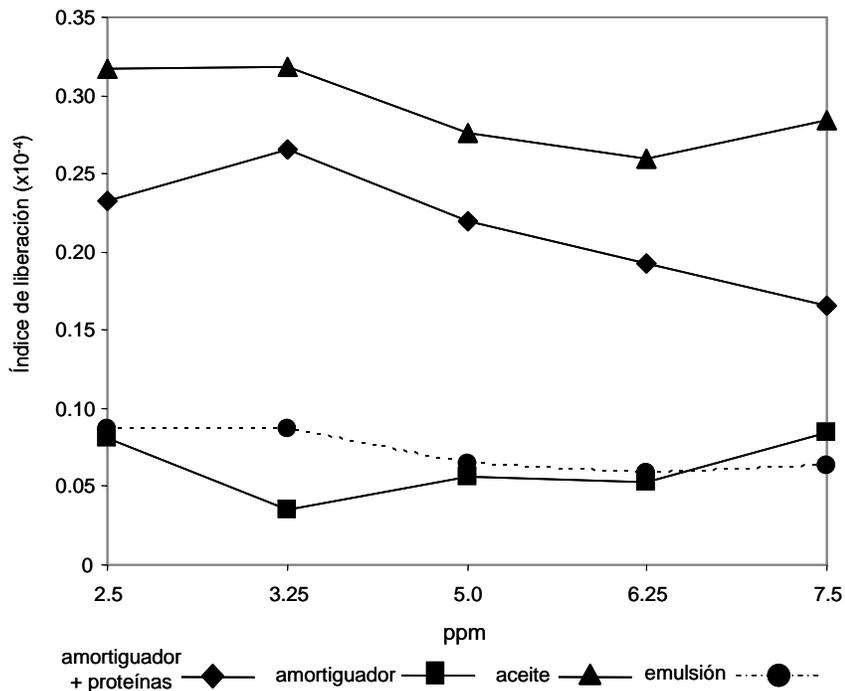


Figura 21. Índices de liberación (k) de hexanal en los cuatro

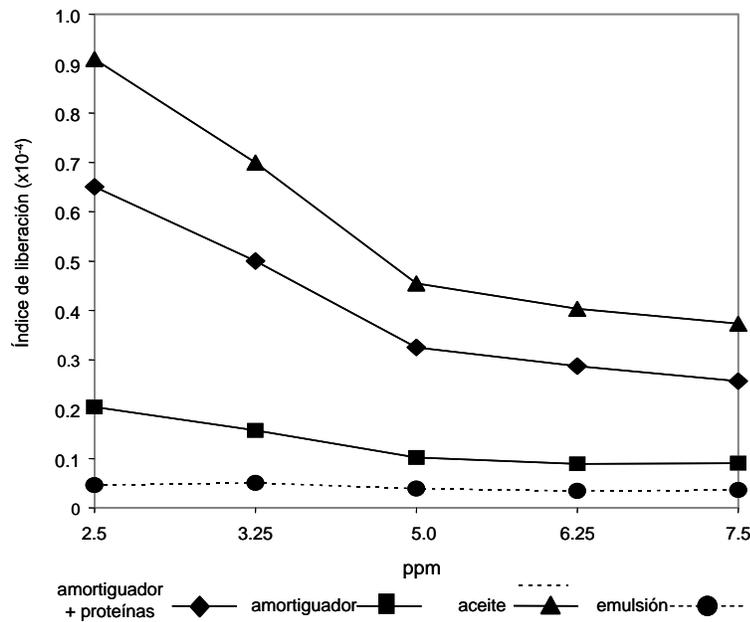


Figura 22. Índices de liberación (k) de nonanal en los cuatro

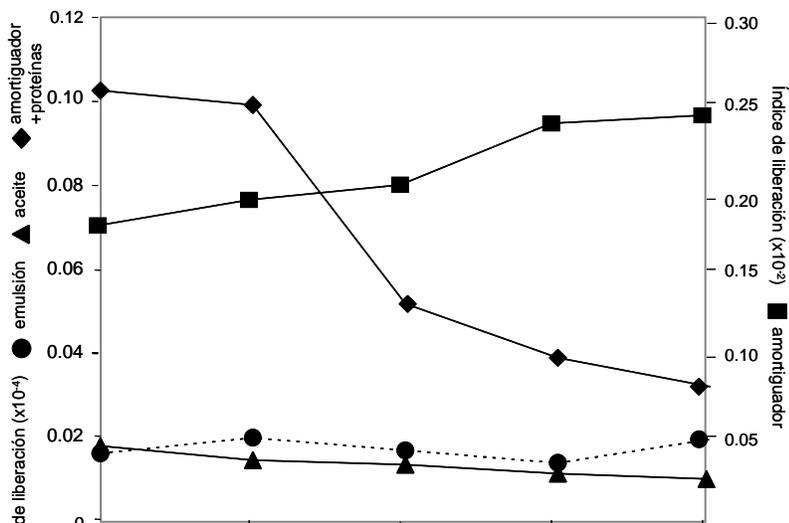


Figura 23. Índices de liberación (k) de octanal en los cuatro

El Anexo VIII muestra el análisis de varianza de coeficiente de liberación (k) entre compuestos, sistemas y concentraciones. Si bien en este análisis se confunden efectos, se observa que existe diferencia significativa ($P > 0.0001$) entre los compuestos y los sistemas estudiados, pero no entre las concentraciones ($P > 0.0358$) ni entre las interacciones compuesto*concentración ($P > 0.443$) ni sistema*concentración ($P > 0.0252$). Considerando todos los sistemas y las concentraciones, el mayor índice de liberación se observó en octanal (1.495×10^{-3}) (Anexo IX), seguido sin diferencia significativa por nonanal (1.161×10^{-3}) y significativamente por hexanal (0.685×10^{-3}); k para las dos pirazinas fueron significativamente inferiores (0.916×10^{-3} y 0.0308×10^{-3} para 1-etil-3,5-

dimetil pirazina y 2-metil pirazina, respectivamente). Esto significa que, en general considerando todas las variables, el octanal presentó la mayor liberación y por tanto la mayor contribución al aroma. Por otro lado, el sistema del cual se liberaron con mayor eficiencia los volátiles estudiados, englobando todas las fuentes de variación, fue el amortiguador solo (Anexo IX), ya que su índice de liberación fue 1.8081×10^{-3} , significativamente mayor ($P > 0.0001$) que los índices de los demás sistemas.

Considerando los sistemas como bloques principales (Anexo X), se observaron diferencias significativas debido a los compuestos estudiados para todos los sistemas; sin embargo, para las concentraciones y las interacciones compuesto*concentración solo hubo diferencias significativas en el amortiguador y el aceite, pero no para el amortiguador+proteínas y la emulsión modelo. Los índices de liberación de todos los compuestos fueron significativamente diferentes entre si en todos los sistemas, con excepción de la emulsión modelo, donde no hubo diferencia entre las pirazinas, octanal y nonanal, pero si estos cuatro con respecto al hexanal (Anexo XI). El comportamiento en cuanto a las concentraciones mostró que los índices de liberación a todas la

concentraciones en la emulsión modelo y el amortiguador+proteínas fue el mismo, independientemente de la concentración inicial del compuesto estudiado. No así en el amortiguador y el aceite, donde los índices de liberación disminuyeron con la concentración inicial del compuesto estudiado.

Los mayores índices de liberación se observaron para el hexanal en el aceite y la emulsión modelo (Figura 21), y para el octanal en el amortiguador (Figura 23), con y sin proteína. El alto índice de liberación del aceite se debió a que no hubo interacción entre estos compuestos y el medio no polar (Estévez y col., 2003).

Las soluciones proteicas (amortiguador+proteínas) son sistemas de una fase; la solubilidad proteica ocurre debido a la presencia de sales que dan como resultado una solución de fuerza iónica media ($\Gamma = 0.6$); por tanto, el arreglo tridimensional se modifica exponiendo los grupos hidrofílicos, los cuales se solvatan con moléculas de agua (Kerscher y Grosch, 1997b). En esta situación los radicales metilo y etilo no interactúan fácilmente con los grupos cargados de las proteínas, por lo tanto las pirazinas se liberan hacia

el espacio vacío (Flament y col., 1976; Flament y col., 1977). En la presente tesis, la volatilidad de las pirazinas disminuyó en el sistema de amortiguador+proteínas (Figuras 19 y 20) debido a interacciones con grupos amino o hidroxilo (Totosaus y col., 2000).

La liberación de 1-etil-3,5-dimetil pirazina fue significativamente mayor ($P < 0.001$) que la de 2-metil pirazina en el sistema de amortiguador+proteínas debido a la fuerte unión hidrofóbica entre el radical metilo y las cadenas polipeptídicas (Phillipe y col., 2003). Las interacciones hidrofóbicas también contribuyeron a la disminución de la liberación de este compuesto del amortiguador (sin proteína).

Considerando los índices de liberación dentro de cada compuesto como bloque principal, no se observó diferencia significativa entre el sistema estudiado y la concentración inicial del volátil, así como en la interacción sistema*compuesto, con excepción del 1-etil-3,5-dimetil pirazina (Anexo XIII). Los mayores valores de k se observaron en el amortiguador para hexanal, octanal, nonanal y 1-etil-3,5-dimetil pirazina, no así para 2-metil pirazina (Anexo XIV),

cuya mayor liberación fue en aceite. La liberación de las emulsiones modelo mostró los menores valores para todos los volátiles estudiados.

En un sistema de dos fases, como una emulsión, el hexanal y el nonanal interactúan en la interfase con las proteínas desdobladas a través de mecanismos de tipo hidrofóbico (Foss, 1969), por tanto se pueden difundir fácilmente a través de la fase continua (Totosaus y col., 2000). Por otro lado, mientras sea más corta la cadena alifática será menor la solubilidad del compuesto, como resultado de su menor hidrofobicidad (Gianelli y col., 2003).

Considerando como bloque principal a las concentraciones iniciales de los volátiles estudiados, se encontró que tanto el efecto del compuesto, del sistema y la interacción entre ambos fue significativa en los índices de liberación (Anexo XVI)

Para todas las concentraciones iniciales de compuesto odorífero, los mayores índices de liberación se observaron para los aldehídos y para los amortiguadores, con y sin proteína (Anexo XVII).

La disminución del índice de liberación de los aldehídos de los

amortiguadores con y sin proteínas al aumentar la concentración inicial de compuesto odorífero (Figuras 21, 22 y 23) es debido a su relativa solubilidad en agua (Li-Chan y col., 1985); la concentración de los aldehídos solubilizados aumenta con la cantidad inicial del compuesto odorífero en el sistema. O'Neill y Kinsella (1987) reportaron una disminución en la volatilidad de los aldehídos en presencia de proteínas; este tipo de interacción depende principalmente de los radicales carbonilo que reaccionan con los grupos amino o hidroxilo (Mottram y Whitfield, 1995). Fischer y Widder (1997) también reportaron que los esteres tienen una volatilidad menor pero continua con el aumento de la concentración proteica.

La liberación de hexanal y nonanal del aceite de canola y de la emulsión (Figuras 21 y 22) no tuvo una diferencia significativa con respecto a la concentración del volátil (Anexo XVIII). En el medio de amortiguador+proteínas, los índices de hexanal y nonanal disminuyeron significativamente al aumentar la concentración inicial del volátil.

El octanal mostró diferencias en sus índices de liberación, en comparación con los otros aldehídos. A diferencia de las pirazinas, el hexanal y el nonanal, el octanal no se retuvo significativamente por las emulsiones (Figura 23). Sin embargo, de forma similar a lo observado para hexanal y nonanal, los mayores índices de liberación del octanal fueron en amortiguadores con y sin proteína. La liberación de los aldehídos de aceite fueron significativamente menor ($P > 0.0001$) que la de los amortiguadores.

Debido al desenrollamiento y degradación de las proteínas en la interfase, se exponen los sitios reactivos; por tanto la retención de los aldehídos parece que ocurre por interacción química con las proteínas de la emulsión. Sin embargo, la hidrofobicidad también participa en forma importante. Schirle-Keller y col. (1994) reportaron que las cargas de los lípidos presentes tienen un efecto importante en la presión de vapor de compuestos liposolubles, mientras que la presión parcial de compuestos hidrosolubles tienen poco efecto en sistemas acuosos. De acuerdo con Mottram y Edwards (1982), debido a la naturaleza no polar de los aldehídos, la presencia de lípidos en la emulsión y en el aceite de canola reduce considerablemente la presión de vapor de los aldehídos, y por tanto se reducen sus índices de liberación.

6.2.2. Efecto de las proteínas miofibrilares

Debido a que las proteínas se adsorben en la interfase de la emulsión por cargas electrostáticas entre los residuos cargados y las cabezas polares de los lípidos, lo que favorece su actividad superficial y en consecuencia la unión de los compuestos volátiles en la interfase aumenta con la concentración de proteína (Fabbiane, 2000; Phillipe y col., 2003), más que una unión se trata de un mejor encapsulamiento ya que se observa que la liberación de volátiles decrece cuando la proteína cubre la mayor parte de la superficie interfasial, sin embargo, a bajas concentraciones de proteína no se observa ningún efecto debido a la cobertura pobre de las proteínas en la superficie del glóbulo de grasa (Dickinson,1992)

La presencia de proteínas de bajo peso molecular (100 a 80 kDa y 80 a 65 kDa) (Figura 18, d y e) fue evidente en la fase dispersa, probablemente unidas a la interfase. Las proteínas miofibrilares se repartieron entre la interfase y la fase continua; sin embargo, la interacción de las proteínas con los volátiles fue variable, dependiendo de la solubilidad en cada fase de los volátiles estudiados. Las concentraciones altas de proteína favorecieron las interacciones proteína-proteína (Langurieux y Crount, 1995;

Boudaud y Dumont., 1996); el desenrollamiento de las proteínas en la interfase permite interacciones entre grupos no polares de la proteína y los lípidos presentes (Schirle-Keller y col., 1994). Por otro lado, los lípidos y los compuestos odoríferos compiten por unirse a las proteínas en la interfase (Seuvre y col., 2002). En la presente tesis, el sistema miosina-actomiosina posiblemente se desenrolló, liberando otras proteínas como actomiosina, que participa en parte al pico de 45 kDa, e interactuando con los compuestos volátiles estudiados. La unión de estos compuestos reduce la liberación al espacio vacío y los hace menos disponible para su percepción odorífera para los receptores de la nariz y la boca, según se observó en los índices de liberación de la emulsión modelo para 2-metil pirazina (Figura 19), 1-etil-3,5-dimetil pirazina (Figura 20), hexanal (Figura 21) y nonanal (Figura 22), pero no para octanal (Figura 23).

6.3. Cuantificación de los compuestos indicadores por extracción con solventes

6.3.1. Tiempos de retención

Se determinaron los tiempos de retención de los compuestos odoríferos (Tabla 9)

Tabla 12. Tiempos de retención (min) de los volátiles analizados, extraídos con metanol y cloroformo

Compuesto	Solvente	
	Metanol (fase dispersa)	Cloroformo (fase continua)
hexanal	6.88	6.68
2-metil pirazina	10.46	10.42
octanal	10.76	10.72
nonanal	12.33	12.32
1-etil-3,5-dimetil pirazina	13.365	13.24

6.3.2. Curvas patrón

Conociendo los tiempos de retención de cada compuestos, e inyectando al cromatógrafo concentraciones de 2.5 a 7.5 ppm de los cinco compuestos indicadores, se elaboraron las curvas patrón que se reportan en el Anexo XIX. Se obtuvo la ecuación de regresión de la concentración de cada compuestos contra el área relativa, observándose que tanto los compuestos en los sistemas de

referencia (fase dispersa con cloroformo y fase continua con metanol), mostraron una respuesta lineal con $R^2 > 0.9$, excepto en el caso de 2-metil pirazina extraído con metanol, que tuvo un índice de determinación $R^2 = 0.7896$.

6.3.3. Índices de extracción

El Anexo XX reporta el análisis de varianza de los índices de extracción (k_{ext}), confundiendo los efectos de solventes, compuestos y concentraciones. En estas condiciones, dos fuentes de variación (solvente y compuesto) fueron significativas, no así la concentración inicial de los compuestos estudiados. El índice de extracción con metanol fue significativamente mayor (0.385) que con cloroformo (0.080); de igual forma, el octanal mostró un índice de extracción (0.637) significativamente mayor que el resto de los compuestos (Anexo XXI).

Considerando como bloque principal al compuesto indicador, se observó que el efecto del solvente y la concentración fueron significativos para las pirazinas y octanal (Anexo XXII); para nonanal solo fue significativo el efecto de la concentración,

mientras que para hexanal ninguna de las dos fuentes de variación. Es de hacer notar que la interacción solvente*concentración fue significativa en todos los compuestos, con excepción de hexanal. No se encontró un patrón de extracción entre los compuestos, ya que se observó que empleando metanol se extraía mayor cantidad de 1-etil-3,5-dimetil pirazina, hexanal y octanal, mientras que con cloroformo hubo mejor extracción de 2-metil pirazina y nonanal (Anexo XXIII). Este efecto de extracción de la fase dispersa se reporta en las Figuras 24 a 26, donde no se observa una pendiente definida, particularmente en el caso de hexanal (Figura 24), y concuerda con el hecho de que ninguna fuente de variación (solvente, concentración y la interacción de ambos) es significativa en el caso del índice de extracción para hexanal (Anexo XXII).

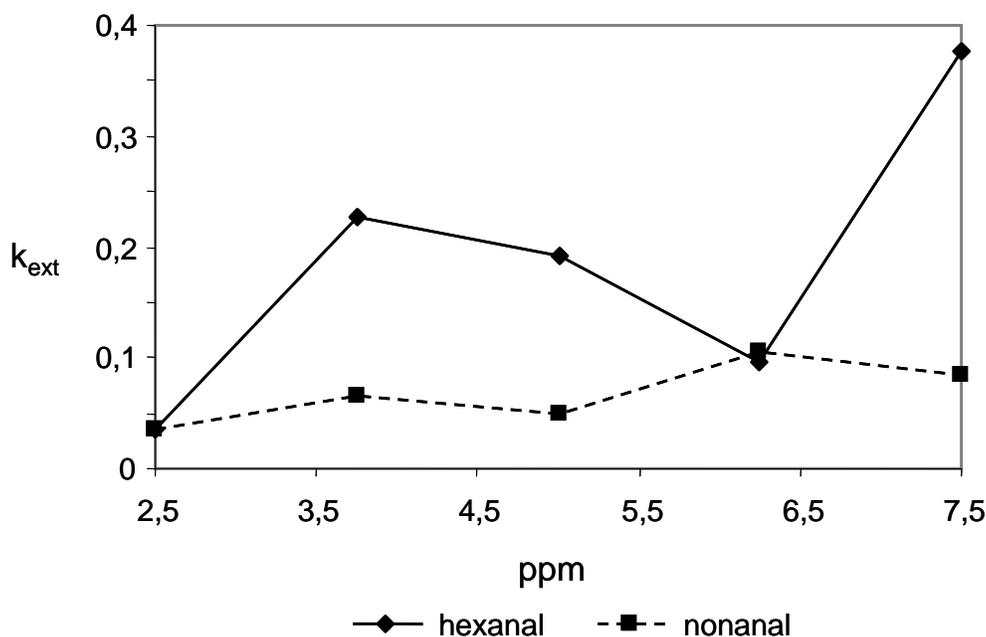


Figura 24. Índices de extracción de la fase dispersa (con metanol)

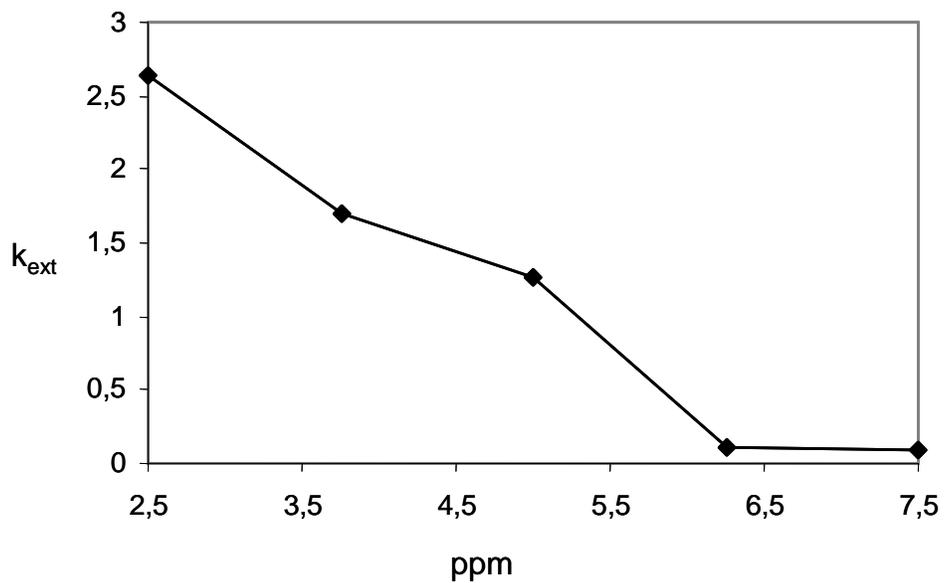


Figura 25. Índices de extracción de la fase dispersa (con metanol)

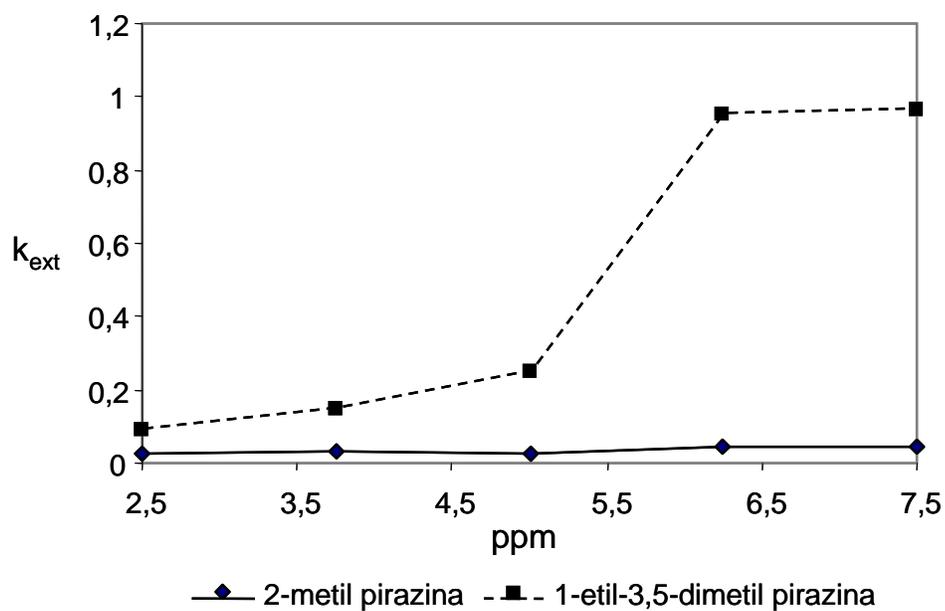


Figura 26. Índices de extracción de la fase dispersa (con metanol)

La concentración inicial afectó significativamente ($P > 0.0001$) al índice de extracción de todos los compuestos (Anexo XXIV) con excepción del hexanal. No se observó una secuencia de incremento del índice de extracción con el aumento de la concentración inicial. Tomando como bloque principal a las concentraciones iniciales y como subbloques al solvente y al compuesto estudiado (Anexo XXV) se observaron efectos significativo del solvente y del compuesto dentro de cada concentración inicial, las excepciones fueron con concentraciones iniciales de 2.5 y 3.75 ppm. En estos casos, se tuvo la misma liberación empleando cloroformo y metanol (Anexo XXVI). A bajas concentraciones (2.5 a 5.0 ppm), el octanal era el compuesto que mostraba más facilidad de extracción; a mayores concentraciones (6.25 y 7.5 ppm) el compuesto mas fácilmente extraído fue 1-etil-3,5-dimetil pirazina

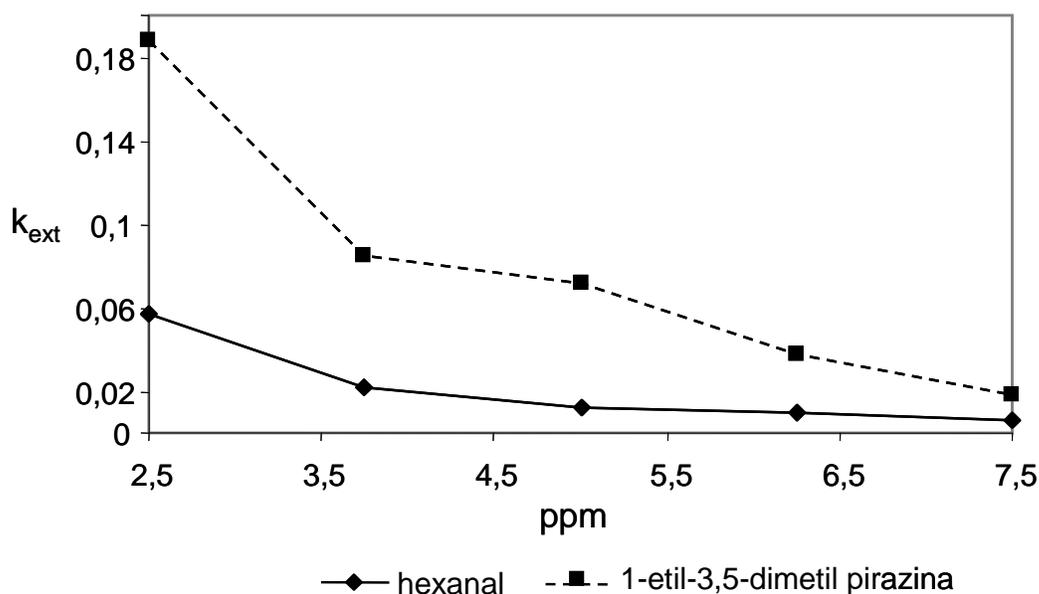


Figura 27. Índices de extracción de la fase continua (con cloroformo)

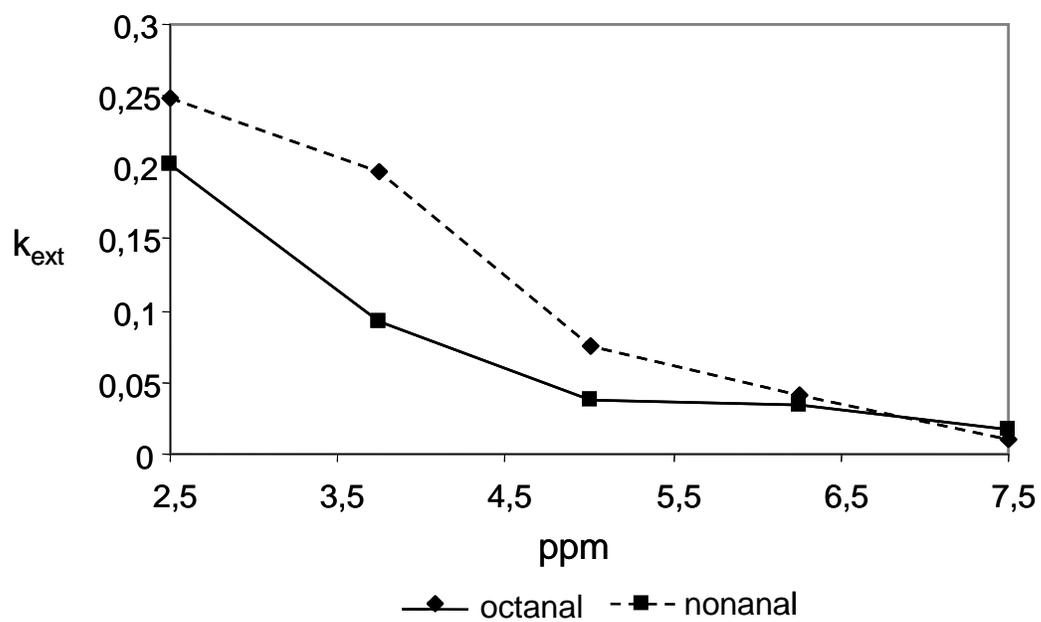


Figura 28. Índices de extracción de la fase continua (con cloroformo)

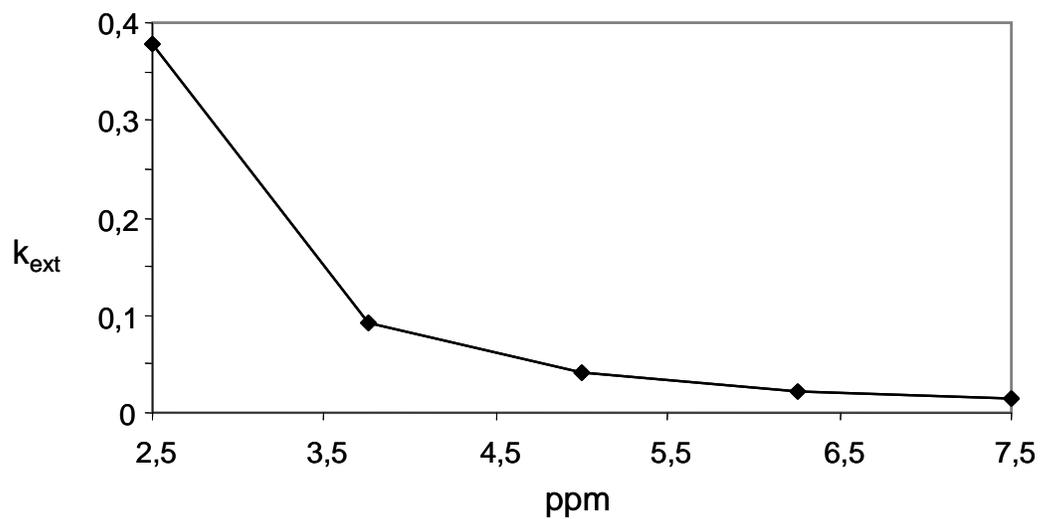


Figura 29. Índices de extracción de la fase continua (con cloroformo)

Considerando los valores medios de los índices de extracción entre los solventes y dentro de de cada compuesto (Anexo XXIII), se tuvo el orden indicado en la Tabla 13.

Tabla 13. Índices de extracción (k_{ext}) en las fases dispersa y continua

Fase dispersa (metanol)	k_{ext}	Fase continua (cloroformo)	k_{ext}
Octanal	1.161	Octanal	0.114
1-etil-3,5-dimetil pirazina	0.480	2-metil pirazina	0.109
Hexanal	0.185	1-etil-3,5-dimetil pirazina	0.081
Nonanal	0.068	Nonanal	0.077
2-metil pirazina	0.034	Hexanal	0.021

Si se considera que los compuestos volátiles se añadieron a la

emulsión antes de romperla, un mayor índice de extracción en alguna de las fases indicó que el compuesto fue menos afín a dicha fase, siempre y cuando se considere que el solvente extrae la mayor parte del compuesto que quedó en cada fase. De acuerdo con lo anterior, se observó:

- Al aumentar la concentración, los compuestos fueron mas afines a la fase lipidica (extracción con metanol), excepto el octanal. De manera contraria los compuestos odoríferos seleccionados fueron más afines en concentraciones menores a la fase dispersa (extracción con cloroformo)
- Es claro que 2-metil pirazina y nonanal fueron mucho menos retenidos por la fase dispersa y mayormente por la fase continua
- Octanal, hexanal y la 1-etil-3,5-dimetil pirazina fueron más afines a la fase dispersa

Lo anterior se confirma en el Anexo XXII, y en la Tabla 13. Esto puede indicar afinidad de los compuestos volátiles a bajas concentraciones iniciales en la fase continua, especialmente de 2-metil pirazina y nonanal. Sin embargo, a concentraciones iniciales

bajas hubo mayor partición hacia la fase continua. Al incrementar las concentraciones añadidas, los compuestos odoríferos son liberados hacia la fase dispersa, posiblemente por efecto de solubilidad ó bien saturación de la fase continua. Hexanal, octanal y 1-etil-3,5-dimetil pirazina tuvieron mayores índices de extracción en la fase continua, lo cual es congruente con el de que se concentraron mayormente en la fase dispersa; 2-metil pirazina y nonanal fueron los más retenidos por la fase continua. En cuanto a la fase dispersa, nonanal también fue retenido, así que en ambas fases presentaron interacción con este compuesto; 2-metil pirazina tuvo índices de extracción mayores en la fase dispersa, lo que confirma que tuvo menor afinidad por esa fase.

A diferencia de los resultados obtenidos con el método de microextracción en fase sólida, en los que se detectaron diferencias significativas entre compuestos, el método de extracción por solventes no detecta esta partición. Esto llevaría a concluir que el grupo funcional del compuesto odorífero no afecta su contribución al aroma, lo cual es un error. Por tanto, la técnica de microextracción en fase sólida es más sensible que la técnica de

extracción con solventes.

7. CONCLUSIONES

El presente trabajo permitió desarrollar una metodología para el desarrollo de formulaciones de sabores artificiales cárnicos, y conocer los mecanismos de la liberación del aroma cárnico en una emulsión cárnica.

En el desarrollo y estudio de la emulsiones modelo, los pH cercanos a la neutralidad favorecieron un incremento en la fracción volumen de fase dispersa, aumentando la cantidad de aceite incorporado a la emulsión. Como consecuencia, la densidad de las emulsiones disminuyó. Es probable que al aumentar el pH en el medio continuo exista una mayor actividad superficial de las proteínas miofibrilares, ocurriendo un cambio de configuración por desdoblamiento o apertura en su estructura. A pH cercano al punto isoeléctrico (5.5) disminuye la capacidad emulsificante de las proteínas, según se observó en la disminución de la viscosidad y capacidad de emulsificación de los sistemas modelo estudiados.

Al aumentar la concentración del extracto proteico proteínas, la fracción volumen de fase dispersa aumentó, lo que implicó una mayor concentración de proteína en la interfase del medio continuo disminuyendo la densidad del sistema y estabilizándose el sistema. El aumento en la viscosidad al aumentar el contenido proteico explica también la estabilidad del sistema.

Bajo las condiciones experimentales empleadas, las pirazinas se liberaron con más facilidad de la solución proteica (amortiguador+proteínas), que de la fase lipídica. Se observó una baja liberación de pirazinas de las emulsiones modelo y del sistema acuoso (amortiguador sin proteínas). En estos sistemas, la liberación de los compuestos odoríferos estudiados disminuyó a medida que aumentó la concentración inicial de los mismos.

Por tanto, las pirazinas fueron los principales contribuyentes, dentro de los compuestos estudiados, al aroma cárnico en un sistema con proteínas en solución. Las pirazinas no pueden considerarse como contribuyentes al aroma cárnico en emulsiones, debido a que su liberación se limita por su unión con las proteínas adsorbidas en la interfase.

El hexanal, el octanal y el nonanal se retuvieron eficientemente en el sistema lipídico, por tanto estos compuestos fueron contribuyentes menores del aroma cárnico en el medio oleoso; el hexanal y el nonanal también fueron componentes menores del aroma cárnico en emulsiones modelo. El efecto sobre los compuestos odoríferos de un sistema proteico de dos fases, tal como una emulsión, o de una fase como una solución, es principalmente debido a interacciones hidrofóbicas entre las proteínas y los radicales etil/metil de las pirazinas. La reducción en la liberación de 2-metil pirazina, 1-etil-3,5-dimetil pirazina, hexanal y nonanal en emulsiones fue debido, principalmente, a la interacción con proteínas en la interfase, lo que no se observó en el caso del octanal, cuya liberación fue considerablemente mayor que los otros volátiles

en las emulsiones modelo estudiadas. En general, los aldehídos mostraron índices de liberación altos en sistema acuosos, con o sin proteínas añadidas.

Sin embargo, el sistema de estudio es fundamental para determinar la contribución de los compuestos al aroma cárnico. Al llevar a cabo la extracción con metanol en la fase dispersa (lipídica) y con cloroformo en la fase continua (acuosa), se observó que el octanal fue el aldehído estudiado que más fácilmente se liberaba de ambas fases, en contrario con lo reportado por varios autores que indican que es el hexanal el principal aldehído contribuyente al aroma cárnico. En un sistema de estudio basado en extracción por solventes, las pirazinas son, después del octanal, los mayores contribuyentes al aroma cárnico en una fase constituida por una solución de proteínas miofibrilares.

La técnica de extracción por solventes mostró que el octanal era el compuesto con menor retención (mayor liberación) tanto en la fase continua como dispersa. Sin embargo, no se pudo relacionar la presencia de grupos funcionales de los compuestos odoríferos con su índice de extracción, por lo que de los resultados obtenidos por los dos métodos de análisis de la contribución de los cinco compuestos odoríferos indicadores, la microextracción en fase sólida fue más sensible que la extracción por solventes.

8. RECOMENDACIONES PARA ESTUDIOS POSTERIORES

1. **Es importante repetir la secuencia experimental variando el tamaño de partícula de la emulsión, ya que este factor afecta directamente la liberación de los compuestos volátiles.**
2. **De igual forma, evaluar el impacto de la variación de la fuerza iónica y de tamaño de partícula en el modelo de emulsión cárnica desarrollado.**
3. **El hexanal mostró un comportamiento anómalo en comparación con los otros aldehídos, es importante enfocar el estudio de su contribución al aroma cárnico, desde la perspectiva de extracción con solventes, ya que ha sido ampliamente reportado por otros autores como un contribuyente importante al aroma cárnico.**
4. **Evaluar de manera sensorial, si existen ó no diferencias significativas entre los compuestos odoríferos estudiados, así como efectuar su correlación con los resultados analíticos obtenidos.**
5. **Aislar la actina del conjunto de proteínas solubles y miofibrilares que componen el extracto proteico empleado con la finalidad de hacer puntual, la información sobre las interacciones proteína-compuesto odorífero.**

- 6. Sobre la propuesta anterior, evaluar mediante el empleo de espectroscópicas como resonancia magnética nuclear de hidrógeno y de carbono, IR, espectrometría de masas y cristalografía, el tipo de interacción proteína/compuesto odorífero existente, lo anterior empleando ya sea actina ó albúmina sérica bovina.**

- 7. De la recomendación anterior, evaluar la actividad superficial de actina, a través de la medición en la variación de tensión superficial para una solución acuosa de la misma, lo anterior nos permitiría en consecuencia determinar el área superficial de esta proteína, así como efectuar el cálculo de la energía libre de Gibbs, en consecuencia se obtendría más información sobre el comportamiento emulsificante de alguna proteína miofibrilar aislada.**

9. BIBLIOGRAFÍA

Aguilar C., Peñalver S., Pocurull E., Borrull F. y Marcé R.M. 1998. Journal of Chromatography A 795:105.

AICE (Comisión Especializada de Normalización Especializada de Productos Ganaderos). 1980. Normas de calidad para productos embutidos crudos y curados. Madrid, España.

Allen, T. 1992. Particle Size Measurement. Chapman and Hall, Londres.

Alpendurada, M.F. 2000. Journal of Chromatography 3:889.

Aranda R. y Burk R.C. 1998. Journal of Chromatography A 829:401.

Aranda R., Kruus P. y Burk R.C. 2000. Journal of Chromatography A 888:35.

Arthur C.L. y Pawliszyn J. 1990. Analytical Chemistry 62:2145.

Bading, H.T. y de Jong, C. 1984. Headspace analysis for the study of aroma compounds in milk and dairy products. En: Analysis of volatiles: Methods and applications. P. Schreier (editor). De Gruyter. Nueva York.

Badui, S. 2006. Lípidos. En: Química de Alimentos. S. Badui (editor). Pearson-Addison Wesley, México D.F.

Bailey, M.E. y Eining, R.G. 1989. Reaction flavors of meat. En: Thermal Generation of Aromas. T.H. Parliament, R.J. McGorrins y C.T. Ho (editores). American Chemical Society. Washington.

Bakker, J., Brown, W.E., Hills, B.M., Boudaud, N., Wilson, C.E., Harrison, M. 1996. Effect of the food matrix on flavour release and perception. En: Flavour Science. Recent Developments. A. Taylor y D.S. Mottram (editores). The Royal Society of Chemistry. Londres.

Bemelmans, J.M.H. 1979. Review of Isolation and Concentration Techniques. En: Progress in Flavour Research. D.G. Land y H.E. Nursten (editores). Applied Science Publishers. Londres.

Berlitz, H.D. y Grosch, W. 1999. Food Chemistry. Springer-Verlag. Berlin.

Borderías, A.J., y Montero, P. 1988. Fundamentos de la funcionalidad de la proteínas en alimentos. Revista Agroquímica y Tecnología Alimentaria 28(2):159.

Bodrero, K.O., Pearson, A.M. y Magee, W.T. 1981. Evaluation of the contribution of flavor volatiles to the aroma of beef by surface response methodology. Journal of Food Science 46:26.

Boudaud, N., Dumont, J.P. 1996. Interactions Between Flavor Components and Beta-Lactoglobulin. En: Flavor-Food Interactions. R.J. McGorin y J.V. Leland, (editors). American Chemical Society.

Bourges, H. 1993. Composición de Alimentos Industrializados: Tablas de Uso práctico. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.

Brinkman, H.W., Copier, H., de Leuw, J.J.M. y Tjan, S.B. 1972. Components contributing to beef flavor. Journal of Agriculture and Food Chemistry 20:117.

Cam D. y Gagni S. 2001. Journal of Chromatographic Science 39:481.

Chang, S.S., Vallese, F.M., Huang, L.S., Hsieh, O.A.L. y Min, D.B.S. 1977. Apparatus for the isolation of trace volatile constituents from foods. Journal of Agriculture and Food Chemistry 25:450.

Chien Y.C., Uang S.N., Kuo C.T., Shih T.S. y Jen J.F. 2000. Analítica Chimica Acta. 419:73.

Constant M. y Collier J. 1997. Journal of the American Society of Brewery Chemistry 55:112.

Cook, D.J., Linforth, R.S.T., Taylor, A.J. 2003. Effects of hydrocolloid thickeners on the perception of savory flavours. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51:3067.

Coulson J.M. y Richardson J.F. 1981. Ingeniería Química. Editorial Reverté. Barcelona, España.

Day, R.A. y Underwoods, A.L. 1989, Química Analítica Cuantitativa. Prentice-Hall Hispanoamericana.

De P. Pereida P.A., de Andrade J.B y Miguel, A. 2001. Analytical Science 17:1229.

De Roos, K.B. 1997. How lipids influence food flavor. Food Technology 51(1):60.

Dickinson, E. 1992. Introduction to Food Colloids. Oxford University Press, Oxford.

Damodaran, S. 1994. Structure-function relationship of food proteins. En: Protein Functionality in Food Systems. N. Hettiarachchy y G.R. Ziegler (editores). Marcel Dekker, Nueva York.

Dickinson, E. 2003. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. Food Hydrocolloids 17:25.

Doyen, K., Carey, M., Linforth, R.S.T., Marin, M., Taylor, A.S. 2001. Volatile release from an emulsion: headspace and in-mouth studies. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49:804.

Ebeler S.E. Sun G.M., Datta M., Stremple P. y Vickers A.K. 2001. Journal of the AOAC International 84:479.

Egan, H., Kirk, R.S. y Sawyer, R. 1981. Análisis Químico de Alimentos de Pearson. Editorial Continental. México D.F.

Eisert R. y Pawliszyn J. 1997. Critical Reviews in Analytical Chemistry 27:103.

Escalona, H., Piggott, J.R., Conner, J.M., Paterson, A. 1999. Headspace concentrations of alcohols and aldehydes at different ethanol concentrations. Italian Journal of Food Science 11:241.

Estevez, M., Morcuende, D., Ventanas, S., Cava, R. 2003. Analysis of volatiles in meat from Iberian pigs and lean pigs after refrigeration and cooking using SPME-GC-MS. 2003. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51:3429.

Fabbiane, F.V. 2000. Effect of some fat replace on the release of volatile aroma compounds from low-fat meat products. Journal of Agriculture and Food Chemistry 48:3476.

Fabienne F., Chevance V. y Farmer L. J. 1999. Journal of Agriculture and Food Chemistry 47:5151.

Farbood, M.I. y Macneil, J.H. 1979. Retention and stability of sulfur compounds in chicken meat. *Journal of Food Science* 44:652.

Feeney, M.J. y Jennings, W.J. 1989. *Advances in Gas Chromatographic Analysis of Thermally Generated Aroma*. T.H. Parliament, McGorin, R.J., y C.T. Ho (editores). American Chemical Society, Washington.

Friberg, E.S. y Larsson, K. 1997. Food Emulsions. Marcel dekker, Nueva York.

Fischer, N. y Widder, S. 1997. How proteins influence food flavor. Food Technology 51(1):68.

Flament, I., Kohler, M., y Aschiero, R. 1976. Sur l'arome de viande de boeuf grille: II. Dihydro-6,7-SH-cyclopenta[b]pyrazines, identification et mode de formation. *Helvetica Chimica Acta* 59:2308.

Flament, I., Sonnay, P., y Ohloff, G. 1977. Sur l'arome de boeuf grille : III Pyrrolo[1,2-a]pyrazines, identification et synthese. *Helvetica Chimica Acta* 60:1872.

Forss, D.A. 1969. Role of lipids in flavors. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 17: 681.

Folch, J. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *Journal of Biological Chemistry* 226:497.

García, C.F.L., Dimes, L.E. y Haard, N.F. 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. Analytical Biochemistry 214:65.

García Barrientos, R. 2001. Efecto de las Enzimas Endógenas sobre las Propiedades Físicoquímicas y Estructurales de Carne de Bovino durante la Maduración. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México D.F.

Gasser, U y Grosch, W. 1988. Identification of volatile flavour compounds with high aroma values from cooked beef. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 186:489.

Geesink, G.H. and Koohmaraie, M. 2002. Ionic strength induced activation of m-calpain in post-mortem muscle. Journal of Animal Science 78(9):2336.

Gerecke A.C., Tixier C., Bartels T., Schwarzenbach R.P. y Muller S.R. 2001. Journal of Chromatography A 930:9.

Gianelli, P., Flores, M. y Toldrá, F. 2003. Interactions of soluble peptides and proteins from skeletal muscle on the release of volatile compounds. Journal of Agriculture and Food Chemistry 51:6828.

González-Toledo E., Prat M.D. y Alpendurada M.F. 2002. Journal of Chromatography A 923:45.

Gorecki T., Xu X.M. y Pawliszyn J. 1999. Analyst 124:643.

Goubert, I., Le Querré, J.L. y Voilley, A. 1998. Retention of aroma compounds by carbohydrates: influence of their physicochemical characteristics and on their physical state. Journal of Agriculture and Food Chemistry 46:1981.

Grote C. y Pawliszyn J. 1997. Analytical Chemistry 69:587.

Hall, G.M. 1996. Methods of Testing Protein Functionality. G.M.Hall (editor). Blackie Academic and Professional. Londres, Gran Bretaña.

Hunter, R.J. 1986. Foundations of Colloid Science, Volumen 1. Oxford University Press, Oxford.

Hyspler R., Crhova S., Gasparic J., Zadak Z., Cizkova M. y Balasova V. 2000. Journal of Chromatography B 739:183.

Jenning, W., y Filsoof, M. 1997. Journal of Agriculture and Food Chemistry 25:440.

Jones K.W. 1984. Protein lipid interactions in processed meats. Reciprocal Meat Conference Proceeding, American Meat Science Association, 31: 52-56.

Kato, H. y Nishimura, T. 1987. Taste components and conditioning of beef, pork and chicken. Umami: One of the basic tastes. Marcel Dekker, Nueva York.

Kawai, I., Irie, M. y Sakaguchi, M. 1985. Degradation of 2,4,6-trialkyltetrahydro-1,3,5-thiadiazines during storage. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 33:393.

Kerscher, R. y Grosch, W. 1997. Comparative evaluation of potent odorants of boiled beef by aroma extract: dilution and concentration analysis. *Z. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 204:3.

Kerscher, R., Grosch, W. 1997. Character impact odorants of boiled chicken: changes during refrigerated storage and reheating. . *Z. Lebensm Unter Forsch A* 205:232.

Kinsella, J.E. 1982. Relationship between structure and functional properties of food proteins. En: *Food Proteins*. P.F. Fox y J.J. Cowden (editores). Elsevier Applied Science, Londres, Gran Bretaña.

Koster E.H.M., Crescenzi C., den Hoedt W., Ensing K. y de Jong G.J. 2001. *Analytical Chemistry* 73:3140.

Koziel J.A, Jia M.Y. y Pawliszyn J. 2000. *Analytical Chemistry* 72:5178.

Koziel J.A, Noah J. y Pawliszyn J. 2001. *J. Environmental Science and Technology* 35:1481.

Kubota, K., Kobayashi, A., y Yamanishi, T. 1980. Some sulfur-containing compounds in cooked odor concentrate from boiled Antarctic krill. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 44:2677.

Laemmli, U.K. 1979. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage ϕ 4. *Nature* 227:680.

Langurieux, S. y Crouzet, J. 1995. Protein-Aroma interactions. En: *Food and Macromolecules*. E. Dickinson y D. Lorient (editors). Royal Society of Chemistry. Cambridge, Inglaterra.

Lawrie, R.A. 1985. *Meat Science*. Pergamon Press. Londres, Inglaterra.

Leland, J.V. 1997. Flavor interactions: the greater whole. *Food Technology* 51(1):75.

Li S. y Weber S.G. 1997. *Analytical Chemistry* 69:1217.

Li-Chan, E., Nakai, S. Y Wood, D.F. 1985. Relationship between functional (fat binding, emulsifying) and physicochemical properties of muscle proteins. Effects of heating, freezing, pH and species. Journal of Food Science 50(4):1034.

Linforth, R.S., Ingham, K.E. y Taylor, A.S. 1996. Time course profiling of volatile release from foods during eating. En: Flavour Science. Recent Developments. A. Taylor y D.S. Mottram (editores). The Royal Society of Chemistry. Londres.

Liu J.Y., Yiang G.B., Zhou Q.F. y Yang K.W. 2001. Journal of Separation Science 24:459.

MacClemens, D.J. 1999. Food Emulsions: Principles, Practice and Techniques. CRC Press. Boca Raton, Florida.

MacRie, F. 1990. Chemistry at Interfaces. Academic Press. San Diego, California.

Mangani F. y Cenciarini R. 1995. Chromatographia 41:678.

Marion, J.B. y Thornton, S.T. 1995, Classical dynamics of particles and systems. Saunders College Publishing, Filadelfia.

Mewis, J. y Macosko, C.W. 1994. Suspension rheology. En: Rheology: principles, Measurements and Applications. C.W. Macosko (editor). VCH Publishers. Nueva York.

Miettinen, S.M., Tuorila, H., Piironen, V, Vehkalahti, K., Hyvönen. 2002. Effect of emulsion characteristics on the release of aroma as detected by sensory evaluation, static headspace gas chromatography and electronic nose. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50:4232.

Mottram DS, 1998. The chemistry of meat flavour. En: Flavor of Meat, Meat Products and Seafoods. F. Shahidi (editor). Blackie Academic and Professional. Londres, Reino Unido.

Mottram, D.S. y Edwards, R.A. 1983. The role of triglycerides and phospholipids in the aroma of cooked beef. Journal of Food Science 34:517.

Mottram, D.S. Edward, R.A. y Macfie, H.J.H. 1982. A comparison of the flavour volatiles from cooked beef and pork meat systems. Journal of Food Science 33:934.

Mottram, D.S., Whitfield, F.B. 1995. Volatile compounds from reactions of cystein, ribose and phospholipids in low moisture systems. Journal of Agricultural and Food Chemistry 43:984.

Muller, H.G. 1973. Introducción a la Reología de los Alimentos. Capítulos 6 y 7. Editorial Acribia. Zaragoza, España.

Muller L., Gorecki T., Pawliszyn J. y Fresenius. 1999. Journal of Analytical Chemistry 364:610.

Negrao N.R. y Alpendurada M.F. 1998. Journal of Chromatography A 823:211.

Ngapo, T., Wilkinson, B., Chong, R. y Haisman, D. 1992. Gelation of bovine myofibrillar protein induced by 1,5-gluconolactone. 38th International Congress of Meat Science and Technology Proceedings. Clermont-Ferrand, Francia.

Nguyen A.L y Luong J.H.T. 1997. Analytical Chemistry 69:1726.

Nishimura, T., Rhue, M.R., Okitani, A. y Kato, H. 1988. Components contributing to the improvement of meat taste during storage. Journal of Agricultural and Biological Chemistry 52:2323.

O'Neill, T.E. y Kinsella, J.E. 1987. Binding of Alkaline flavors to lactoglobulin: effects of conformational and chemical modification. Journal of Agriculture and Food Chemistry 35:906.

Owen, J.E., Núñez, F.A., Arías, M.T. y Cano de los Ríos, O. 1982. Manual de Prácticas del Cursos de Tecnología de la Carne. División de Estudios de Posgrado. Facultad de Zootecnia, Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua, México.

Pawliszyn, J. 1997. Solid Phase Microextraction: Theory and Practice. John Wiley, Nueva York.

Pawliszyn J. 1999. Applications of Solid Phase Microextraction. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, Inglaterra.

Pérez-Chabela, M.L., Escalona-Buendia, H. Y Guerrero-Legarreta, I. 2003. [Physicochemical and sensory characteristics of calcium chloride-treated horse meat](#). International Journal of Food Properties 6(1):73.

Peterson, G.L. 1983. Determination of total protein. *Methods Enzymology*, 91:95.

Phillipe, E., Seuvre, A.M., Colas, B., Langendorff, V., Schippa, C. y Voilley, A. 2003. Behavior of flavour compounds in model food systems: a thermodynamic study. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 51:1393.

Prince, J. F. y Schweigert, B.S. 1994. *Ciencia de la Carne y de los Productos Cárnicos*. Capítulos 2,3,7 y 8. Editorial Acribia. Barcelona, España

Ponce, E. 2006. Aroma. En: Ciencia y tecnología de Carnes. Y.H. Hui, I. Guerrero y M. Rosmini (editores). Noriega Editores. México D.F.

Rawlee, A. Basic Principles of Particle Size. www.malverninstruments.com. Fecha de acceso: 20 Mayo 2005.

Rawlee, A. 2000. Basic Principles of Particle Size Analysis. Malvern Technical Paper. Malvern Instruments. Malvern, Inglaterra.

Redinbaugh, M.G. y Turley, R.B. 1986. Adaptation of the bicinchoninic acid protein assay for use with microtiter plates and sucrose gradient fractions. *Analytical Biochemistry* 153:267-271.

Rolfe, P. A Basic Introduction to Rheology. www.malverninstruments.com. Fecha de acceso: 20 Mayo 2005.

Santos F.J., Sarrión M.N. y Galcerán M.T. 1997. *Journal of Chromatography A* 771:181.

SAS Institute. 1999. Statistical Analysis System. PC-SAS User's Guide. SAS Institute, Inc. Cary, Carolina del Norte.

Schimming E., Levsen K., Kohme C. y Schurmann W. 1999.) *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 363:88.

Schirle-Keller, J.P., Reineccius, G.A. y Hatchwell, L.C.1994. Flavor Interactions with Fat Replacers: Effect of Oil Level. *Journal of Food Science* 59:813.

Schlinchtherie, C. y Grosch, W. 1997. Evaluation of taste compounds of stewed beef juice. *Z. Lebensm Unters Forsch* 204:3.

Seuvre, A.M., Espinoza Díaz, M.A., Voilley, A. 2000. Influence of food matrix structure on the retention of aroma compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:429.

Seuvre, A.M., Espinoza-Díaz, M.A. y Voilley, A. 2002. Transfer aroma compounds through the lipidic-aqueous Interface in a complex system. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 50:1106.

Shahidi, F. 1994. Flavor of meat and meat products: An overview. En: *Flavor of Meat and Meat Products*. F. Shahidi (editor). Chapman and Hall, Nueva York.

Shahidi, F. 1998. *Flavour of Meat, Meat products and Seafood*. Aspen Publishing. Plymouth, Gran Bretaña.

Shahidi, F., y Pegg, R.B. 1993. Hexanal as an Indicator of meat flavor deterioration. *Journal of Food Lipids* 1:177.

Sherman, P. Textural characteristics of food emulsions. En: *Rheology and texture in food quality*. J.M. DeMan, P.W. Voisey, V.F.Rasper, D.W. Stanley (editores). The Avi Publishing Co, Inc. Westport, Connecticut.

Simplicio A.L y Boas L.V. 1999. *Journal of Chromatography A* 833:35.

Steel, R. G., y Torrie, J. H. 1988. *Bioestadística: Principios y Procedimientos*. McGraw Hill, Bogotá, Colombia.

Steffee, J.F. 1996. *Rheological Methods in Food Process Engineering*; Freeman Press. East Lansing, Michigan.

Smith, D.M. 1994. Protein interactions in gels: protein-protein interactions. En: *Protein Functionality in Food Systems*. N. Hettiarachchy y G.R. Ziegler (editores). Marcel Dekker, Nueva York.

Smith, D.M. y Culberson, J.D. 2000. Proteins: functional properties. En: *Food Chemistry: Principles and Applications*. J. Scott-Smith (editor). Science

Technology System, West Sacramento.

Song J., Fan L.H. y Beaudry R.M. 1998. Journal of Agriculture and Food Chemistry 46:3721.

Swift, C.E., Lockett, C. y Fryar, A.J. 1961. Comminuted meat emulsions: the capacity of meats for emulsifying fats. Food Technology 15 (11):468.

Taylor, A.J. 2001. Flavor matrix interactions. En: Currents Topics in Flavour and Fragrances: Towards a New Millennium of Discovery. K.A.D. Swift (editor). Kluwer Academic. Dordrecht, Holanda.

Taylor, A.J. 1999. Flavor-Matrix Interactions. En: Currents topics in flavour and fragrances: Towards a new millennium of discovery. K.A.D. Swift (editor). Kluwer Academic. Dordrecht, Holanda.

Taylor, A.J. y Linforth, R.S. 1996. Flavour release in the mouth. Trends in Food Science and Technology 7:444.

Thompson, D.M.H. 1986. The meaning of flavour. En: developments in Food Flavors. G.G. Birch y M.G. Lindley (editores). Elsevier Applied Science, Londres.

Totosaus, A. 1996. Funcionalidad de Extractos Proteicos Musculares de Cabra y Res. Efecto de la Temperatura y Tiempo de Almacenamiento. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México D.F.

Totosaus, A., Gault, N. y Guerrero, I. 2000. Dynamic rheological behavior of meat proteins during acid-induced gelation. International Journal of Food Properties 3(3):465.

Totosaus, A. y Guerrero, I. 2006. Propiedades funcionales y textura. En: Ciencia y Tecnología de Carnes. Y.H. Hui, I. Guerrero y M. Rosmini (editores). Noriega Editores, México D.F.

Tung, M.A. y Paulson, A.T. 1995. Rheological concepts for probing ingredient interactions in food systems. En: Ingredient Interactions: Effects on Food Quality. A. Gaonkar (editor). Marcel Dekker, Nueva York.

Ulrich S. 2000. Journal of Chromatography A 902:167.

Universidad de Waterloo. 2002. SPME Course, Waterloo, Ontario, Canadá. Abril

2002.

Valdés Martínez, S.E. 2006. Hidratos de carbono. En: Química de Alimentos. S. Badui (editor). Pearson Addison Wesley, México D.F.

Van Ruth, S.M., King, C. y Giannouli, P. 2002. Influence of lipid fraction, emulsifier fraction and mean particle diameter of oil-in-water emulsions on the release of 20 aroma compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50:2365.

Voutsinas, L.P., Cheung, E. y Nakai, S. 1983. Relationship between hydrophobicity to emulsifying properties of heat denatured proteins. Journal of Food Science 48:26.

Wang C.W. y Pawliszyn J. 1998. Analytical Chemistry 35:353.

Washington, C. 1992. Particle Size Analysis in Pharmaceuticals and Other Industries. Theory and Practice. Ellis Horwood, Londres.

Welty, J.R., Wicks, C.E. y Wilson, R.E. 1998. Fundamentos de transferencia de momento, calor y masa. Noriega Editores. México D.F.

Weurman, C. 1969. Journal of Agriculture and Food Chemistry 17:370.

Wu Y.C. y Huang S.D. 1999. Analytical Chemistry 71: 310.

Wu J. Yu X. Lord H. y Pawliszyn J. 2000. Analyst 125:391.

Páginas electrónicas sin autor:

www.canola-council.org

www.criba.edu.ar/cribabb/servicios/secegrin/microscopia/apunte_col.htm

www.monografias.com/trabajos5/estat/estat.shtml

<http://docencia.udea.edu.co/cen/tecnicaslabquimico/02practicass/practica03.htm>

www.mdp.edu.ar

www.utadeo.edu.co/comunidades/estudiantes/ciencias_basicas/analitica_instrumental/guia_2_1.pdf

www.biologia.edu.ar/microscopia/meb.htm

www.latercera.cl/medio/articulo/0,0,38035857_157519509_200080638,00.html

PRODUCTIVIDAD DURANTE EL DESARROLLO DE LA TESIS

Participación en congresos

1. **Herrera, M., Escalona, H., Ponce, E., Guerrero, I. 2004. Formulation and characterization of a model meat emulsion to study protein contribution to aroma. Institute of Food Technologists Annual Meeting. Las Vegas, 12-16 de Julio.**
2. **Herrera, M., Escalona, H., Ponce, E., Guerrero, I. 2005. Contribution of five indicator aldehydes and pyrazines to meat aroma in a model system. Institute of Food Technologists Annual Meeting. Nueva Orleans, 15 a 21 de Julio.**
3. **Herrera, M., Ponce, E., Escalona, H., Guerrero, I. 2005. Determinación de índices de volatilidad de compuestos relacionados con el aroma cárnico en un sistema modelo. XXVI Encuentro Nacional de la Academia de Investigación y Docencia en Ingeniería Química. Acapulco, 3 a 6 de Mayo.**
4. **Herrera, M., Ponce, E., Escalona, H., Guerrero, I. 2005. Determinación de índices de volatilidad de compuestos relacionados con el aroma cárnico en sistemas modelo. V Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos. Puerto Vallarta, Jal. 4 a 7 de Septiembre.**
5. **Herrera-Jiménez M., Escalona-Buendía, H., Ponce Alquicira E., Verde-Calvo, R., Guerrero-Legarreta, I. 2006. Use of a solid phase microextraction technique to analyze volatility of five odor-related compounds in a meat emulsion. Institute of Food Technologists Annual Meeting. Orlando, 24 a 28 de Junio.**
6. **Hererra, M., Guerrero, I. 2006. Determination of flavor-related compounds volatility index in a model meat emulsion system. Food Science and Food Biotechnology in Developing Countries., Saltillo, Coahuila, 15-18 de Octubre**

Memorias en extenso

Herrera, M., Ponce, E., Escalona, H., Guerrero, I. 2005. Determinación de índices de volatilidad de compuestos relacionados con el aroma cárnico en un sistema modelo. XXVI Encuentro Nacional de la Academia de Investigación y Docencia en Ingeniería Química. Acapulco, 3 a 6 de Mayo.

Artículo de investigación en prensa

Herrera-Jiménez, M., Escalona Buendía, H., Ponce Alquira, E., Verde-Calvo, R., Guerrero Legarreta, I. Formulation and characterization of a model meat emulsion to study disperse and continuous phase contribution to aroma. International Journal of Food Properties.

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN
(International Journal of Food Properties)

RELEASE OF FIVE INDICATOR VOLATILES FROM A MODEL MEAT EMULSION TO STUDY PHASE CONTRIBUTION TO MEAT AROMA

Marisol Herrera-Jiménez¹, H. Escalona Bunedía², Edith Ponce Alquicira¹, R. Verde-Calvo¹, Isabel Guerrero Legarreta^{1*}

¹ **Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Apartado Postal 55-535, Mexico D.F., C.P. 09340, Mexico,**

² **Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., Av. Normalistas 800, Colinas de la Normal, C.P. 44270, Guadalajara, Jalisco, Mexico.**

***corresponding author**

Dr. Isabel Guerrero-Legarreta

Departamento de Biotecnología

Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa

Apartado Postal 55-535, Mexico D.F., C.P. 09340, Mexico

Tel. (52)(55) 5804 47 17

Fax: (52)(55) 5804 4712

e-mail: isabel_guerrero_legarreta@yahoo.com

Short title: Volatile release from a model meat emulsion

ABSTRACT

The objective of this work was to develop a model meat emulsion in order to study the release of aroma-related compounds from the lipid and aqueous phases. Hexanal, octanal and nonanal were taken as indicators of lipid oxidation whereas 1-ethyl-3,5-dimethyl pyrazine and 2-methyl pyrazine were Maillard reaction indicators. Four systems were studied: I) a model meat emulsion; II) phosphate buffer; III) phosphate buffer+myofibrillar proteins; IV) canola oil. Release of indicator compounds from each of the studied systems

was analyzed in the headspace. It was concluded that pyrazines mainly contributed to aroma in lipid systems and in protein solutions, but not in emulsions and non protein aqueous systems. Hexanal, octanal and nonanal were minor aroma contributors in lipid media, whereas hexanal and nonanal were released in small amount from protein emulsions. Conversely, octanal can be considered of an important aroma contributor in emulsions; the three aldehydes showed a high release from aqueous systems, with and without protein.

Key words: **volatiles, meat aroma, meat emulsion, aldehydes, pyrazines, myofibrillar proteins**

INTRODUCTION

Meat aroma comprises a wide variety of chemical compounds. It is the result of a number of factors such as substrate composition, pH, water activity, processing and storage conditions, and gas atmosphere, among others. It has been reported as composed of approximately 700 chemical compounds, generated in the fat and lean meat (1). However, concentration and type of meat aroma compounds varies with species, breed, premortem handling and processing, among other factors. Although type and concentration of volatiles present in meats result from diverse conditions and characteristics, aldehydes such as hexanal, octanal, and nonanal (2, 3) and pyrazines (4) are indicators of meat aroma. Contribution of chemical compounds to meat aroma depends on their release from the food matrix which, in turn, depends on ion strength, temperature, presence and concentration of other compounds, and hydrophobicity. Proteins particularly affect aroma perception due to interactions with aroma-related compounds (5). Lipids greatly influence flavor through their effect on perception (mouth feel, taste and aroma), flavor generation and stability (6), whereas carbohydrates tend to increase retention in the matrix (7). Food structure is also associated to release of aroma

compounds. In a two-phase system such as a protein emulsion, the concentration of these compounds in the lipid and aqueous phases, as well as the interface results in specific contributions due to diffusion to the gas phase (8).

The objective of this work was to develop a model meat emulsion in order to study the contribution of oil (disperse) and aqueous (continuous) phase to meat aroma by comparing the volatility of five compounds taken as indicators: three aldehydes (hexanal, octanal and nonanal) and two pyrazines (1-ethyl-3,5-dimethyl pyrazine and 2-methyl pyrazine).

MATERIALS AND METHODS

Raw material

Pork was obtained from five animals 24 hours after slaughtering in a certified local abattoir; no antemortem handling was recorded. *Longissimus dorsi* muscles were excised and taken to our laboratory in a portable cooler at 6 to 8°C within 20 minutes. The meat was cut into 2 cm³ cubes, vacuum packed in 100 g portions using a Multivac D-8941 (Koch, Kansas City, OK) at -700 mBar, and stored at -20°C until used.

Meat pH was measured in 10 g meat homogenized with 90 mL distilled water for 1 min; the slurry was filtered and pH measured in the filtrate with a potentiometer (Beckman, Fullerton, CA).

Myofibrillar protein extraction

Meat proteins were extracted according to the method reported by Ngapo *et al.* (9). Homogenized samples in water and ice (1:1:1) were stirred for 10 min in an ice bath, the connective tissue was separated by filtration through a cheese

cloth; 100 mL cold water (approximately 6°C) was mixed and stirring continued for 15 min. The homogenized mixture was centrifuged at 4,000 xg for 30 min, 4°C; the supernatant was discarded and the precipitate resuspended in 0.6 M NaCl, 50 mM phosphate buffer, pH 7. Protein concentration (9.112 mg_{protein}/mL) was analyzed by the method described by Peterson (10).

Protein extract characterization

Molecular weight of proteins in the meat extracts was carried out by SDS-PAGE, according to the method described by García *et al.* (11), in 12% polyacrylamide separation gels and 4% stacking gels using a Mini-Protean II slab cell (Bio-Rad, Richmond CA); 5 mg protein extract/mL and buffer solution (10% SDS+5% mercaptoethanol+0.05% bromophenol blue+10% glycerol+0.125% 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8) (1:30) was heated at 97°C for 3 min. Fifteen microliters protein samples and molecular weight markers (205 kDa myosin, 116 kDa β-galactosidase; 97.4 kDa phosphorilase b; 66 kDa bovine serum albumin; 45 kDa egg albumin) (Sigma C3312) were applied to the gels. The analysis was carried out at 200 V constant voltage and 4±1°C. The gels were stained with 0.1% Coomassie R-250+40% methanol+10% acetic acid for 30 min, destained in 40% methanol+10% acetic acid, and scanned in a Gel-Doc 2000 (Bio-Rad) fitted with a Quantity One™ software, version 4 (Bio-Rad).

Emulsion formulation and characterization

Emulsion formulation was attempted using excised pork fat, extracted with organic solvents and finally evaporating the solvent to obtain pure semisolid fat. However, due to the extremely low yield, it was decided to use canola oil as the lipid phase. Although canola oil is rich in oleic and linoleic acids (63 and 20%, respectively), whereas pork fat contain high amount of oleic and palmitic acids (47 and 25%, respectively), it was assumed that, being linoleic acid the most abundant in both lipids, oxidation reaction could proceed in a similar

manner.

Preliminary tests on emulsion formulation were carried out using 5 to 25% canola oil and 15 to 25% protein extract in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.5. Emulsions of 20 to 25% protein extract + 25% canola oil were stable after 24 h at room temperature. In subsequent experiments, emulsion formation was carried adding canola oil at 1 mL/min up to 25% final concentration to phosphate buffer with protein extract (20, 25, 30 and 35%) and dextrose, homogenizing in an ESGC homogenizer (Mettlen, Switzerland) at 13,000 rpm for 3 min at room temperature (approximately 18°C), the final protein concentration in the emulsion was analyzed by the method reported by Redinbaugh and Turley (12). Five percent dextrose was added to imitate a commercial meat emulsion formulation, as well as to promote Maillard reactions.

Emulsion capacity was analyzed according to the method reported by Swift *et al.* (13) based on electric resistivity. An acrylic cylinder (32 mm diameter, 100 mm high), one end closed, was fitted with two copper wires passing through holes drilled 1 cm from the closed end and attached to a digital voltmeter (Tektronics CDM 250, Tektronics, Beaverton, OR). The protein extract was placed in the cylinder and canola oil added with continuous stirring (13,000 rpm). Emulsifying capacity was reported as milliliters of added oil per mg protein at the point where resistivity was interrupted, and related to g protein.

Particle size and size distribution were analyzed in a Malvern Mastersizer equipment, Series 2600 (Malvern Instruments, Malvern, England) applying a log normal model (14).

Apparent viscosity (η_{app}) was analyzed with a Brookfield LVDV-1 viscometer (Brookfield Engineering Laboratory, Middleboro, MA) at 0.6 rpm deformation rate, and calculated considering the torque in the linear region between 20 and 60% (15).

Emulsion disruption

The emulsion was disrupted with a Branson ultrasound bath (Danbury, CT) at 25 Hz for 2 h; phase separation was observed in a light microscope Olympus B201 (Melville, NY) at 200x magnification, fitted to a 35 mm photographic camera (Olympus model SC35). The disrupted emulsion was centrifuged at 4,000 xg for 30 min at 3°C to separate the continuous and disperse phases (14).

Density and fraction volume analysis

Emulsion density before disruption, and density of the disperse and continuous phases after emulsion disruption were analyzed according to the method described by MacClemens (14) and related to disperse phase fraction volume of the following equation:

$$\Phi_{dp} = \frac{\rho_e - \rho_1}{\rho_2 - \rho_1}$$

where:

Φ_{dp} – disperse phase fraction volume

ρ_e – emulsion density

ρ_1 – continuous phase density

ρ_2 – disperse phase density

Protein analysis in the continuous and disperse phases

Volatile analysis

From preliminary emulsion tests it was concluded that the most stable formulation was: continuous phase: 35% myofibrillar protein extract, 0.1 M phosphate buffer and 0.01% sucrose, pH 7.5, $\Gamma = 0.6$; disperse phase: canola oil. Three aldehydes (hexanal, octanal and nonanal, 98% purity, Sigma) and two

pyrazines (1-ethyl-3,5-dimethyl pyrazine and 2-methyl pyrazine, 96% purity, Sigma) were used as aroma-release indicator compounds. They were added at 0, 2.0, 3.25, 5.0, 5.25 and 7.5 ppm to the following systems: I) canola oil; II) phosphate buffer; III) phosphate buffer+35% protein extract; IV) model meat emulsion. Each one of the four systems were placed in 10 mL vials and left standing for 1.5 h at room temperature (around 20°C) to release added volatiles. The five indicator compounds were collected using solid phase microextraction (SPME) technique by static headspace analysis (16). They were adsorbed in PDMS/DVB fibers (Supleco, Bellefonte, PA) exposed 5 min in the headspace at 20°C. Volatile desorption was carried out placing the fiber in a GC-FID injector for 5 min at 200°C. Gas chromatography (Shimadzu GC-21010 equipment, Kyoto, Japan), was carried out at 31.69 psi, 4.1 mL N₂/min total flow as carrier gas; 40°C oven initial temperature, 4 min ramp, 200°C final temperature; the equipment was attached with a HP-Wax-59 m column, 0.2 μm ID. Indicator compound concentration in the headspace, released from each system was compared to pure compounds; volatile release was calculated by the following equation (17):

$$K_{rel} = C_v/C_L$$

where:

K_{rel} – release index

C_v – concentration of pure compound added to the system

C_L – concentration of released compound from the system

Experimental design and data analysis

Emulsion formulation: Two experimental designs were studied to obtain the most stable emulsion formulation: a) Fixed variables: pH 7.5, 25% canola oil, $\Gamma = 0.1$; source of variation: protein extract concentration (20, 25, 30, 35%; 1.822, 2.278, 2.733 and 3.189 mg_{prot}/mL, respectively); b) Fixed variables: 25% canola oil, $\Gamma = 0.1$, 35% protein extract (3.189 mg_{prot}/mL); source of variation: pH (4.5, 5.5, 6.5, 7.5). The

response variables for both designs were emulsion capacity and particle size.

Volatile analysis: Samples were assigned to a completely randomized design; the sources of variation were: indicator compounds concentration (2.5, 3.25, 5.0, 6.25, and 7.5 ppm) and studied system (canola oil, phosphate buffer, phosphate buffer+protein extract, and model meat emulsion); the response variable was the release index.

Data were subjected to analysis of variance by ANOVA procedure and Duncan Multiple Range tests using a SAS program (18). All analysis were carried out at $\alpha = 0.05$, in triplicate

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of the emulsion system

Data analysis of the two preliminary emulsion systems (pH as fixed variable, four protein extract concentration levels; protein extract concentration as fixed variable, four pH levels) gave the results reported in Table 1. As expected, emulsifying capacity increased with protein concentration (from 8.89 to 11.74 mL_{oil}/g_{protein}) (Table 1); significant difference ($P < 0.001$) was observed from 30 to 35% protein extract; it also increased with pH (6.32 to 8.581 mL_{oil}/g_{protein} at pH 4.5 and 7.5, respectively). Although myofibrillar protein isoelectric point is around 5.5, where emulsifying capacity was expected to be at a minimum, pH 4.5 and 5.5 showed non significant difference ($P > 0.01$) with respect to emulsifying capacity at fixed protein concentration; conversely pH 6.5 and 7.5 significantly increase ($P < 0.001$) oil emulsification.

The emulsification process denatured proteins in a certain degree, increasing the emulsifying capacity. As reported by Fischer and Widder (5), partial denaturation in an aqueous medium changes the protein tridimensional

configuration, exposing reactive sites, either hydrophilic or dipole-dipole interaction promoters, and increasing its ability to form interfaces. Partial protein degradation, observed by MW peaks lower than 66 kDa (Figure 1) account for an increase in emulsifying capacity. Homogenization also had a profound effect on protein configuration, promoting partial degradation, but also contributing to the emulsifying capacity (Table 1).

The model emulsion showed a monodisperse particle size distribution that significantly decrease ($P < 0.001$) with increasing pH and protein extract concentration (Table 1). Having similar particle distribution and being in the same medium ionic strength, differences in emulsion viscosity were due to particle shape and charge (8). Due myofibrillar proteins high molecular weight, they behave as particles in suspension (19), therefore the system stability depends on colloidal factors such as ionic strength and particle shape, surface charge and distribution (20). Viscosity of 35% protein extract system considerably increased with increasing pH, although values were consistently lower than those when protein concentration varied (fixed pH 7.5). A non significant decrease ($P > 0.01$) in η_{app} (93.1 to 62.1 poise) was observed at pH 5.5 and 4.5, respectively, meaning that no net surface charge was generated. Conversely, pH increase to 6.5 resulted in net reduction of positive charges and reduced average particle size to $D_{3,2} = 5.5 \mu\text{m}$, while η_{app} increased to 112.5 poise. This fact was more noticeable when pH was increased from 6.5 to 7.5; at this point η_{app} significantly increased ($P < 0.001$) to 212 poise, and $D_{3,2}$ significant decreased ($P < 0.001$) to $3.4 \mu\text{m}$.

Effect of myofibrillar proteins

Increasing protein concentration from 20 to 35% significantly reduced ($P < 0.001$) average particle size and η_{app} ($P < 0.001$) due to partial protein degradation, as observed in SDS-PAGE of the protein extract (Figure 1). Emulsifying capacity was significantly different ($P < 0.001$) only at 35% protein extract concentration

(3.189 mg_{protein}/mL); more protein was available to emulsify fixed oil amounts. Fraction volume of the disperse phase significantly increased ($P < 0.001$) with increasing pH and protein extract concentration, although a more noticeable increase was observed with increasing protein concentration at fixed pH 7.5, due to more availability of emulsifier in the system. The effect of increasing fraction volume was also observed in increasing η_{app} and decreasing average particle size (Table 1). Due that protein is adsorbed at the emulsion interface by electrostatic interactions between charged aminoacid residues and polar heads of the lipid (21) volatile binding to protein increased with protein concentration at the interface. When protein covers most of the interface, volatile release decreases; however, at low protein concentrations no effect is observed due to poor coverage of proteins at the fat globule surface (20).

Myosin (>200 kDa) (a), small peaks of 120 to 100 kDa (b); 100 to 80 kDa (c) and 80 to 65 kDa (d), corresponding to intermediate (around 100 to 75 kDa) or regulatory proteins (80 to 60 kDa); and 60 to 50 kDa (e) and < 45 kDa (f), related to degradation products, were observed in the extract (Figure 1). As expected, proteins were more abundant in the continuous (buffer) than in the disperse (oily) phase due to their high solubility in medium ionic strength solutions such as phosphate buffer. However, myosin was present in similar amounts in the continuous and disperse phases; this protein adsorbed to the oil/water interface, and partially solubilized in the aqueous phase. Myosin, actin and actomyosin has been reported as the main responsible of functional properties of muscle systems (19).

Smaller proteins of 100-80 kDa (c) and 80 to 65 kDa (d) were evident in disperse phase, probably bound to the interface. Myofibrillar proteins partitioned between the interface and the continuous phase; however, protein-volatile interaction varied depending on the solubility of aroma compounds in each phase. High protein concentration in the emulsion favors protein-protein concentration (22); protein unfolding at the interface allows interactions

between non polar groups of the protein and lipids (21). On the other hand, lipid and aroma compound compete to protein binding at the interface (18). In our study, myosin possibly unfold, liberating other associated proteins of the troponin-tropomyosin complex, partially accounting for the 45 kDa peak, and interacting with aroma compounds; binding reduces volatile liberation to the headspace, making them less available to nose and mouth receptors, as observed in volatile release index from the model emulsion for 2-methyl pyrazine (Fig. 2), 1-ethyl-3,5-dimethyl pyrazine (Fig. 3), hexanal (Fig. 4) and nonanal (Fig. 5), but not for octanal (Fig. 6).

Volatile release

Differences were observed in pyrazines release indexes with respect to the studied systems, significantly higher ($P < 0.001$) in oil and buffer+protein. In these two systems, pyrazines release index decreased with volatile concentration, although a significant difference ($P < 0.001$) was observed for 1-ethyl-3,5-dimethyl pyrazine. High release from oil was due to no interaction with the non polar media. Non-protein buffer and emulsion systems showed significantly lower ($P < 0.001$) release indexes; non significant differences ($P > 0.01$) were observed for both pyrazine release indexes with respect to volatile concentration.

Protein solutions, as buffer+protein systems, are one-phase systems; protein solubility was promoted by ionic strength of the aqueous medium, therefore the tridimensional arrangement varied exposing hydrophilic groups which were solvated by water molecules (2). In this situation, methyl and ethyl radicals cannot easily interact with proteins; therefore pyrazines were released to the headspace. Pyrazine volatility decrease in buffer+protein due to interactions with amino or hydroxyl groups (17); non significant differences ($P > 0.01$) were observed between 1-ethyl-3,5-dimethyl pyrazine and 2-methyl pyrazine release from emulsions. Conversely, release of 1-ethyl-3,5-dimethyl pyrazines was

significantly higher ($P < 0.001$) than 2-methyl pyrazine in buffer+protein due to a stronger net hydrophobic interaction between the methyl radical and peptide chains (23). Hydrophobic interactions also accounted for low release from non protein buffer, although non significant differences ($P > 0.01$) were observed between the non protein buffer and the emulsion for both pyrazines.

Release of hexanal and nonanal from oil and emulsion systems showed non-significantly difference ($P > 0.01$) with respect to volatile concentration (Figures 4 and 5). Hexanal and nonanal indexes significantly decreased ($P < 0.001$) as volatile concentration increased in buffer+protein, and hexanal indexes from buffer. No significant differences ($P > 0.01$) were observed in nonanal release from non protein buffer with respect to volatile concentration. The lowest release indexes for hexanal and nonanal occurred in the emulsion and oil systems ($P > 0.01$). Hexanal release indexes, although following similar trends as nonanal in oil, buffer+protein and emulsion systems, were significantly higher ($P < 0.001$). In a two-phase system, such as a protein emulsion, hexanal and nonanal interact at the interface with unfolded proteins through mechanisms of hydrophobic nature, and cannot easily diffuse through the continuous phase (17). In addition, the shorter the aliphatic chain the higher the solubility as a result of its lower hydrophobicity (24). The decrease in hexanal release with increasing volatile concentration in buffer, with and without proteins, was due to its relative solubility in water (21); the concentration of solubilized hexanal increased with increased added volatile to the system. O'Neill and Kinsella (25) reported a decrease in aldehydes volatility in the presence of proteins, this type of interaction mainly depends on carbonyl radicals reacting with amine or hydroxyl groups. Fischer and Widder (5) also reported that esters show a slight but continuous volatility decrease with increasing protein content in protein solutions.

Octanal showed different release trends as compared to the other studied aldehydes. Conversely as pyrazines, hexanal and nonanal, octanal was not retained by

emulsions; release indexes were significantly higher ($P < 0.001$) from emulsions as compared to oil (Fig. 6). Octanal release showed no significant differences ($P > 0.01$) with respect to volatile concentration in all the studied systems. However, in the same way as observed for hexanal and nonanal, the highest release indexes were observed in buffer with and without protein; release of all aldehydes from the oil was significantly lower ($P < 0.001$) than from buffer and buffer+protein.

Due to protein unfolding and degradation at the emulsion interface, reactive sites were exposed; therefore, chemical interaction seems the event most likely occurring for aldehydes retention in a protein emulsion. However, hydrophobicity is also a leading retention mechanism; Schirle-Keller *et al.* (26) reported that small changes in lipid content had significant effects on vapor pressure of lipid-soluble compounds, whereas partial pressure of water-soluble compounds has little effect in the system. According to these authors, due to the non polar nature of the studied aldehydes, lipid presence in emulsion and pure oil systems considerably reduced aldehyde vapor pressure, therefore reducing the release indexes.

CONCLUSIONS

Under the experimental conditions described in this paper, pyrazines were easily released from aqueous with proteins, and from oil; low pyrazine release was observed in emulsions and non protein aqueous systems, where aroma release decreased as pyrazines concentration increased. Pyrazines, therefore, mainly contributed to aroma in lipid systems and in protein solutions. They cannot be considered as aroma contributors in emulsions due to binding to unfolded protein at the interface, and aqueous systems without protein. Hexanal, octanal and nonanal were efficiently retained in the oil system; therefore these volatiles are minor aroma contributors in lipid media. Hexanal and nonanal were also minor aroma components in meat emulsions. Conversely, octanal can be considered of an important aroma contributor in emulsions and in buffer with and without protein. In general, aldehydes showed

high release indexes in aqueous systems, with or without added myofibrillar proteins. The effect of two phases (protein emulsion) or one phase (protein solution) was mainly due to hydrophobic interactions between proteins and ethyl/methyl pyrazines radicals. Release was significantly reduced for 2-methyl pyrazine, 1-ethyl-3,5-dimethyl pyrazine, hexanal and nonanal in emulsions, due to interaction with unfolded proteins at the interface; this was not observed for octanal, where release indexes were significantly higher in emulsion as compared to the other volatiles.

ACKNOWLEDGMENTS

Author Herrera Jiménez thanks the National Council of Science and Technology (CONACYT), Mexico for a graduate scholarship; and Universidad Autónoma Metropolitana for financial support during the doctoral thesis writing.

REFERENCES

1. Shahidi, F. Flavor of meat and meat products- and overview. In *Flavor of Meat and Meat Products*; Shahidi, F., Ed.; Chapman and Hall: New York, 1994; 1-3.
2. Kersch, R.; Grosch, W. Comparative Evaluation of Potent Odorants of Boiled Beef by Aroma Extract Dilution and Concentration Analysis. *Z. Lebensm. Unter. Forsch. A*. 1997, *204*, 3-6.
3. Shahidi, F.; Pegg, R.B. Hexanal as an Indicator of Meat Flavor Deterioration. *J Food Lipids* 1993, *1*, 177-186.
4. Mottram, D.S. The Chemistry of Meat Flavour. In *Flavour of Meat, Meat Products and Seafoods*; Shahidi, F., Ed.; Blackie Academic and Professional: London, England, 1998; 5-26.

5. Fischer, N.; Widder, S. How Proteins Influence Food Flavor. *Food Technol.* 1997, **51** (1), 68-70.
6. De Roos, K.B. How Lipids Influence Food Flavor. *Food Technol.* 1997, **51** (1), 60 -62.
7. Goubert, I.; Le Querré, J.L.; Voilley, A. Retention of Aroma Compounds by Carbohydrates: Influence of their Physicochemical Characteristics and on their Physical State. *J. Agric. Food Chem.* 1998, **46**, 1981-1990.
8. Miettinen, S.M.; Tuorila, H.; Piironen, V.; Vehkalahti, K.; Hyvönen, L. Effect of Emulsion Characteristics on the Release of Aroma as Detected by Sensory Evaluation, Static Headspace Gas Chromatography and Electronic Nose. *J. Agric. Food Chem.* 2002, **50**, 4232-4239.
9. Ngapo, T.; Wilkinson, B.; Chong, R.; Haisman, D. In *Gelation of Bovine Myofibrillar Protein Induced by 1,5-gluconolactone*. Proceedings of the 38th International Congress of Meat Science and Technology. Clermont-Ferrand France, 1992.
10. Peterson, G.L. Determination of Total Protein. *Meth. Enzym.* **1983**, **91**, 95-119.
11. García, C.F.L.; Dimes, L.E.; Haard, N.F. Substrate-gel Electrophoresis for Composition and Molecular Weight of Proteinases or Proteinaceous Proteinase Inhibitors. *Anal. Biochem.* **1993**, **214**, 65-69.
12. Redinbaugh, M.G.; Turley, R.B. Adaptation of the Bicinchoninic Acid Protein Assay for use with Microtiter Plates and Sucrose Gradient Fractions. *Anal. Biochem.* 1986, **153**, 267-271.

13. Swift, C.E.; Lockett, C.; Fryar, A.J. **Comminuted Meat Emulsions: The Capacity of Meats for Emulsifying Fats.** *Food Technol.* 1961, **15** (11), 468-471.
14. MacClemens, D.J. *Food Emulsions: Principles, Practice and Techniques*; CRC Press: Boca Raton, Florida, 1999.
15. Steffee, J.F. *Rheological Methods in Food Process Engineering*; Freeman Press: East Lansing MI, 1996; 428 pp.
16. Escalona, H.; Piggott, J.R.; Conner, J.M.; Paterson, A. **Headspace Concentrations of Alcohols and Aldehydes at Different Ethanol Concentrations.** *Italian J. Food Sci.* 1999, **11**, 241-248.
17. Seuvre, A.M.; Espinoza-Díaz, M.A.; Voilley, A. **Transfer Aroma Compounds Through the Lipidic-Aqueous Interface in a Complex System.** *J. Agric. Food Chem.* 2002, **50**, 1106-1110.
18. **Statistical Analysis System; PC-SAS User's Guide.** SAS Institute, Inc.; Cary, NC, 1999.
19. Li-Chan, E.; Nakai, S.; Wood, D.F. **Relationship Between Functional (Fat Binding, Emulsifying) and Physicochemical Properties of Muscle Proteins. Effects of Heating, Freezing, pH and Species.** *J. Food Sci.* 1985, **50**(4), 1034-1040.
20. Dickinson, E. **Hydrocolloids at Interfaces and the Influence on the Properties of Dispersed Systems.** *Food Hydrocol.* 2003, **17**, 25-39.
21. Phillipe, E.; Seuvre, A.M.; Colas, B.; Langendorff, V.; Schippa, C.; Voilley, A. **Behavior of Flavour Compounds in Model Food Systems: A Thermodynamic Study.** *J. Agric. Food Chem.* 2003, **51**, 1393-1398.

22. Gianelli, P.; Flores, M.; Toldrá, F. Interactions of Soluble Peptides and Proteins from Skeletal Muscle on the Release of Volatile Compounds. *J. Agric. Food Chem.* 2003, **51**, 6828-6834.
23. Boudaud, N.; Dumont, J.P. Interactions Between Flavor Components and Beta-Lactoglobulin. In *Flavor-Food Interactions*; McGorin, R.J., Leland, J.V., Eds.; American Chemical Society: Washington, 1996; 90-97.
24. Langurieux, S.; Crouzet, J. Protein-Aroma interactions. In *Food and Macromolecules*; Dickinson, E.; Lorient, D.; Eds.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, England, 1995; 123-133.
25. O'Neill, T.E.; Kinsella, J.E. Binding of Alkaline Flavors to Lactoglobulin: Effects of Conformational and Chemical Modification. *J. Agric. Food Chem.* 1987, **35**, 906-909.
26. Schirle-Keller, J.P.; Reineccius, G.A.; Hatchwell, L.C. Flavor Interactions with Fat Replacers: Effect of Oil Level. *J. Food Sci.* 1994, **59**, 813-815.

Table 1 Emulsion mean particle diameter ($D_{3,2}$), apparent viscosity (η_{app}), emulsifying capacity (EC) and fraction volume of the disperse phase (ϕ_{dp}), varying pH and protein extract concentration.

	$D_{3,2}$ (μm)	η_{app} (poise)	EC ($\text{mL}_{oil}/\text{g}_{protein}$)	Fraction volume (ϕ_{dp})
Fixed variables: 25% canola oil, 35% protein extract, $\Gamma=0.6$				
pH				
4.5	37.65 ^a	62.1 ^a	6.329 ^a	0.2692 ^a
5.5	37.2 ^a	93.1 ^a	7.338 ^a	0.3067 ^b
6.5	5.5 ^b	112.5 ^b	8.016 ^b	0.4311 ^c
7.5	3.4 ^c	212.0 ^c	8.581 ^c	0.7713 ^d
Fixed variables: 25% canola oil, pH 7.5, $\Gamma=0.6$				
% protein extract				
20	27.1 ^a	50.5 ^a	8.89 ^a	0.0664 ^a
25	26.9 ^b	131.2 ^b	10.94 ^a	0.4419 ^b
30	2.9 ^c	157.0 ^b	11.15 ^a	0.6689 ^c
35	2.8 ^c	212.3 ^c	11.74 ^b	0.7713 ^d

^{a,b} different letters indicate significant differences ($\alpha=0.05$)

FIGURE CAPTIONS

Figure 1 **SDS-PAGE** densitograms of proteins in the extract, the continuous and the disperse phases

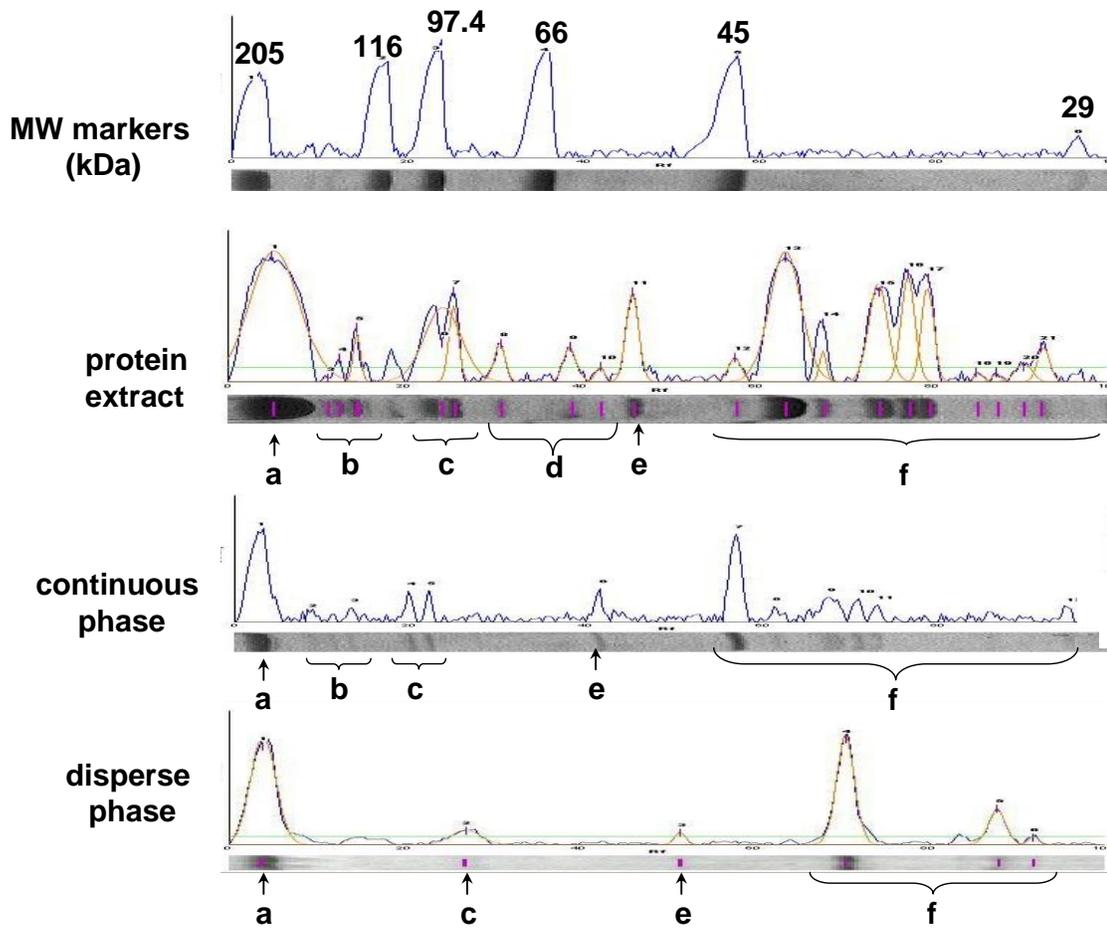
Figure 2 **Volatile release index of 2-methyl pyrazine**

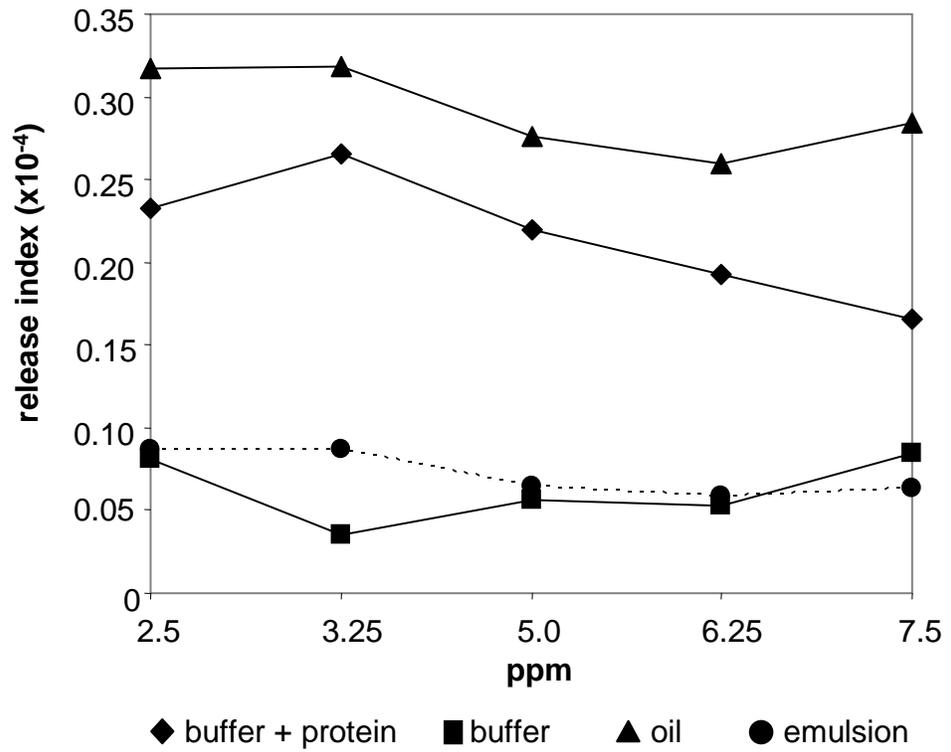
Figure 3 **Volatile release index of 1-ethyl-3,5-dimethyl pyrazine**

Figure 4 **Volatile release index of hexanal**

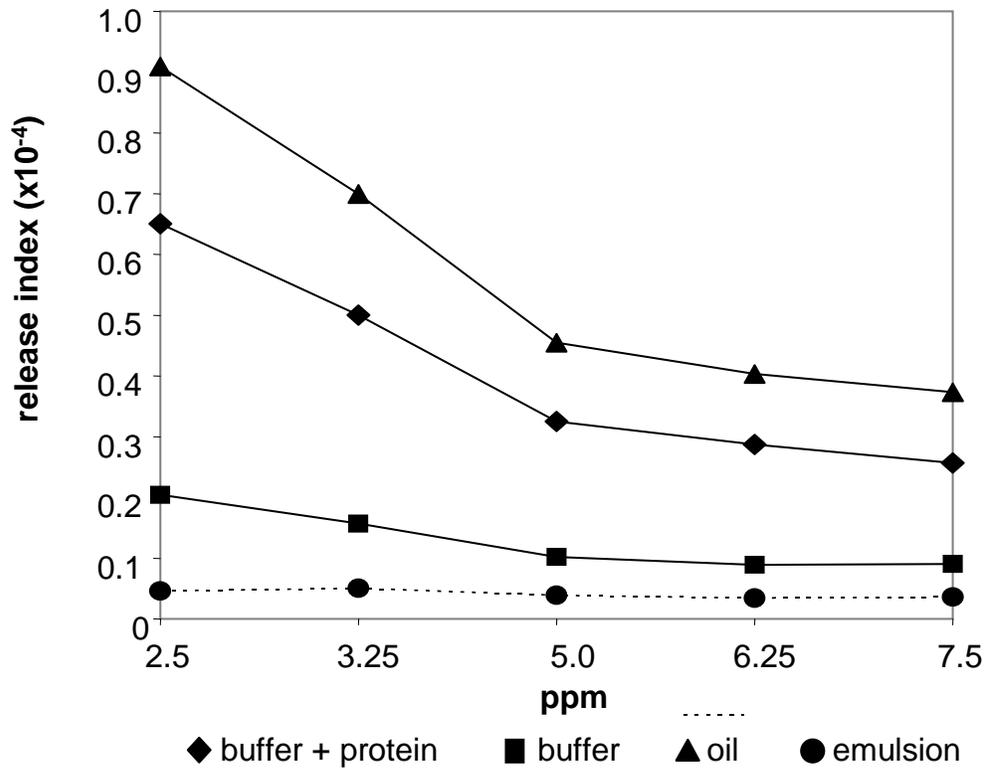
Figure 5 **Volatile release index of nonanal**

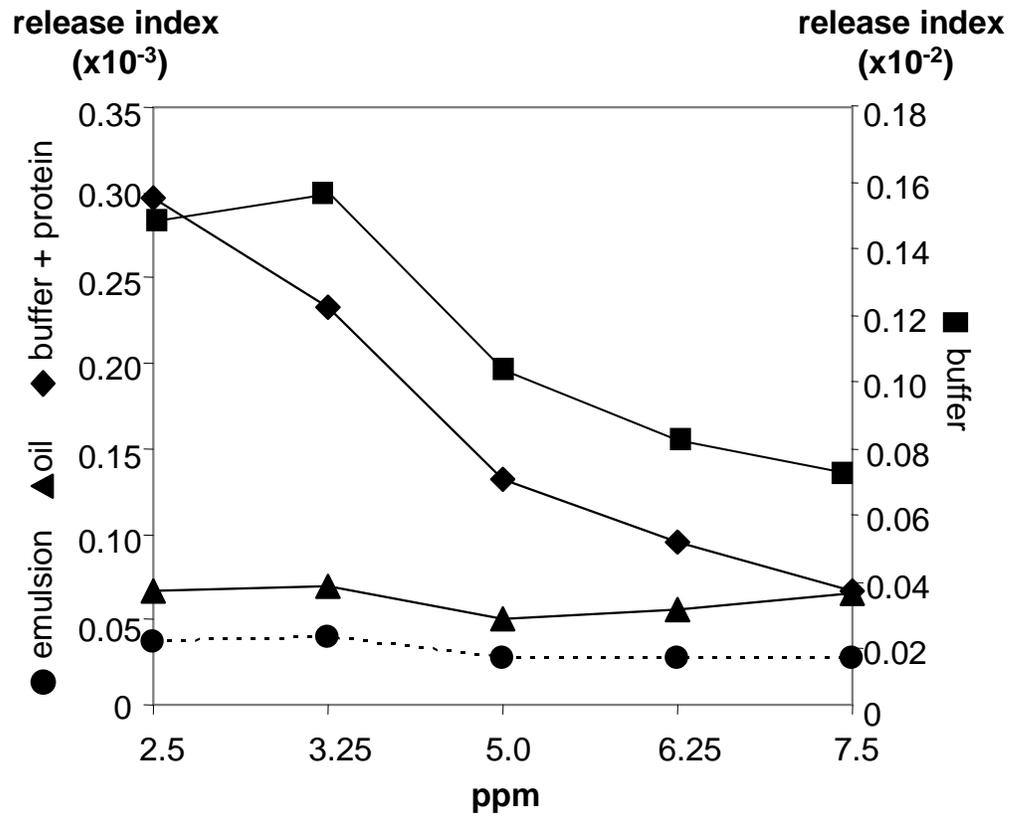
Figure 6 **Volatile release index of octanal**

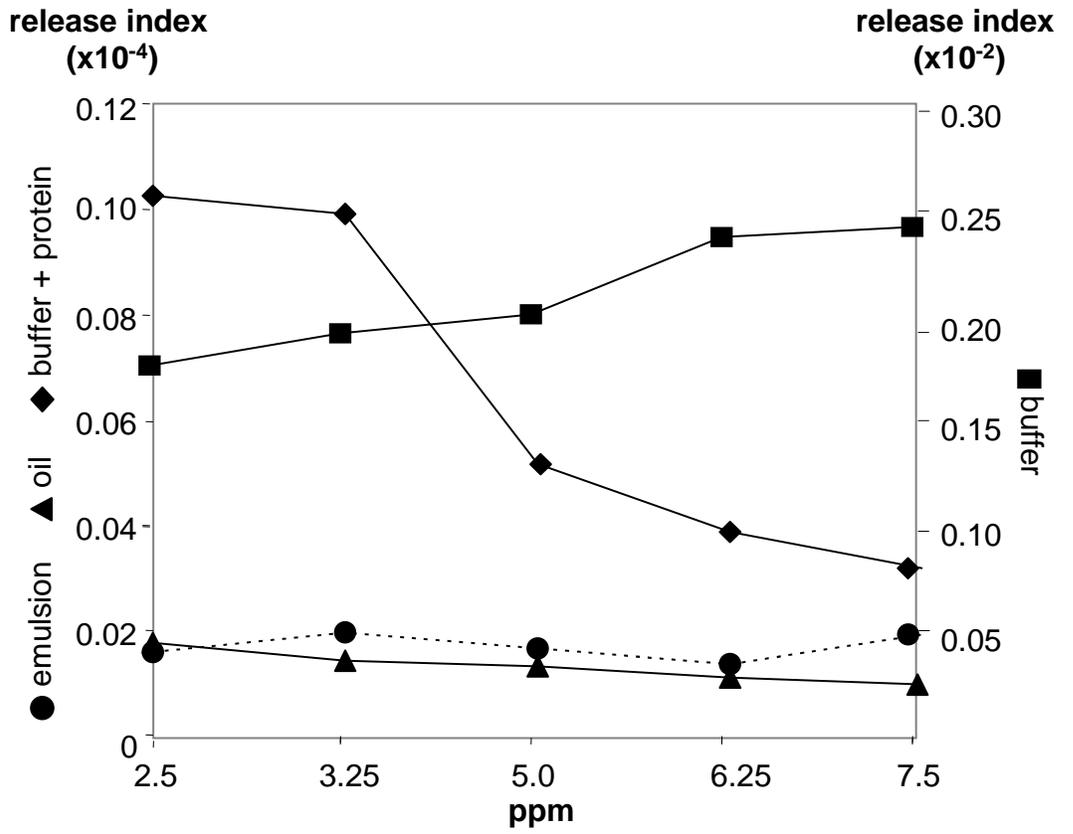


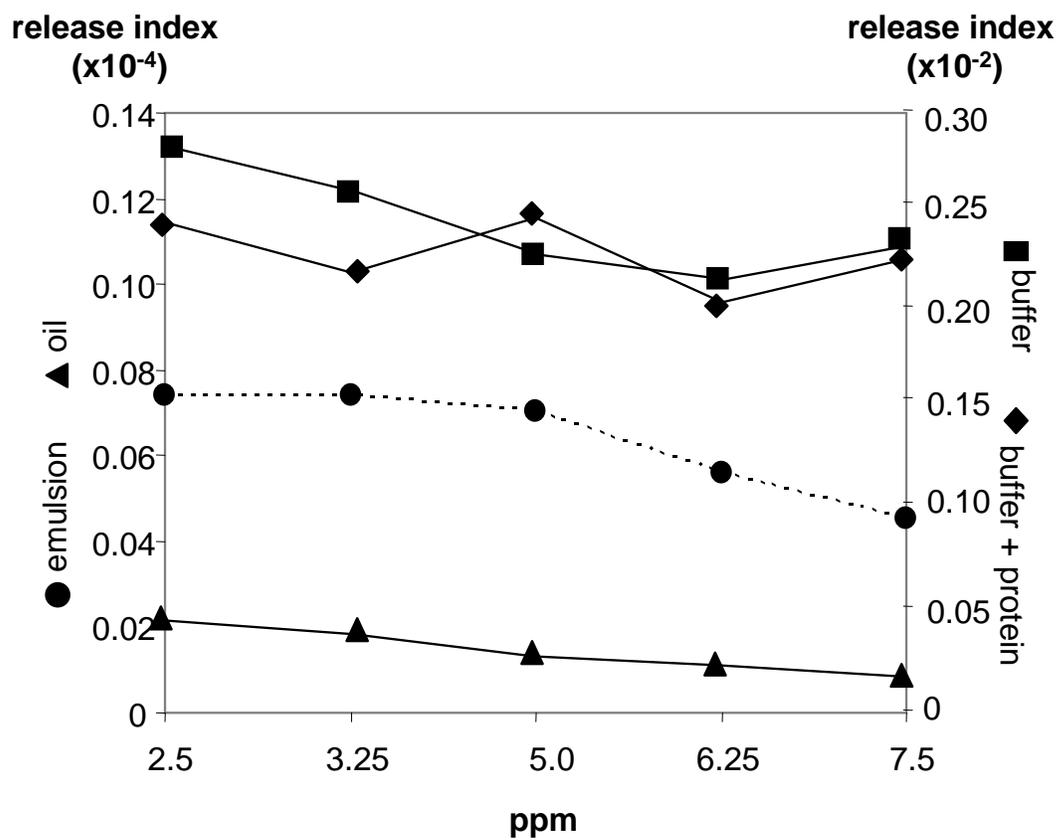


a) myosin (>200 kDa); b) 120 to 100 kDa; c) 100 to 80 kDa; (d) intermediate or regulatory proteins; e) 60 to 50 kDa; f)









ANEXOS

Anexo I

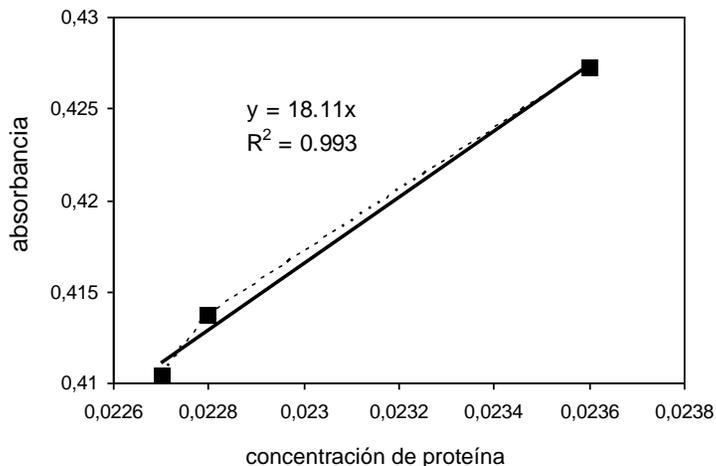
Método de biuret para determinación de concentración proteica

Reactivos

- Reactivo de Biuret: 1.5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 6.0 g $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 30 g NaOH (Baker, Xalostoc, México). Aforo a 1 L con H_2O destilada
- Solución estándar de albúmina sérica bovina, BSA (10 mg/ mL) (Sigma, Toluca, México).

Metodología

A partir de la solución de BSA se elaboró una curva de calibración de 10 puntos, en el intervalo de 1 a 10 mg/mL, así como 0.4 mL de muestras a dilución 1:4 del extracto proteico-amortiguador de suspensión (Ngapo y col., 1992). Tanto la curva de calibración como las muestras diluidas se colocaron en tubos de ensayo; se preparó un blanco con agua. A cada uno de los tubos preparados se añadió 1.6 mL de reactivo de Biuret, se homogenizó la mezcla de cada tubo y se dejó a temperatura ambiente durante 30 min para el desarrollo de color. Al cabo de este tiempo se midió la absorbancia a cada tubo a 560 nm en un espectrofotómetro (Beckman, modelo DU-60, Fullerton, California) contra el blanco.

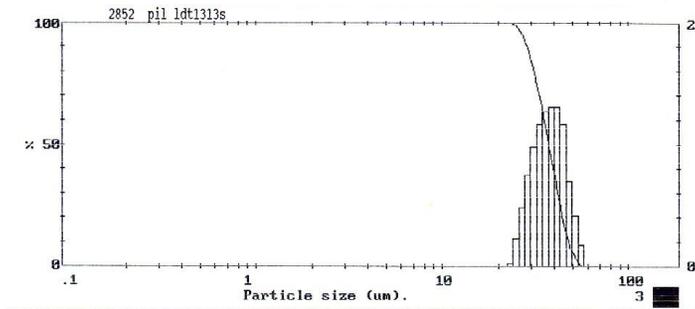


Curva estándar

Anexo II. Análisis de Varianza: caracterización de las emulsiones modelo

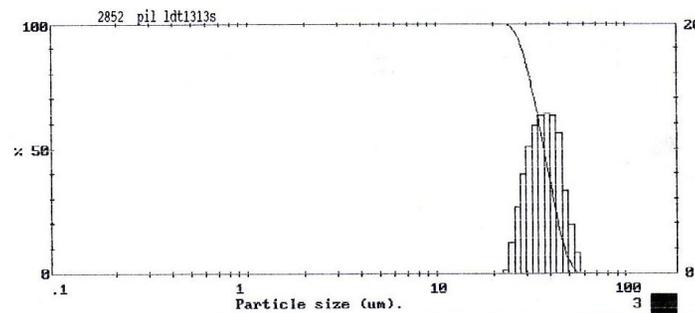
Variable	P>	R ²	% extracto proteico	pH
Capacidad de emulsificación, EC (mL _{oil} /g _{protein})	0.001	0.934	0.001	0.001
Tamaño medio de partícula, D _{3,2} (μm)	0.001	0.945	0.001	0.001
Viscosidad aparente η _{app} (poise)	0.001	0.801	0.001	0.001
Densidad, ρ (g/mL)	0.0861	0.857	0.715	0.502
Fracción volumen, φ _{dp}	0.001	0.849	0.001	0.001

Anexo III. Distribución de tamaño de partícula



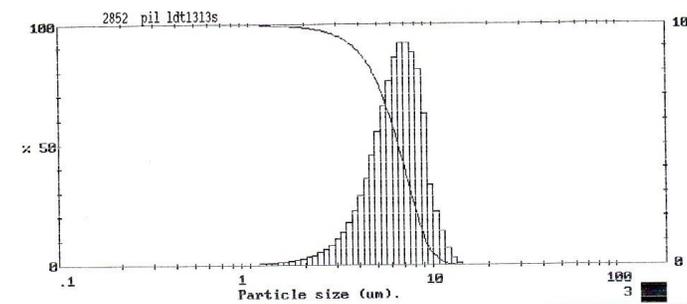
Upper	in	Lower	Under	Upper	in	Lower	Under	Upper	in	Lower	Under	Span
				36.3	23.9	31.4	21.8	6.18	0.0	5.33	0.0	0.50
				31.4	16.2	27.1	5.6	5.33	0.0	4.60	0.0	D[4,3]
				27.1	5.6	23.3	0.0	4.60	0.0	3.97	0.0	37.65µm
118	0.0	102	100	23.3	0.0	20.2	0.0	3.97	0.0	3.42	0.0	D[3,2]
102	0.0	88.2	100	20.2	0.0	17.3	0.0	3.42	0.0	2.95	0.0	36.27µm
88.2	0.0	76.0	100	17.3	0.0	15.0	0.0	2.95	0.0	2.55	0.0	D[v,0.9]
76.0	0.0	65.6	100	15.0	0.0	12.9	0.0	2.55	0.0	2.19	0.0	47.14µm
65.6	0.0	56.6	100	12.9	0.0	11.1	0.0	2.19	0.0	1.90	0.0	D[v,0.1]
56.6	6.8	48.8	93.2	11.1	0.0	9.63	0.0	1.90	0.0	1.64	0.0	28.48µm
48.8	20.9	42.1	72.3	9.63	0.0	8.31	0.0	1.64	0.0	1.41	0.0	
42.1	26.6	36.3	45.7	8.31	0.0	7.16	0.0	1.41	0.0	1.22	0.0	
				7.16	0.0	6.18	0.0	1.22	0.0	0.32	0.0	
Source =	:Sample	Bean length =	2.2 mm	Normal				D[v,0.5]				37.21µm
Focal length =	.63 mm	Log. Diff. =	6.560	X =	34.71	N =	2.28					
Presentation =	pil	Obscuration =	0.2312	Volume Conc. =	0.1464%							
		Volume distribution		Sp.S.A	0.1654 m ² /cc.							Shape OFF

35% extracto proteico, pH 4.5



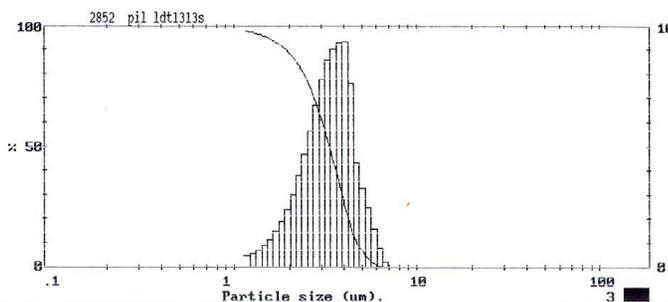
Upper	in	Lower	Under	Upper	in	Lower	Under	Upper	in	Lower	Under	Span
				36.3	24.1	31.4	23.2	6.18	0.0	5.33	0.0	0.51
				31.4	17.1	27.1	6.1	5.33	0.0	4.60	0.0	D[4,3]
				27.1	6.1	23.3	0.0	4.60	0.0	3.97	0.0	37.39µm
118	0.0	102	100	23.3	0.0	20.2	0.0	3.97	0.0	3.42	0.0	D[3,2]
102	0.0	88.2	100	20.2	0.0	17.3	0.0	3.42	0.0	2.95	0.0	36.00µm
88.2	0.0	76.0	100	17.3	0.0	15.0	0.0	2.95	0.0	2.55	0.0	D[v,0.9]
76.0	0.0	65.6	100	15.0	0.0	12.9	0.0	2.55	0.0	2.19	0.0	46.94µm
65.6	0.0	56.6	100	12.9	0.0	11.1	0.0	2.19	0.0	1.90	0.0	D[v,0.1]
56.6	6.5	48.8	93.5	11.1	0.0	9.63	0.0	1.90	0.0	1.64	0.0	28.25µm
48.8	20.1	42.1	73.4	9.63	0.0	8.31	0.0	1.64	0.0	1.41	0.0	
42.1	26.0	36.3	47.4	8.31	0.0	7.16	0.0	1.41	0.0	1.22	0.0	
				7.16	0.0	6.18	0.0	1.22	0.0	0.32	0.0	
Source =	:Sample	Bean length =	2.2 mm	Normal				D[v,0.5]				36.87µm
Focal length =	.63 mm	Log. Diff. =	6.547	X =	34.71	N =	2.53					
Presentation =	pil	Obscuration =	0.2206	Volume Conc. =	0.1378%							
		Volume distribution		Sp.S.A	0.1667 m ² /cc.							Shape OFF

35% extracto proteico, pH 5.5



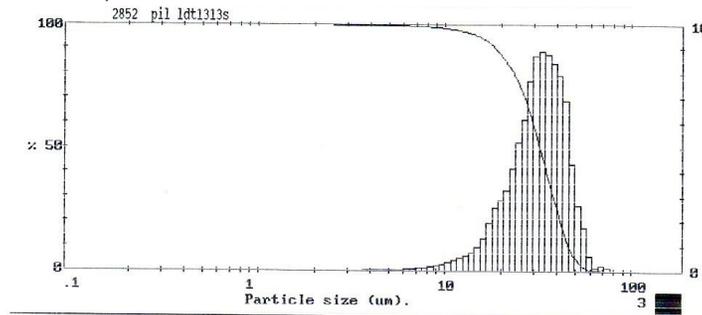
Upper	in	Lower	Under	Upper	in	Lower	Under	Upper	in	Lower	Under	Span
				36.3	0.0	31.4	100	6.18	15.2	5.33	29.5	D[4,3] 6.48µm
				31.4	0.0	27.1	100	5.33	10.9	4.60	18.6	
				27.1	0.0	23.3	100	4.60	7.0	3.97	11.6	
				23.3	0.0	20.2	100	3.97	4.4	3.42	7.2	
118	0.0	102	100	20.2	0.0	17.3	100	3.42	2.7	2.95	4.5	D[3,2] 5.50µm
102	0.0	88.2	100	17.3	0.0	15.0	100	2.95	1.6	2.55	2.9	
88.2	0.0	76.0	100	15.0	0.2	12.9	99.8	2.55	1.0	2.19	1.9	D[v,0.9] 9.08µm
76.0	0.0	65.6	100	12.9	1.6	11.1	98.2	2.19	0.6	1.90	1.3	
65.6	0.0	56.6	100	11.1	4.4	9.63	93.8	1.90	0.4	1.64	0.9	D[v,0.1] 3.79µm
56.6	0.0	48.8	100	9.63	12.7	8.31	81.0	1.64	0.3	1.41	0.6	
48.8	0.0	42.1	100	8.31	18.0	7.16	63.0	1.41	0.2	1.22	0.5	
42.1	0.0	36.3	100	7.16	18.3	6.18	44.7	1.22	0.5	0.32	0.0	
Source = :Sample				Bean length = 2.2 mm				Normal				D[v,0.5] 6.46µm
				Log. Diff. = 6.265				X = 6.46, N = 2.10				Shape OFF
Focal length = 63 mm				Obscuration = 0.2001				Volume Conc. = 0.0186%				
Presentation = pil				Volume distribution				Sp.S.A 1.0913 m ² /cc.				

35% extracto proteico, pH 6.5



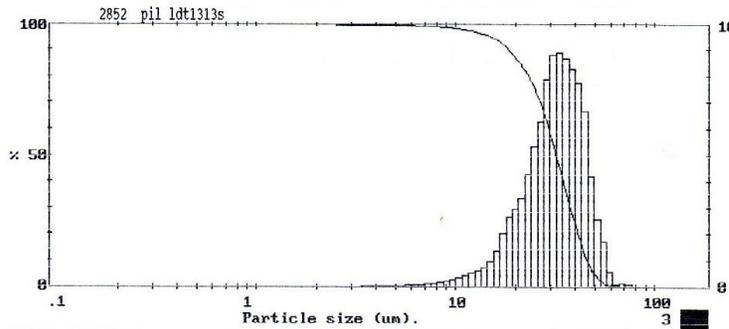
Upper	in	Lower	Under	Upper	in	Lower	Under	Upper	in	Lower	Under	Span
				36.3	0.0	31.4	100	6.18	3.5	5.33	95.8	D[4,3] 3.32µm
				31.4	0.0	27.1	100	5.33	7.0	4.60	88.8	
				27.1	0.0	23.3	100	4.60	16.1	3.97	72.7	
				23.3	0.0	20.2	100	3.97	18.8	3.42	53.9	
118	0.0	102	100	20.2	0.0	17.3	100	3.42	17.1	2.95	36.8	D[3,2] 2.78µm
102	0.0	88.2	100	17.3	0.0	15.0	100	2.95	12.8	2.55	24.1	
88.2	0.0	76.0	100	15.0	0.0	12.9	100	2.55	9.1	2.19	15.0	D[v,0.9] 4.70µm
76.0	0.0	65.6	100	12.9	0.0	11.1	100	2.19	5.5	1.90	9.5	
65.6	0.0	56.6	100	11.1	0.0	9.63	100	1.90	3.6	1.64	5.9	D[v,0.1] 1.93µm
56.6	0.0	48.8	100	9.63	0.0	8.31	100	1.64	2.2	1.41	3.7	
48.8	0.0	42.1	100	8.31	0.0	7.16	100	1.41	1.3	1.22	2.4	
42.1	0.0	36.3	100	7.16	0.7	6.18	99.3	1.22	2.4	0.32	0.0	
Source = :Sample				Bean length = 2.2 mm				Normal				D[v,0.5] 3.32µm
				Log. Diff. = 5.721				X = 3.31, N = 1.09				Shape OFF
Focal length = 63 mm				Obscuration = 0.2806				Volume Conc. = 0.0139%				
Presentation = pil				Volume distribution				Sp.S.A 2.1558 m ² /cc.				

35% extracto proteico, pH 7.5



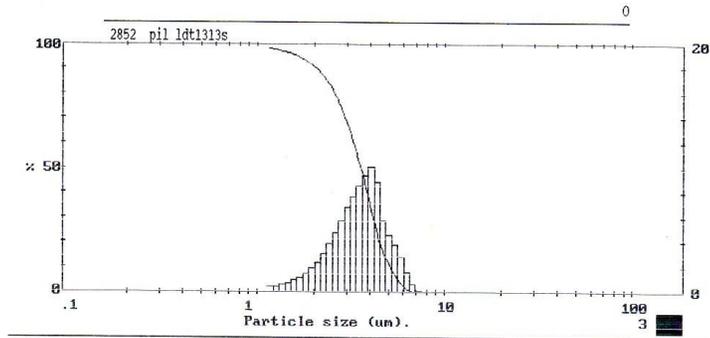
Upper	in	Lower	Under	Upper	in	Lower	Under	Upper	in	Lower	Under	Span
				36.3	17.8	31.4	46.8	6.18	0.1	5.33	0.4	D[4,3] 32.50µm
				31.4	16.0	27.1	30.7	5.33	0.1	4.60	0.3	
				27.1	11.1	23.3	19.7	4.60	0.1	3.97	0.2	
118	0.0	102	100	23.3	6.8	20.2	12.8	3.97	0.1	3.42	0.2	D[3,2] 27.17µm
102	0.0	88.2	100	20.2	5.3	17.3	7.5	3.42	0.0	2.95	0.1	
88.2	0.0	76.0	100	17.3	2.8	15.0	4.7	2.95	0.0	2.55	0.1	D[v,0.9] 45.97µm
76.0	0.4	65.6	99.6	15.0	1.6	12.9	3.1	2.55	0.0	2.19	0.1	
65.6	0.9	56.6	98.7	12.9	1.1	11.1	2.1	2.19	0.0	1.90	0.1	D[v,0.1] 18.73µm
56.6	4.8	48.8	93.9	11.1	0.7	9.63	1.4	1.90	0.0	1.64	0.1	
48.8	12.5	42.1	81.4	9.63	0.4	8.31	1.0	1.64	0.0	1.41	0.0	D[v,0.5] 32.24µm
42.1	16.8	36.3	64.6	8.31	0.3	7.16	0.7	1.41	0.0	1.22	0.0	
				7.16	0.2	6.18	0.5	1.22	0.0	0.32	0.0	Shape OFF
Source = :Sample				Beam length = 2.2 mm				Normal				D[v,0.5]
Focal length = 63 mm				Log. Diff. = 6.617				X = 32.28, N = 10.47				32.24µm
Presentation = pil				Obscuration = 0.2488				Volume Conc. = 0.1189%				
				Volume distribution				Sp.S.A 0.2209 m ² /cc.				

20% extracto proteico, pH 7.5



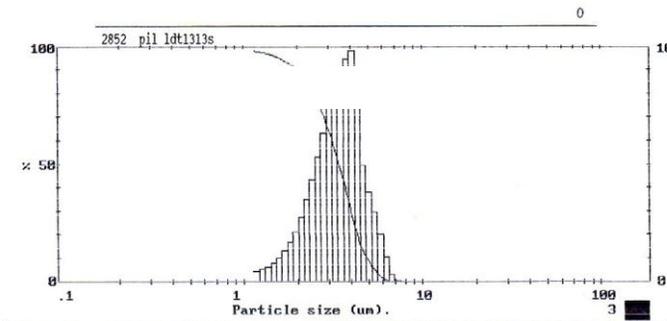
Upper	in	Lower	Under	Upper	in	Lower	Under	Upper	in	Lower	Under	Span
				36.3	17.8	31.4	47.9	6.18	0.1	5.33	0.4	D[4,3] 32.21µm
				31.4	16.3	27.1	31.6	5.33	0.1	4.60	0.3	
				27.1	11.3	23.3	20.2	4.60	0.1	3.97	0.2	
118	0.0	102	100	23.3	7.0	20.2	13.2	3.97	0.1	3.42	0.2	D[3,2] 26.93µm
102	0.0	88.2	100	20.2	5.5	17.3	7.7	3.42	0.0	2.95	0.1	
88.2	0.0	76.0	100	17.3	2.9	15.0	4.9	2.95	0.0	2.55	0.1	D[v,0.9] 45.70µm
76.0	0.2	65.6	99.8	15.0	1.6	12.9	3.2	2.55	0.0	2.19	0.1	
65.6	0.8	56.6	98.9	12.9	1.1	11.1	2.1	2.19	0.0	1.90	0.1	D[v,0.1] 18.58µm
56.6	4.7	48.8	94.3	11.1	0.7	9.63	1.4	1.90	0.0	1.64	0.1	
48.8	12.1	42.1	82.2	9.63	0.4	8.31	1.0	1.64	0.0	1.41	0.0	D[v,0.5] 31.94µm
42.1	16.5	36.3	65.7	8.31	0.3	7.16	0.7	1.41	0.0	1.22	0.0	
				7.16	0.2	6.18	0.5	1.22	0.0	0.32	0.0	Shape OFF
Source = :Sample				Beam length = 2.2 mm				Normal				D[v,0.5]
Focal length = 63 mm				Log. Diff. = 6.216				X = 31.98, N = 10.37				31.94µm
Presentation = pil				Obscuration = 0.2645				Volume Conc. = 0.1265%				
				Volume distribution				Sp.S.A 0.2228 m ² /cc.				

25% extracto proteico, pH 7.5



Upper	in	Lower	Under	Upper	in	Lower	Under	Upper	in	Lower	Under	Span
				36.3	0.0	31.4	100	6.18	6.0	5.33	92.4	0.86
				31.4	0.0	27.1	100	5.33	9.8	4.60	82.6	D[4,3]
				27.1	0.0	23.3	100	4.60	18.3	3.97	64.3	3.56µm
				23.3	0.0	20.2	100	3.97	18.7	3.42	45.6	D[3,2]
118	0.0	102	100	20.2	0.0	17.3	100	3.42	15.3	2.95	30.4	2.98µm
102	0.0	88.2	100	17.3	0.0	15.0	100	2.95	10.8	2.55	19.5	
88.2	0.0	76.0	100	15.0	0.0	12.9	100	2.55	7.5	2.19	12.1	D[v,0.9]
76.0	0.0	65.6	100	12.9	0.0	11.1	100	2.19	4.4	1.90	7.7	5.11µm
65.6	0.0	56.6	100	11.1	0.0	9.63	100	1.90	2.8	1.64	4.8	
56.6	0.0	48.8	100	9.63	0.0	8.31	100	1.64	1.8	1.41	3.1	D[v,0.1]
48.8	0.0	42.1	100	8.31	0.0	7.16	100	1.41	1.0	1.22	2.0	2.07µm
42.1	0.0	36.3	100	7.16	1.5	6.18	98.5	1.22	2.0	0.32	0.0	
Source = :Sample				Beam length = 2.2 mm				Normal				D[w,0.5]
Focal length = .63 mm				Log. Diff. = 5.905				x = 3.54, N = 1.16				3.55µm
Presentation = pil				Obscuration = 0.2706				Volume Conc. = 0.0143%				
				Volume distribution				Sp.S.A 2.0103 m²/cc.				Shape OFF

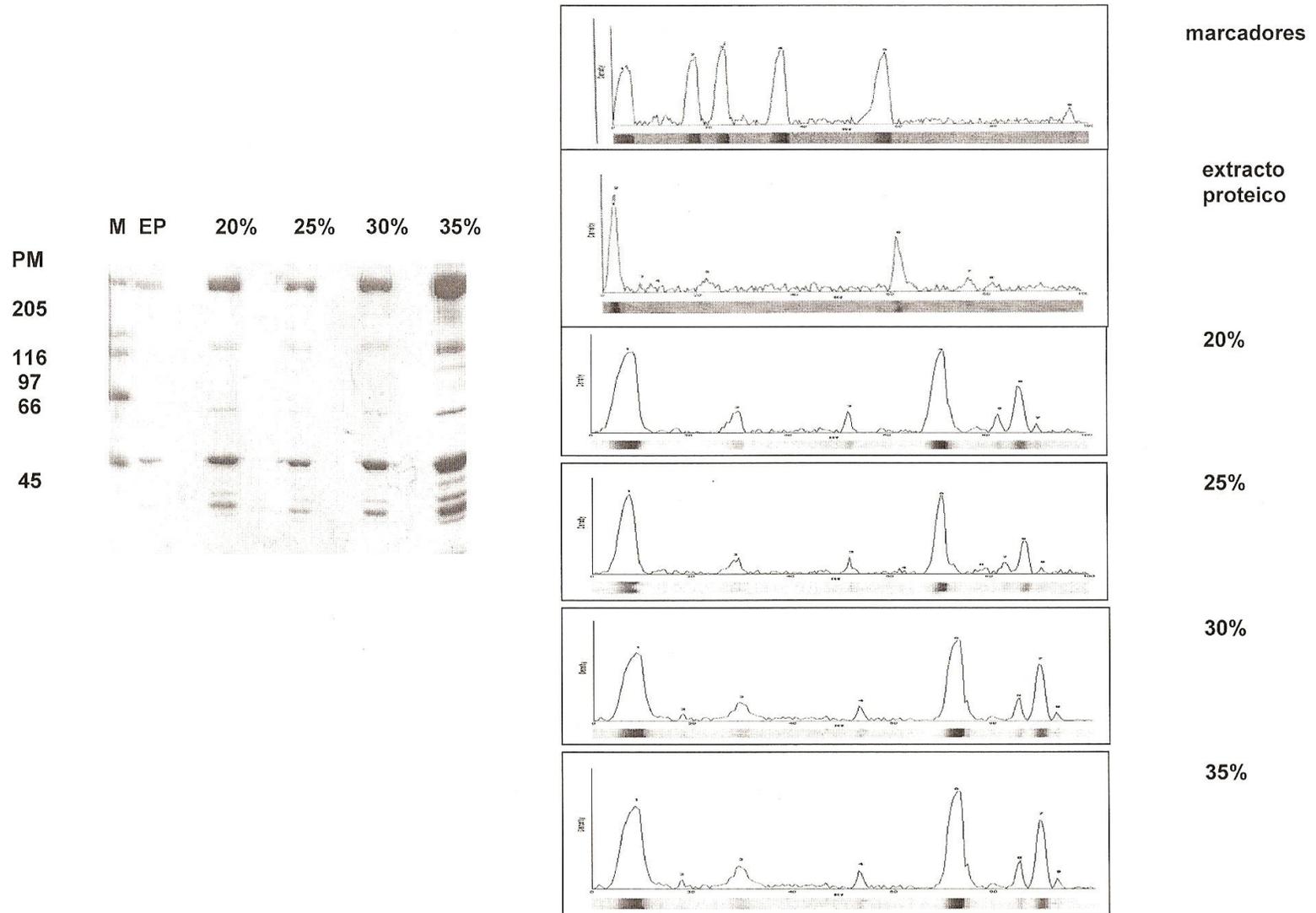
30% extracto proteico, pH 7.5



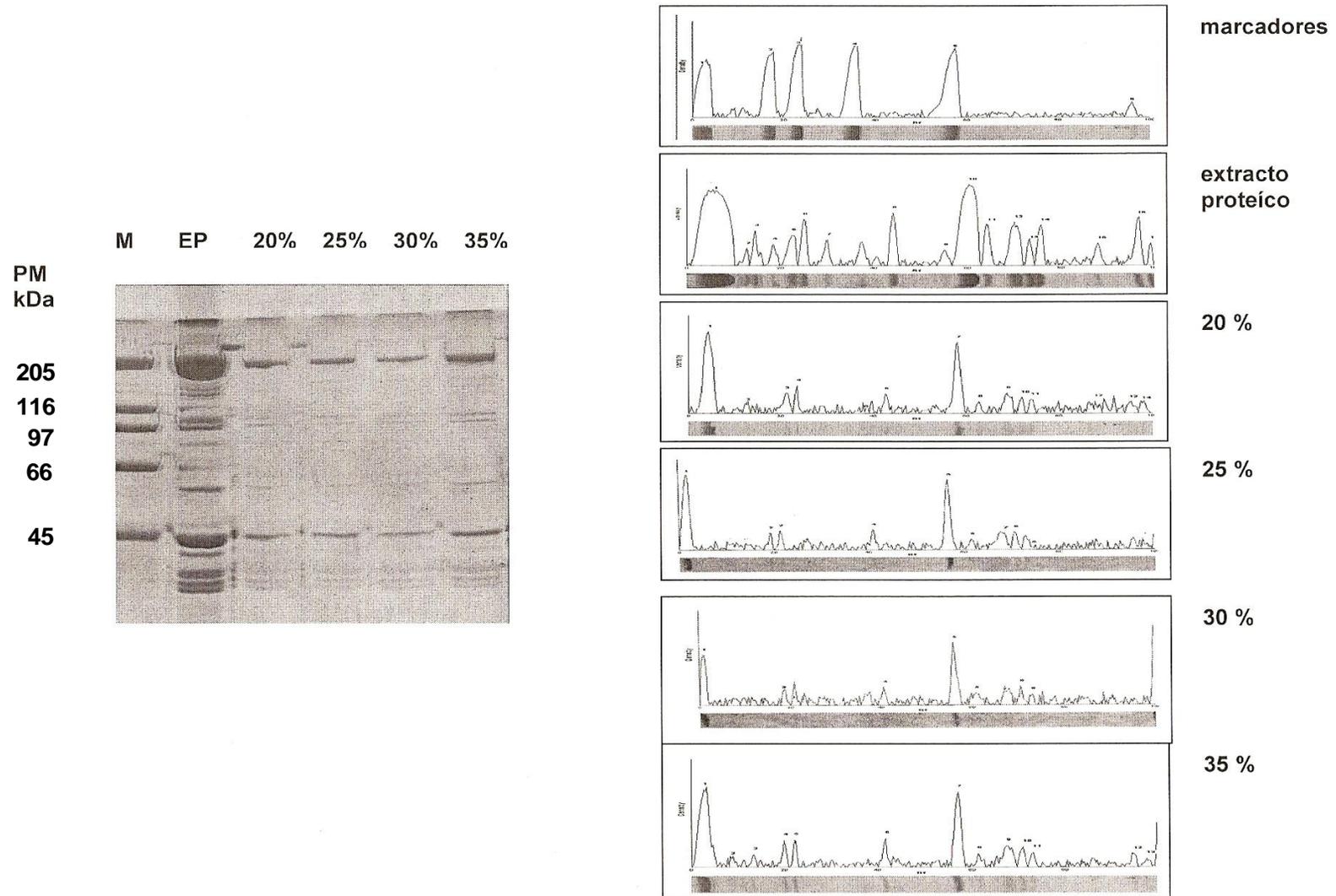
Upper	in	Lower	Under	Upper	in	Lower	Under	Upper	in	Lower	Under	Span
				36.3	0.0	31.4	100	6.18	4.4	5.33	94.7	0.83
				31.4	0.0	27.1	100	5.33	8.1	4.60	86.5	D[4,3]
				27.1	0.0	23.3	100	4.60	17.3	3.97	69.3	3.43µm
				23.3	0.0	20.2	100	3.97	19.1	3.42	50.2	D[3,2]
118	0.0	102	100	20.2	0.0	17.3	100	3.42	16.5	2.95	33.7	2.89µm
102	0.0	88.2	100	17.3	0.0	15.0	100	2.95	12.0	2.55	21.7	
88.2	0.0	76.0	100	15.0	0.0	12.9	100	2.55	8.4	2.19	13.3	D[v,0.9]
76.0	0.0	65.6	100	12.9	0.0	11.1	100	2.19	5.0	1.90	8.4	4.86µm
65.6	0.0	56.6	100	11.1	0.0	9.63	100	1.90	3.2	1.64	5.2	
56.6	0.0	48.8	100	9.63	0.0	8.31	100	1.64	1.9	1.41	3.3	D[v,0.1]
48.8	0.0	42.1	100	8.31	0.0	7.16	100	1.41	1.1	1.22	2.1	2.01µm
42.1	0.0	36.3	100	7.16	0.9	6.18	99.1	1.22	2.1	0.32	0.0	
Source = :Sample				Beam length = 2.2 mm				Normal				D[w,0.5]
Focal length = .63 mm				Log. Diff. = 6.000				x = 3.41, N = 1.11				3.42µm
Presentation = pil				Obscuration = 0.2461				Volume Conc. = 0.0123%				
				Volume distribution				Sp.S.A 2.0791 m²/cc.				Shape OFF

35% extracto proteico, pH 7.5

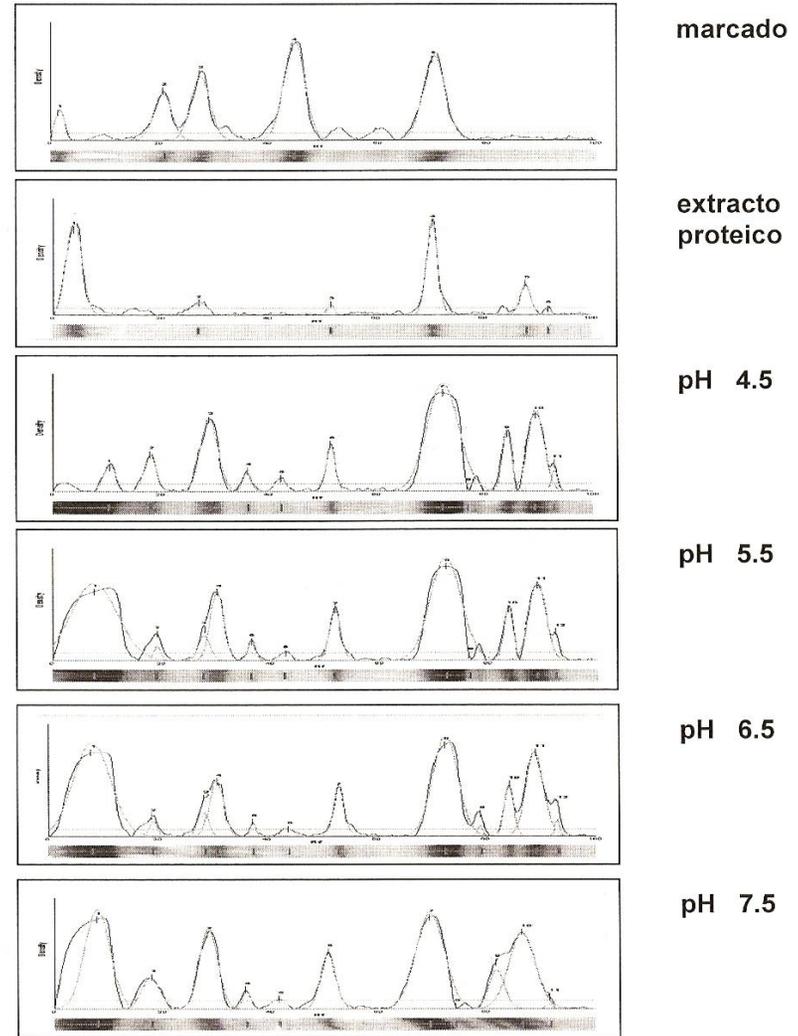
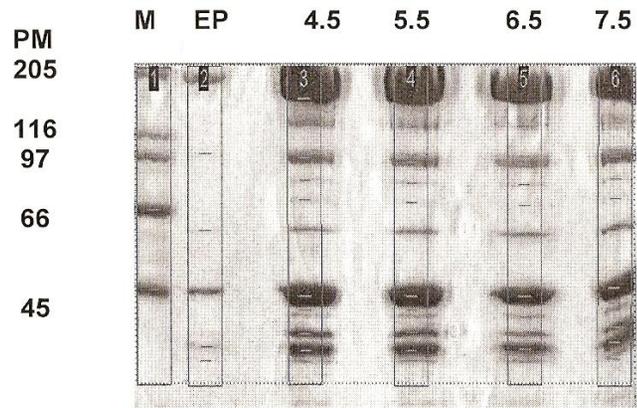
Anexo IV. Electroforesis de las proteínas presentes en la fase continua de la emulsión modelo (pH 7.5)



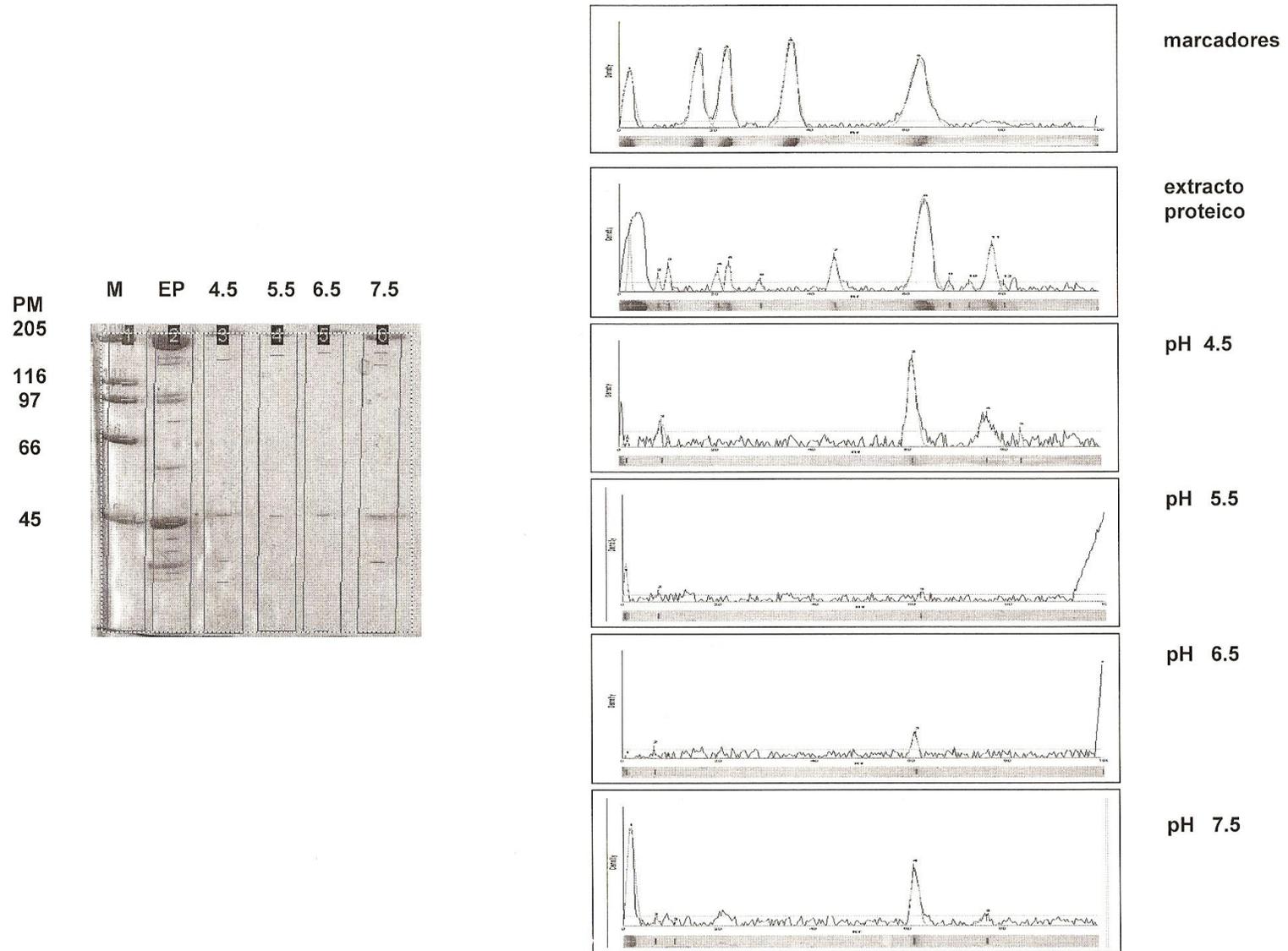
Anexo V. Electroforesis de las proteínas presentes en la fase dispersa de la emulsión modelo (pH 7.5)



Anexo VI. Electroforesis de las proteínas presentes en la fase continua de la emulsión modelo (35% extracto proteico)



Anexo VII. Electroforesis de las proteínas presentes en la fase dispersa de la emulsión modelo (35% extracto proteico)



Anexo VIII. Análisis de varianza: coeficiente de liberación (k) entre compuestos, sistemas y concentraciones iniciales.

R ²	Coeficiente de variación	P>	gl (error)	P>				
				compuesto	sistema	concentración inicial	compuesto x concentración	compuesto x sistema
0.6655	16.9466	0.0001	228	0.0001	0.0001	0.0358	0.4443	0.0252

Anexo IX. Comparación múltiple de medias de Duncan: coeficientes de liberación (k) entre compuestos, sistemas y concentraciones iniciales

Compuesto		Sistema		Concentración inicial	
	Valor medio (X 10 ⁻³)		Valor medio (X 10 ⁻³)		Valor medio (X 10 ⁻³)
octanal	1.495 a	amortiguador	1.808 a	7.5	0.898 a
nonanal	1.161 a	amortiguador + proteínas	0.1599 b	6.25	0.654 a,b
hexanal	0.685 b	aceite	0.0399 b	5.0	0.579 a,b
1-etil-3,5-dimetil pirazina	0.091 c	emulsión	0.0235 b	3.25	0.439 b
2-metil pirazina	0.0308 c			2.0	0.359 b

* diferentes letras en una columna indican diferencias significativas ($\alpha = 0.05$)

Anexo X. Análisis de varianza: coeficiente de liberación (k) entre compuestos y concentraciones iniciales dentro sistemas

Sistema	R ²	Coeficiente de variación	P>	gl (error)	P>		
					compuesto	concentración inicial	compuesto x concentración
amortiguador	0.9978	6.704	0.0001	65	0.0001	0.0001	0.0001
amortiguador + proteínas	0.8685	4.879	0.0001	65	0.0001	0.7289	0.7762
aceite	0.9631	3.157	0.0001	65	0.0001	0.0001	0.0001
emulsión modelo	0.7156	6.883	0.0001	65	0.0001	0.1221	0.8663

Anexo XI. Comparación múltiple de medias de Duncan: coeficientes de liberación (k) entre compuestos dentro de sistemas

amortiguador		amortiguador + proteínas		aceite		emulsión modelo	
compuesto	valor medio (x 10 ⁻³)						
octanal	4.563 a *	octanal	0.414 a	hexanal	0.125 a	hexanal	0.059 a
nonanal	4.001 b	hexanal	0.260 b	2-metil pirazina	0.053 b	1-etil-3,5-dimetil pirazina	0.023 b
hexanal	1.948 c	1-etil-3,5-dimetil pirazina	0.112 c	octanal	0.020 c	2-metil pirazina	0.013 b
2-metil pirazina	0.161 d	2-metil pirazina	0.039 d	1-etil-3,5-dimetil pirazina	0.017 d	octanal	0.011 b
1-etil-3,5-dimetil pirazina	0.013 e	nonanal	0.011 e	nonanal	0.0022 e	nonanal	0.0074 b

* diferentes letras en una columna indican diferencias significativas ($\alpha = 0.05$)

Anexo XII. Comparación múltiple de medias de Duncan: coeficientes de liberación (k) entre concentraciones iniciales dentro de sistemas

amortiguador		amortiguador + proteínas		Aceite		emulsión modelo	
concentración inicial (ppm)	valor medio ($\times 10^{-3}$)	concentración inicial (ppm)	valor medio ($\times 10^{-3}$)	concentración inicial (ppm)	valor medio ($\times 10^{-3}$)	concentración inicial (ppm)	valor medio ($\times 10^{-3}$)
7.5	2.783 a	5.0	0.168 a	7.5	0.0613 a	7.5	0.032 a
6.25	2.293 b	3.25	0.166 a	6.25	0.0456 b	6.25	0.0247 a
5.0	1.553 c	6.25	0.163 a	5.0	0.034 b,c	5.0	0.0203 a
3.25	1.321 d	7.5	0.149 a	3.25	0.0284 c	3.25	0.0183 a
2.5	1.088 e	2.5	0.144 a	2.5	0.0145 d	2.5	0.0176 a

* diferentes letras en una columna indican diferencias significativas ($\alpha = 0.05$)

Anexo XIII. Análisis de varianza: coeficiente de liberación (k) entre sistemas y concentraciones iniciales dentro compuestos

compuesto	R ²	Coeficiente de variación	P>	gl (error)	P>		
					sistema	concentración inicial	sistema x concentración
hexanal	0.998	2.052	0.0001	65	0.0001	0.0001	0.0001
octanal	0.992	5.077	0.0001	65	0.0001	0.0001	0.0001
nonanal	0.995	5.394	0.0001	65	0.0001	0.0001	0.0001
2-metil pirazina	0.992	7.938	0.0001	65	0.0001	0.0001	0.0001
1-etil-3,5-dimetil pirazina	0.838	7.631	0.0195	65	0.0001	0.2852	0.9749

Anexo XIV. Comparación múltiple de medias de Duncan: coeficientes de liberación (k) entre sistemas dentro compuestos

hexanal		octanal		nonanal		2-metil pirazina		1-etil-3,5-dimetil pirazina	
sistema	valor medio (x10 ⁻³)	sistema	valor medio (x10 ⁻³)						
amortiguador	1.948 a	amortiguador	4.563 a	amortiguador	4.001 a	aceite	0.053 a	amortiguador	0.161 a
amortiguador + proteínas	0.026 b	amortiguador + proteínas	0.414 b	amortiguador + proteínas	0.0105 b	amortiguador + proteínas	0.039 b	amortiguador + proteínas	0.1122 a
aceite	0.0125 c	aceite	0.021 c	emulsión modelo	0.0074 b	emulsión modelo	0.013 c	emulsión modelo	0.0238 b
emulsión modelo	0.0059 d	emulsión modelo	0.0107 c	aceite	0.0022 b	amortiguador	0.013 c	aceite	0.0169 b

* diferentes letras en una columna indican diferencias significativas ($\alpha = 0.05$)

Anexo XV. Comparación múltiple de medias de Duncan: coeficientes de liberación (k) entre concentraciones iniciales dentro compuestos

hexanal		octanal		nonanal		2-metil pirazina		1-etil-3,5-dimetil pirazina	
concentración inicial (ppm)	valor medio ($\times 10^{-3}$)	concentración inicial (ppm)	valor medio ($\times 10^{-3}$)	concentración inicial (ppm)	valor medio ($\times 10^{-3}$)	concentración inicial (ppm)	valor medio ($\times 10^{-3}$)	concentración inicial (ppm)	valor medio ($\times 10^{-3}$)
5.0	0.896 a	7.5	2.148 a	7.5	2.173 a	7.5	0.043 a	7.5	0.1284 a
7.5	0.770 b	5.0	1.825 b	6.25	1.295 b	6.25	0.0366 b	5.0	0.096 a
2.5	0.604 c	6.25	1.368 c	5.0	0.977 c	5.0	0.0328 c	6.25	0.095 a
6.25	0.585 d	2.5	1.076 d	2.5	0.705 d	3.25	0.0241 d	3.25	0.069 a
3.25	0.584 e	3.25	0.887 e	3.25	0.521 e	2.5	0.0129 e	2.5	0.064 a

* diferentes letras en una columna indican diferencias significativas ($\alpha = 0.05$)

Anexo XVI. Análisis de varianza: coeficiente de liberación (k) entre compuestos y sistemas dentro de concentraciones iniciales

concentración inicial	R ²	coeficiente de variación	P>	gl (error)	P>		
					compuesto	sistema	compuesto x sistema
2.5	0.997	10.603	0.0001	65	0.0001	0.0001	0.0001
3.25	0.992	12.834	0.0001	65	0.0001	0.0001	0.0001
5.0	0.998	10.956	0.0001	65	0.0001	0.0001	0.0001
6.25	0.997	11.305	0.0001	65	0.0001	0.0001	0.0001
7.0	0.998	10.379	0.0001	65	0.0001	0.0001	0.0001

Anexo XVII. Comparación múltiple de medias de Duncan: coeficientes de liberación (k) entre compuestos dentro de concentraciones iniciales

2.5		3.25		5.0		6.25		7.0	
compuesto	valor medio (x 10 ⁻³)								
octanal	1.176 a	Octanal	0.887 a	Octanal	1.461 a	Octanal	1.368 a	Nonanal	2.173 a
nonanal	0.705 b	Hexanal	0.584 b	Nonanal	0.783 b	Nonanal	1.295 a	Octanal	2.148 a
hexanal	0.604 c	Nonanal	0.521 c	Hexanal	0.718 c	Hexanal	0.585 b	Hexanal	0.770 b
1-etil-3,5-dimetil pirazina	0.068 d	1-etil-3,5-dimetil pirazina	0.069 d	1-etil-3,5-dimetil Pirazina	0.086 d	1-etil-3,5-dimetil pirazina	0.095 c	1-etil-3,5-dimetil pirazina	0.128 c
2-metil pirazina	0.0129 e	2-metil pirazina	0.024 e	2-metil pirazina	0.032 e	2-metil pirazina	0.036 c	2-metil pirazina	0.043 c

* diferentes letras en una columna indican diferencias significativas ($\alpha = 0.05$)

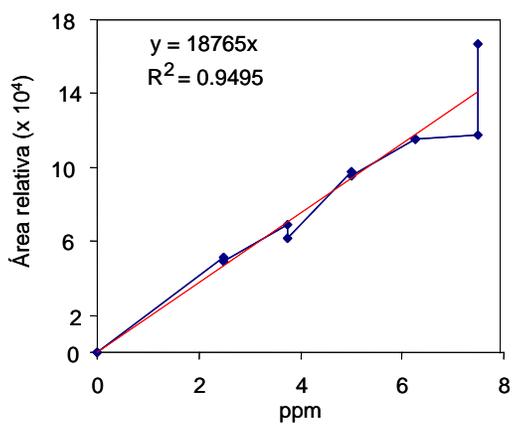
Anexo XVIII. Comparación múltiple de medias de Duncan: coeficientes de liberación (k) entre sistemas dentro de concentraciones iniciales

2.5		3.25		5.0		6.25		7.0	
sistema	valor medio (x 10 ⁻³)								
amortiguador	1.088 a	amortiguador	1.321 a	amortiguador	1.553 a	amortiguador	2.293 a	amortiguador	2.783 a
amortiguador + proteínas	0.144 b	amortiguador + proteínas	0.166 b	amortiguador + proteínas	0.168 b	amortiguador + proteínas	0.163 b	amortiguador + proteínas	0.149 b
aceite	0.0152 c	aceite	0.028 c	aceite	0.034 c	aceite	0.045 c	aceite	0.061 c
emulsión modelo	0.0149 c	emulsión modelo	0.018 c	emulsión modelo	0.010 c	emulsión modelo	0.0247 c	emulsión modelo	0.032 c

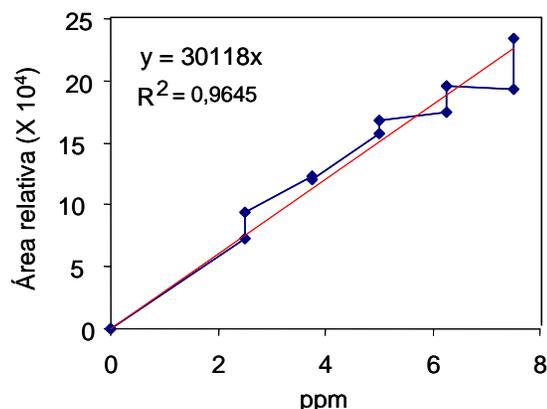
* diferentes letras en una columna indican diferencias significativas ($\alpha = 0.05$)

Anexo XIX. Curvas de patrón para volátiles extraídos con solventes

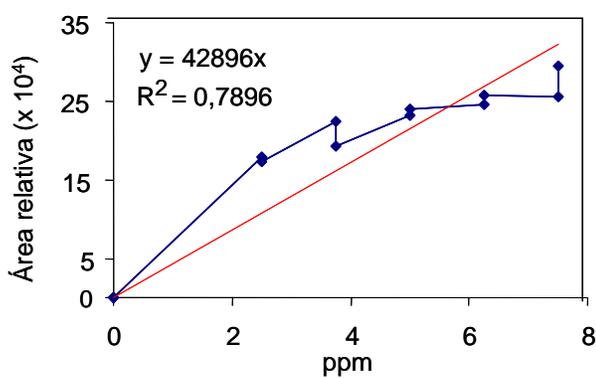
Fase dispersa (metanol)



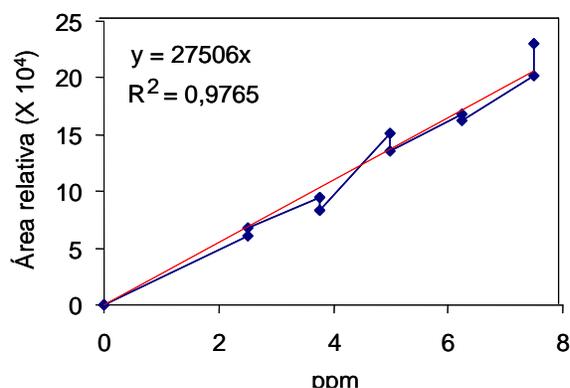
Hexanal



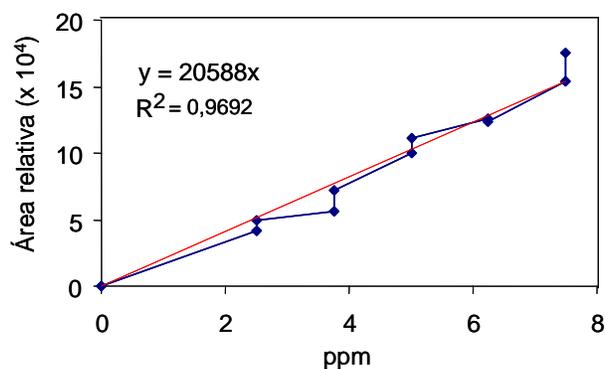
Octanal



2-metil pirazina

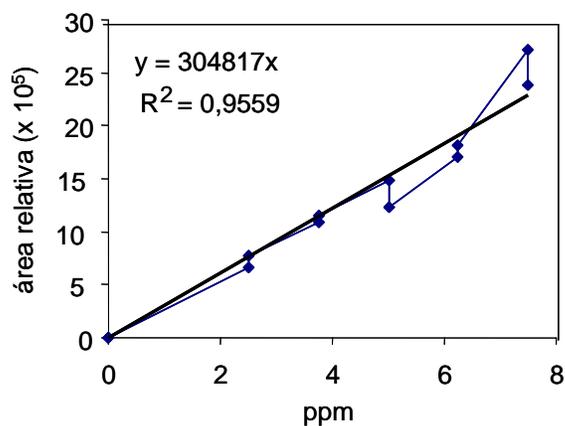


Nonanal

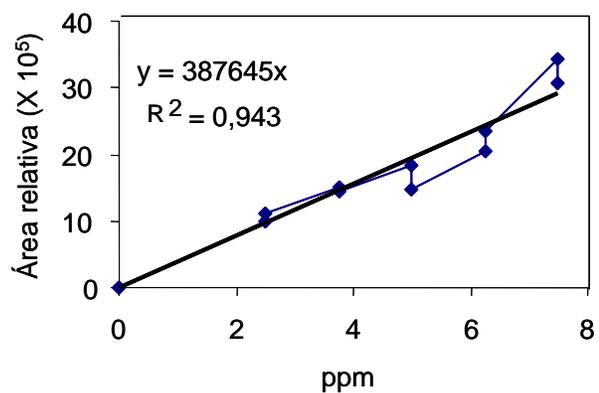


2- etil-3,6 dimetil pirazina

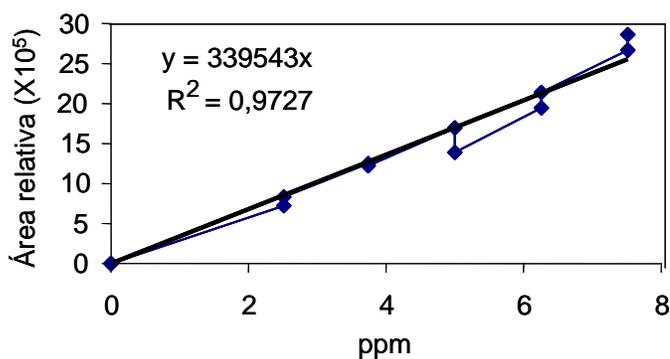
Fase continua (cloroformo)



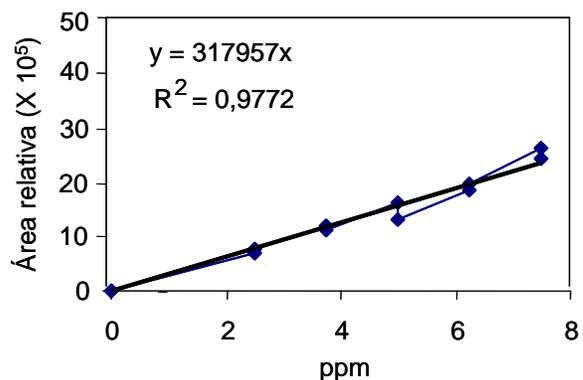
Hexanal



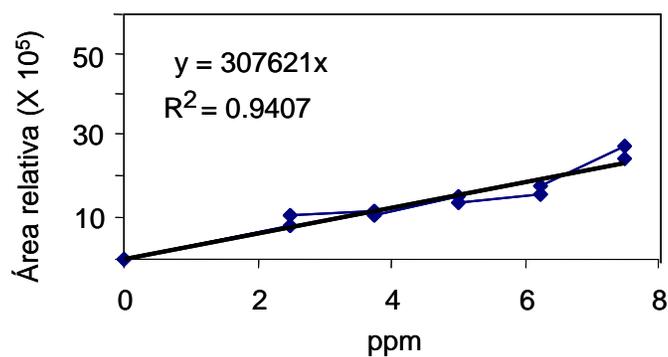
2-metil pirazina



Octanal



Nonanal



2- etil-3,6 dimetil pirazina

Anexo XX. Análisis de varianza: Índices de extracción (k_{ext}) entre solventes, compuestos y concentraciones iniciales.

R ²	Coeficiente de variación	P>	gl (error)	P>				
				solvente	compuesto	concentración inicial	solvente x concentración	compuesto x sistema
0.5775	160.340	0.0001	70	0.0001	0.0001	0.2533	0.9846	0.0048

Anexo XXI. Comparación múltiple de medias de Duncan: Índices de extracción (k_{ext}) entre compuestos, sistemas y concentraciones

Solventes		Compuestos		Concentración inicial	
Valor medio		Valor medio		Valor medio	
metanol	0.385 a	Octanal	0.637 a	2.5	0.389 a
cloroformo	0.080 b	1-etil-3,5-dimetil pirazina	0.280 b	3.75	0.254 a
		Hexanal	0.103 b	5.0	0.215 a
		Nonanal	0.073 b	7.5	0.165 a
		2-metil pirazina	0.071 b	6.25	0.141 a

* diferentes letras en una columna indican diferencias significativas ($\alpha = 0.05$)

Anexo XXII. Análisis de varianza: Índices de extracción (k_{ext}) entre solventes y concentraciones dentro de compuestos

Compuesto	R ²	Coeficiente de variación	P>	gl (error)	P>		
					solvente	concentración	solvente x Concentración
1-etil-3,5-dimetil pirazina	0.998	6.168	0.0001	10	0.0001	0.0001	0.0001
2-metil pirazina	0.996	12.343	0.0001	10	0.0001	0.0001	0.0001
hexanal	0.636	121.238	0.1567	10	0.0150	0.5047	0.3196
nonanal	0.969	17.759	0.0001	10	0.1555	0.0001	0.0001
octanal	0.979	27.962	0.0001	10	0.0001	0.0001	0.0001

Anexo XXIII. Comparación múltiple de medias de Duncan: Índices de extracción (k_{ext}) entre solventes dentro de compuestos

1-etil-3,5-dimetil pirazina		2-metil pirazina		hexanal		nonanal		octanal	
solvente	valor medio	solvente	valor medio	solvente	valor medio	solvente	valor medio	solvente	valor medio
Metanol	0.480 a	cloroformo	0.109 a	metanol	0.185 a	cloroformo	0.077 a	metanol	1.161 a
Cloroformo	0.081 b	metanol	0.034 b	cloroformo	0.021 b	metanol	0.068 b	cloroformo	0.114 b

* diferentes letras en una columna indican diferencias significativas ($\alpha = 0.05$)

Anexo XXIV. Comparación múltiple de medias de Duncan: Índices de extracción (k_{ext}) entre concentraciones iniciales dentro de compuestos

1-etil-3,5-dimetil pirazina		2-metil pirazina		hexanal		nonanal		Octanal	
concentración inicial	valor medio	concentración inicial	valor medio	concentración inicial	valor medio	concentración inicial	valor medio	concentración inicial	valor medio
6.25	0.496 a	2.5	0.202 a	7.5	0.191 a	2.5	0.119 a	2.5	1.442 a
7.5	0.491 a	3.75	0.061 b	3.75	0.124 a	3.75	0.080 b	3.75	0.891 b
5.0	0.161 b	5.0	0.034 c	5.0	0.102 a	6.25	0.069 b,c	5.0	0.725 b
2.5	0.14 b,c	6.25	0.033 c	6.25	0.052 a	7.5	0.051 c,d	7.5	0.064 c
3.75	0.114 c	7.5	0.028 c	2.5	0.046 a	5.0	0.044 d	6.25	0.056 c

* diferentes letras en una columna indican diferencias significativas ($\alpha = 0.05$)

Anexo XXV. Análisis de varianza: Índices de extracción (k_{ext}) entre solventes y compuestos dentro concentraciones iniciales

concentración inicial	R^2	Coeficiente de variación	P>	gl (error)	P>	
					solvente	compuesto
2.5	0.530	11.692	0.041	14	0.231	0.003
3.75	0.559	15.314	0.027	14	0.307	0.009
5.0	0.685	11.275	0.003	14	0.005	0.005
6.25	0.630	14.593	0.021	14	0.002	0.005
7.5	0.569	14.198	0.024	14	0.006	0.007

Anexo XXVI. Comparación múltiple de medias de Duncan: Índices de extracción (k_{ext}) entre solventes dentro de concentraciones iniciales

2.5		3.75		5.0		6.25		7.5	
solvente	valor medio								
metanol	0.565 a	metanol	0.434 a	metanol	0.358 a	cloroformo	0.301 a	metanol	0.311 a
cloroformo	0.214 a	cloroformo	0.073 a	cloroformo	0.072 b	metanol	0.022 b	cloroformo	0.019 b

* diferentes letras en una columna indican diferencias significativas ($\alpha = 0.05$)

Anexo XXVII. Comparación múltiple de medias de Duncan: Índices de extracción (k_{ext}) entre compuestos dentro de concentraciones iniciales

2.5		3.75		5.0		6.25		7.5	
compuesto	valor medio								
octanal	1.442 a	octanal	0.891 a	octanal	0.735 a	1-etil-3,5-dimetil pirazina	0.496 a	1-etil-3,5-dimetil pirazina	0.491 a
2-metil pirazina	0.202 b	hexanal	0.124 b	1-etil-3,5-dimetil pirazina	0.161 b	nonanal	0.069 b	Hexanal	0.191 a,b
1-etil-3,5-dimetil pirazina	0.139 b	1-etil-3,5-dimetil pirazina	0.114 b	hexanal	0.102 b	Octanal	0.055 b	Octanal	0.064 b
nonanal	0.119 b	nonanal	0.080 b	nonanal	0.044 b	2-metil pirazina	0.033 b	Nonanal	0.051 b
hexanal	0.046 b	2-metil pirazina	0.060 b	2-metil pirazina	0.034 b	hexanal	0.009 b	2-metil pirazina	0.028 b

* diferentes letras en una columna indican diferencias significativas ($\alpha = 0.05$)

PRODUCTIVIDAD DURANTE EL DESARROLLO DE LA TESIS

Participación en congresos

1. Herrera, M., Escalona, H., Ponce, E., Guerrero, I. 2004. Formulation and characterization of a model meat emulsion to study protein contribution to aroma. Institute of Food Technologists Annual Meeting. Las Vegas, 12-16 de Julio.
2. Herrera, M., Escalona, H., Ponce, E., Guerrero, I. 2005. Contribution of five indicator aldehydes and pyrazines to meat aroma in a model system. Institute of Food Technologists Annual Meeting. Nueva Orleans, 15 a 21 de Julio.
3. Herrera, M., Ponce, E., Escalona, H., Guerrero, I. 2005. Determinación de índices de volatilidad de compuestos relacionados con el aroma cárnico en un sistema modelo. XXVI Encuentro Nacional de la Academia de Investigación y Docencia en Ingeniería Química. Acapulco, 3 a 6 de Mayo.
4. Herrera, M., Ponce, E., Escalona, H., Guerrero, I. 2005. Determinación de índices de volatilidad de compuestos relacionados con el aroma cárnico en sistemas modelo. V Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos. Puerto Vallarta, Jal. 4 a 7 de Septiembre.
5. Herrera-Jiménez M., Escalona-Buendía, H., Ponce Alquicira E., Verde-Calvo, R., Guerrero-Legarreta, I. 2006. Use of a solid phase microextraction technique to analyze volatility of five odor-related compounds in a meat emulsion. Institute of Food Technologists Annual Meeting. Orlando, 24 a 28 de Junio.
6. Hererra, M., Guerrero, I. 2006. Determination of flavor-related compounds volatility index in a model meat emulsion system. Food Science and Food Biotechnology in Developing Countries., Saltillo, Coahuila, 15-18 de Octubre

Memorias en extenso

Herrera, M., Ponce, E., Escalona, H., Guerrero, I. 2005. Determinación de índices de volatilidad de compuestos relacionados con el aroma cárnico en un sistema modelo. XXVI Encuentro Nacional de la Academia de Investigación y Docencia en Ingeniería Química. Acapulco, 3 a 6 de Mayo.

Artículo de investigación en prensa

Herrera-Jiménez, M., Escalona Buendía, H., Ponce Alquicira, E., Verde-Calvo, R., Guerrero Legarreta, I. Formulation and characterization of a model meat emulsion to study disperse and continuous phase contribution to aroma. International Journal of Food Properties.

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN
(International Journal of Food Properties)

RELEASE OF FIVE INDICATOR VOLATILES FROM A MODEL MEAT EMULSION TO STUDY PHASE CONTRIBUTION TO MEAT AROMA

Marisol Herrera-Jiménez¹, H. Escalona Bunedía², Edith Ponce Alquicira¹, R. Verde-Calvo¹, Isabel Guerrero Legarreta^{1*}

¹ Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Apartado Postal 55-535, Mexico D.F., C.P. 09340, Mexico,

² Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., Av. Normalistas 800, Colinas de la Normal, C.P. 44270, Guadalajara, Jalisco, Mexico.

*corresponding author

Dr. Isabel Guerrero-Legarreta

Departamento de Biotecnología

Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa

Apartado Postal 55-535, Mexico D.F., C.P. 09340, Mexico

Tel. (52)(55) 5804 47 17

Fax: (52)(55) 5804 4712

e-mail: isabel_guerrero_legarreta@yahoo.com

Short title: Volatile release from a model meat emulsion

ABSTRACT

The objective of this work was to develop a model meat emulsion in order to study the release of aroma-related compounds from the lipid and aqueous phases. Hexanal, octanal and nonanal were taken as indicators of lipid oxidation whereas 1-ethyl-3,5-dimethyl pyrazine and 2-methyl pyrazine were Maillard reaction indicators. Four systems were studied: I) a model meat emulsion; II) phosphate buffer; III) phosphate buffer+myofibrillar proteins; IV) canola oil. Release of indicator compounds from each of the studied systems was analyzed in the headspace. It was concluded that

pyrazines mainly contributed to aroma in lipid systems and in protein solutions, but not in emulsions and non protein aqueous systems. Hexanal, octanal and nonanal were minor aroma contributors in lipid media, whereas hexanal and nonanal were released in small amount from protein emulsions. Conversely, octanal can be considered of an important aroma contributor in emulsions; the three aldehydes showed a high release from aqueous systems, with and without protein.

Key words: volatiles, meat aroma, meat emulsion, aldehydes, pyrazines, myofibrillar proteins

INTRODUCTION

Meat aroma comprises a wide variety of chemical compounds. It is the result of a number of factors such as substrate composition, pH, water activity, processing and storage conditions, and gas atmosphere, among others. It has been reported as composed of approximately 700 chemical compounds, generated in the fat and lean meat (1). However, concentration and type of meat aroma compounds varies with species, breed, premortem handling and processing, among other factors. Although type and concentration of volatiles present in meats result from diverse conditions and characteristics, aldehydes such as hexanal, octanal, and nonanal (2, 3) and pyrazines (4) are indicators of meat aroma. Contribution of chemical compounds to meat aroma depends on their release from the food matrix which, in turn, depends on ion strength, temperature, presence and concentration of other compounds, and hydrophobicity. Proteins particularly affect aroma perception due to interactions with aroma-related compounds (5). Lipids greatly influence flavor through their effect on perception (mouth feel, taste and aroma), flavor generation and stability (6), whereas carbohydrates tend to increase retention in the matrix (7). Food structure is also associated to release of aroma compounds. In a two-phase system such as a protein emulsion, the concentration of these compounds in the lipid and aqueous phases, as well as the interface results in specific contributions due to diffusion to the gas phase (8).

The objective of this work was to develop a model meat emulsion in order to study the contribution of oil (disperse) and aqueous (continuous) phase to meat aroma by comparing the volatility of five compounds taken as indicators: three aldehydes (hexanal, octanal and nonanal) and two pyrazines (1-ethyl-3,5-dimethyl pyrazine and 2-methyl pyrazine).

MATERIALS AND METHODS

Raw material

Pork was obtained from five animals 24 hours after slaughtering in a certified local abattoir; no antemortem handling was recorded. *Longissimus dorsi* muscles were excised and taken to our laboratory in a portable cooler at 6 to 8°C within 20 minutes. The meat was cut into 2 cm³ cubes, vacuum packed in 100 g portions using a Multivac D-8941 (Koch, Kansas City, OK) at -700 mBar, and stored at -20°C until used.

Meat pH was measured in 10 g meat homogenized with 90 mL distilled water for 1 min; the slurry was filtered and pH measured in the filtrate with a potentiometer (Beckman, Fullerton, CA).

Myofibrillar protein extraction

Meat proteins were extracted according to the method reported by Ngapo *et al.* (9). Homogenized samples in water and ice (1:1:1) were stirred for 10 min in an ice bath, the connective tissue was separated by filtration through a cheese cloth; 100 mL cold water (approximately 6°C) was mixed and stirring continued for 15 min. The homogenized mixture was centrifuged at 4,000 xg for 30 min, 4°C; the supernatant was discarded and the precipitate resuspended in 0.6 M NaCl, 50 mM phosphate

buffer, pH 7. Protein concentration (9.112 mg_{protein}/mL) was analyzed by the method described by Peterson (10).

Protein extract characterization

Molecular weight of proteins in the meat extracts was carried out by SDS-PAGE, according to the method described by García *et al.* (11), in 12% polyacrylamide separation gels and 4% stacking gels using a Mini-Protean II slab cell (Bio-Rad, Richmond CA); 5 mg protein extract/mL and buffer solution (10% SDS+5% mercaptoethanol+0.05% bromophenol blue+10% glycerol+0.125% 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8) (1:30) was heated at 97°C for 3 min. Fifteen microliters protein samples and molecular weight markers (205 kDa myosin, 116 kDa β -galactosidase; 97.4 kDa phosphorilase b; 66 kDa bovine serum albumin; 45 kDa egg albumin) (Sigma C3312) were applied to the gels. The analysis was carried out at 200 V constant voltage and 4 \pm 1°C. The gels were stained with 0.1% Coomassie R-250+40% methanol+10% acetic acid for 30 min, destained in 40% methanol+10% acetic acid, and scanned in a Gel-Doc 2000 (Bio-Rad) fitted with a Quantity One™ software, version 4 (Bio-Rad).

Emulsion formulation and characterization

Emulsion formulation was attempted using excised pork fat, extracted with organic solvents and finally evaporating the solvent to obtain pure semisolid fat. However, due to the extremely low yield, it was decided to use canola oil as the lipid phase. Although canola oil is rich in oleic and linoleic acids (63 and 20%, respectively), whereas pork fat contain high amount of oleic and palmitic acids (47 and 25%, respectively), it was assumed that, being linoleic acid the most abundant in both lipids, oxidation reaction could proceed in a similar manner.

Preliminary tests on emulsion formulation were carried out using 5 to 25% canola oil and 15 to 25% protein extract in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.5. Emulsions of 20 to 25% protein extract + 25% canola oil were stable after 24 h at room temperature. In

subsequent experiments, emulsion formation was carried adding canola oil at 1 mL/min up to 25% final concentration to phosphate buffer with protein extract (20, 25, 30 and 35%) and dextrose, homogenizing in an ESGC homogenizer (Mettlen, Switzerland) at 13,000 rpm for 3 min at room temperature (approximately 18°C), the final protein concentration in the emulsion was analyzed by the method reported by Redinbaugh and Turley (12). Five percent dextrose was added to imitate a commercial meat emulsion formulation, as well as to promote Maillard reactions.

Emulsion capacity was analyzed according to the method reported by Swift *et al.* (13) based on electric resistivity. An acrylic cylinder (32 mm diameter, 100 mm high), one end closed, was fitted with two copper wires passing through holes drilled 1 cm from the closed end and attached to a digital voltmeter (Tektronics CDM 250, Tektronics, Beaverton, OR). The protein extract was placed in the cylinder and canola oil added with continuous stirring (13,000 rpm). Emulsifying capacity was reported as milliliters of added oil per mg protein at the point where resistivity was interrupted, and related to g protein.

Particle size and size distribution were analyzed in a Malvern Mastersizer equipment, Series 2600 (Malvern Instruments, Malvern, England) applying a log normal model (14).

Apparent viscosity (η_{app}) was analyzed with a Brookfield LVDV-1 viscometer (Brookfield Engineering Laboratory, Middleboro, MA) at 0.6 rpm deformation rate, and calculated considering the torque in the linear region between 20 and 60% (15).

Emulsion disruption

The emulsion was disrupted with a Branson ultrasound bath (Danbury, CT) at 25 Hz for 2 h; phase separation was observed in a light microscope Olympus B201 (Melville, NY) at 200x magnification, fitted to a 35 mm photographic camera (Olympus model

SC35). The disrupted emulsion was centrifuged at 4,000 xg for 30 min at 3°C to separate the continuous and disperse phases (14).

Density and fraction volume analysis

Emulsion density before disruption, and density of the disperse and continuous phases after emulsion disruption were analyzed according to the method described by MacClemens (14) and related to disperse phase fraction volume of the following equation:

$$\Phi_{dp} = \rho_e - \rho_1 / \rho_2 - \rho_1$$

where:

Φ_{dp} – disperse phase fraction volume

ρ_e – emulsion density

ρ_1 – continuous phase density

ρ_2 – disperse phase density

Protein analysis in the continuous and disperse phases

Volatile analysis

From preliminary emulsion tests it was concluded that the most stable formulation was: continuous phase: 35% myofibrillar protein extract, 0.1 M phosphate buffer and 0.01% sucrose, pH 7.5, $\Gamma = 0.6$; disperse phase: canola oil. Three aldehydes (hexanal, octanal and nonanal, 98% purity, Sigma) and two pyrazines (1-ethyl-3,5-dimethyl pyrazine and 2-methyl pyrazine, 96% purity, Sigma) were used as aroma-release indicator compounds. They were added at 0, 2.0, 3.25, 5.0, 5.25 and 7.5 ppm to the following systems: I) canola oil; II) phosphate buffer; III) phosphate buffer+35% protein extract; IV) model meat emulsion. Each one of the four systems were placed in 10 mL vials and left standing for 1.5 h at room temperature (around 20°C) to release added volatiles. The five indicator compounds were collected using solid

phase microextraction (SPME) technique by static headspace analysis (16). They were adsorbed in PDMS/DVB fibers (Supleco, Bellefonte, PA) exposed 5 min in the headspace at 20°C. Volatile desorption was carried out placing the fiber in a GC-FID injector for 5 min at 200°C. Gas chromatography (Shimadzu GC-21010 equipment, Kyoto, Japan), was carried out at 31.69 psi, 4.1 mL N₂/min total flow as carrier gas; 40°C oven initial temperature, 4 min ramp, 200°C final temperature; the equipment was attached with a HP-Wax-59 m column, 0.2 μm ID. Indicator compound concentration in the headspace, released from each system was compared to pure compounds; volatile release was calculated by the following equation (17):

$$K_{rel} = C_v/C_L$$

where:

K_{rel} – release index

C_v – concentration of pure compound added to the system

C_L – concentration of released compound from the system

Experimental design and data analysis

Emulsion formulation: Two experimental designs were studied to obtain the most stable emulsion formulation: a) Fixed variables: pH 7.5, 25% canola oil, $\Gamma = 0.1$; source of variation: protein extract concentration (20, 25, 30, 35%; 1.822, 2.278, 2.733 and 3.189 mg_{prot}/mL, respectively); b) Fixed variables: 25% canola oil, $\Gamma = 0.1$, 35% protein extract (3.189 mg_{prot}/mL); source of variation: pH (4.5, 5.5, 6.5, 7.5). The response variables for both designs were emulsion capacity and particle size.

Volatile analysis: Samples were assigned to a completely randomized design; the sources of variation were: indicator compounds concentration (2.5, 3.25, 5.0, 6.25, and 7.5 ppm) and studied system (canola oil, phosphate buffer, phosphate buffer+protein extract, and model meat emulsion); the response variable was the release index.

Data were subjected to analysis of variance by ANOVA procedure and Duncan Multiple Range tests using a SAS program (18). All analysis were carried out at $\alpha = 0.05$, in triplicate

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of the emulsion system

Data analysis of the two preliminary emulsion systems (pH as fixed variable, four protein extract concentration levels; protein extract concentration as fixed variable, four pH levels) gave the results reported in Table 1. As expected, emulsifying capacity increased with protein concentration (from 8.89 to 11.74 mL_{oil}/g_{protein}) (Table 1); significant difference ($P < 0.001$) was observed from 30 to 35% protein extract; it also increased with pH (6.32 to 8.581 mL_{oil}/g_{protein} at pH 4.5 and 7.5, respectively). Although myofibrillar protein isoelectric point is around 5.5, where emulsifying capacity was expected to be at a minimum, pH 4.5 and 5.5 showed non significant difference ($P > 0.01$) with respect to emulsifying capacity at fixed protein concentration; conversely pH 6.5 and 7.5 significantly increase ($P < 0.001$) oil emulsification.

The emulsification process denatured proteins in a certain degree, increasing the emulsifying capacity. As reported by Fischer and Widder (5), partial denaturation in an aqueous medium changes the protein tridimensional configuration, exposing reactive sites, either hydrophilic or dipole-dipole interaction promoters, and increasing its ability to form interfaces. Partial protein degradation, observed by MW peaks lower than 66 kDa (Figure 1) account for an increase in emulsifying capacity. Homogenization also had a profound effect on protein configuration, promoting partial degradation, but also contributing to the emulsifying capacity (Table 1).

The model emulsion showed a monodisperse particle size distribution that significantly decrease ($P < 0.001$) with increasing pH and protein extract concentration (Table 1). Having similar particle distribution and being in the same medium ionic

strength, differences in emulsion viscosity were due to particle shape and charge (8). Due myofibrillar proteins high molecular weight, they behave as particles in suspension (19), therefore the system stability depends on colloidal factors such as ionic strength and particle shape, surface charge and distribution (20). Viscosity of 35% protein extract system considerably increased with increasing pH, although values were consistently lower than those when protein concentration varied (fixed pH 7.5). A non significant decrease ($P>0.01$) in η_{app} (93.1 to 62.1 poise) was observed at pH 5.5 and 4.5, respectively, meaning that no net surface charge was generated. Conversely, pH increase to 6.5 resulted in net reduction of positive charges and reduced average particle size to $D_{3,2} = 5.5 \mu\text{m}$, while η_{app} increased to 112.5 poise. This fact was more noticeable when pH was increased from 6.5 to 7.5; at this point η_{app} significantly increased ($P<0.001$) to 212 poise, and $D_{3,2}$ significant decreased ($P<0.001$) to $3.4 \mu\text{m}$.

Effect of myofibrillar proteins

Increasing protein concentration from 20 to 35% significantly reduced ($P<0.001$) average particle size and η_{app} ($P<0.001$) due to partial protein degradation, as observed in SDS-PAGE of the protein extract (Figure 1). Emulsifying capacity was significantly different ($P<0.001$) only at 35% protein extract concentration ($3.189 \text{ mg}_{\text{protein}}/\text{mL}$); more protein was available to emulsify fixed oil amounts. Fraction volume of the disperse phase significantly increased ($P<0.001$) with increasing pH and protein extract concentration, although a more noticeable increase was observed with increasing protein concentration at fixed pH 7.5, due to more availability of emulsifier in the system. The effect of increasing fraction volume was also observed in increasing η_{app} and decreasing average particle size (Table 1). Due that protein is adsorbed at the emulsion interface by electrostatic interactions between charged aminoacid residues and polar heads of the lipid (21) volatile binding to protein increased with protein concentration at the interface. When protein covers most of the interface, volatile release decreases; however, at low protein concentrations no effect is observed due to poor coverage of proteins at the fat globule surface (20).

Myosin (>200 kDa) (a), small peaks of 120 to 100 kDa (b); 100 to 80 kDa (c) and 80 to 65 kDa (d), corresponding to intermediate (around 100 to 75 kDa) or regulatory proteins (80 to 60 kDa); and 60 to 50 kDa (e) and < 45 kDa (f), related to degradation products, were observed in the extract (Figure 1). As expected, proteins were more abundant in the continuous (buffer) than in the disperse (oily) phase due to their high solubility in medium ionic strength solutions such as phosphate buffer. However, myosin was present in similar amounts in the continuous and disperse phases; this protein adsorbed to the oil/water interface, and partially solubilized in the aqueous phase. Myosin, actin and actomyosin has been reported as the main responsible of functional properties of muscle systems (19).

Smaller proteins of 100-80 kDa (c) and 80 to 65 kDa (d) were evident in disperse phase, probably bound to the interface. Myofibrillar proteins partitioned between the interface and the continuous phase; however, protein-volatile interaction varied depending on the solubility of aroma compounds in each phase. High protein concentration in the emulsion favors protein-protein concentration (22); protein unfolding at the interface allows interactions between non polar groups of the protein and lipids (21). On the other hand, lipid and aroma compound compete to protein binding at the interface (18). In our study, myosin possibly unfold, liberating other associated proteins of the troponin-tropomyosin complex, partially accounting for the 45 kDa peak, and interacting with aroma compounds; binding reduces volatile liberation to the headspace, making them less available to nose and mouth receptors, as observed in volatile release index from the model emulsion for 2-methyl pyrazine (Fig. 2), 1-ethyl-3,5-dimethyl pyrazine (Fig. 3), hexanal (Fig. 4) and nonanal (Fig. 5), but not for octanal (Fig. 6).

Volatile release

Differences were observed in pyrazines release indexes with respect to the studied systems, significantly higher ($P < 0.001$) in oil and buffer+protein. In these two

systems, pyrazines release index decreased with volatile concentration, although a significant difference ($P < 0.001$) was observed for 1-ethyl-3,5-dimethyl pyrazine. High release from oil was due to no interaction with the non polar media. Non-protein buffer and emulsion systems showed significantly lower ($P < 0.001$) release indexes; non significant differences ($P > 0.01$) were observed for both pyrazine release indexes with respect to volatile concentration.

Protein solutions, as buffer+protein systems, are one-phase systems; protein solubility was promoted by ionic strength of the aqueous medium, therefore the tridimensional arrangement varied exposing hydrophilic groups which were solvated by water molecules (2). In this situation, methyl and ethyl radicals cannot easily interact with proteins; therefore pyrazines were released to the headspace. Pyrazine volatility decrease in buffer+protein due to interactions with amino or hydroxyl groups (17); non significant differences ($P > 0.01$) were observed between 1-ethyl-3,5-dimethyl pyrazine and 2-methyl pyrazine release from emulsions. Conversely, release of 1-ethyl-3,5-dimethyl pyrazines was significantly higher ($P < 0.001$) than 2-methyl pyrazine in buffer+protein due to a stronger net hydrophobic interaction between the methyl radical and peptide chains (23). Hydrophobic interactions also accounted for low release from non protein buffer, although non significant differences ($P > 0.01$) were observed between the non protein buffer and the emulsion for both pyrazines.

Release of hexanal and nonanal from oil and emulsion systems showed non-significantly difference ($P > 0.01$) with respect to volatile concentration (Figures 4 and 5). Hexanal and nonanal indexes significantly decreased ($P < 0.001$) as volatile concentration increased in buffer+protein, and hexanal indexes from buffer. No significant differences ($P > 0.01$) were observed in nonanal release from non protein buffer with respect to volatile concentration. The lowest release indexes for hexanal and nonanal occurred in the emulsion and oil systems ($P > 0.01$). Hexanal release indexes, although following similar trends as nonanal in oil, buffer+protein and emulsion systems, were significantly higher ($P < 0.001$). In a two-phase system, such as a protein emulsion, hexanal and nonanal interact at the interface with unfolded

proteins through mechanisms of hydrophobic nature, and cannot easily diffuse through the continuous phase (17). In addition, the shorter the aliphatic chain the higher the solubility as a result of its lower hydrophobicity (24). The decrease in hexanal release with increasing volatile concentration in buffer, with and without proteins, was due to its relative solubility in water (21); the concentration of solubilized hexanal increased with increased added volatile to the system. O'Neill and Kinsella (25) reported a decrease in aldehydes volatility in the presence of proteins, this type of interaction mainly depends on carbonyl radicals reacting with amine or hydroxyl groups. Fischer and Widder (5) also reported that esters show a slight but continuous volatility decrease with increasing protein content in protein solutions.

Octanal showed different release trends as compared to the other studied aldehydes. Conversely as pyrazines, hexanal and nonanal, octanal was not retained by emulsions; release indexes were significantly higher ($P < 0.001$) from emulsions as compared to oil (Fig. 6). Octanal release showed no significant differences ($P > 0.01$) with respect to volatile concentration in all the studied systems. However, in the same way as observed for hexanal and nonanal, the highest release indexes were observed in buffer with and without protein; release of all aldehydes from the oil was significantly lower ($P < 0.001$) than from buffer and buffer+protein.

Due to protein unfolding and degradation at the emulsion interface, reactive sites were exposed; therefore, chemical interaction seems the event most likely occurring for aldehydes retention in a protein emulsion. However, hydrophobicity is also a leading retention mechanism; Schirle-Keller *et al.* (26) reported that small changes in lipid content had significant effects on vapor pressure of lipid-soluble compounds, whereas partial pressure of water-soluble compounds has little effect in the system. According to these authors, due to the non polar nature of the studied aldehydes, lipid presence in emulsion and pure oil systems considerably reduced aldehyde vapor pressure, therefore reducing the release indexes.

CONCLUSIONS

Under the experimental conditions described in this paper, pyrazines were easily released from aqueous with proteins, and from oil; low pyrazine release was observed in emulsions and non protein aqueous systems, where aroma release decreased as pyrazines concentration increased. Pyrazines, therefore, mainly contributed to aroma in lipid systems and in protein solutions. They cannot be considered as aroma contributors in emulsions due to binding to unfolded protein at the interface, and aqueous systems without protein. Hexanal, octanal and nonanal were efficiently retained in the oil system; therefore these volatiles are minor aroma contributors in lipid media. Hexanal and nonanal were also minor aroma components in meat emulsions. Conversely, octanal can be considered of an important aroma contributor in emulsions and in buffer with and without protein. In general, aldehydes showed high release indexes in aqueous systems, with or without added myofibrillar proteins. The effect of two phases (protein emulsion) or one phase (protein solution) was mainly due to hydrophobic interactions between proteins and ethyl/methyl pyrazines radicals. Release was significantly reduced for 2-methyl pyrazine, 1-ethyl-3,5-dimethyl pyrazine, hexanal and nonanal in emulsions, due to interaction with unfolded proteins at the interface; this was not observed for octanal, were release indexes were significantly higher in emulsion as compared to the other volatiles.

ACKNOWLEDGMENTS

Author Herrera Jiménez thanks the National Council of Science and Technology (CONACYT), Mexico for a graduate scholarship; and Universidad Autónoma Metropolitana for financial support during the doctoral thesis writing.

REFERENCES

1. Shahidi, F. Flavor of meat and meat products- and overview. In *Flavor of Meat and Meat Pproducts*; Shahidi, F., Ed.; Chapman and Hall: New York, 1994; 1-3.

2. Kerscher, R.; Grosch, W. Comparative Evaluation of Potent Odorants of Boiled Beef by Aroma Extract Dilution and Concentration Analysis. *Z. Lebensm. Unter. Forsch. A.* **1997**, *204*, 3-6.
3. Shahidi, F.; Pegg, R.B. Hexanal as an Indicator of Meat Flavor Deterioration. *J Food Lipids* **1993**, *1*, 177-186.
4. Mottram, D.S. The Chemistry of Meat Flavour. In *Flavour of Meat, Meat Products and Seafoods*; Shahidi, F., Ed.; Blackie Academic and Professional: London, England, 1998; 5-26.
5. Fischer, N.; Widder, S. How Proteins Influence Food Flavor. *Food Technol.* **1997**, *51* (1), 68-70.
6. De Roos, K.B. How Lipids Influence Food Flavor. *Food Technol.* **1997**, *51* (1), 60 -62.
7. Goubert, I.; Le Querré, J.L.; Voilley, A. Retention of Aroma Compounds by Carbohydrates: Influence of their Physicochemical Characteristics and on their Physical State. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 1981-1990.
8. Miettinen, S.M.; Tuorila, H.; Piironen, V.; Vehkalahti, K.; Hyvönen, L. Effect of Emulsion Characteristics on the Release of Aroma as Detected by Sensory Evaluation, Static Headspace Gas Chromatography and Electronic Nose. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 4232-4239.
9. Ngapo, T.; Wilkinson, B.; Chong, R.; Haisman, D. In *Gelation of Bovine Myofibrillar Protein Induced by 1,5-gluconolactone*. Proceedings of the 38th International Congress of Meat Science and Technology. Clermont-Ferrand France, 1992.

10. Peterson, G.L. Determination of Total Protein. *Meth. Enzym.* **1983**, *91*, 95-119.
11. García, C.F.L.; Dimes, L.E.; Haard, N.F. Substrate-gel Electrophoresis for Composition and Molecular Weight of Proteinases or Proteinaceous Proteinase Inhibitors. *Anal. Biochem.* **1993**, *214*, 65-69.
12. Redinbaugh, M.G.; Turley, R.B. Adaptation of the Bicinchoninic Acid Protein Assay for use with Microtiter Plates and Sucrose Gradient Fractions. *Anal. Biochem.* **1986**, *153*, 267-271.
13. Swift, C.E.; Lockett, C.; Fryar, A.J. Comminuted Meat Emulsions: The Capacity of Meats for Emulsifying Fats. *Food Technol.* **1961**, *15* (11), 468-471.
14. MacClemens, D.J. *Food Emulsions: Principles, Practice and Techniques*; CRC Press: Boca Raton, Florida, 1999.
15. Steffee, J.F. *Rheological Methods in Food Process Engineering*; Freeman Press: East Lansing MI, 1996; 428 pp.
16. Escalona, H.; Piggott, J.R.; Conner, J.M.; Paterson, A. Headspace Concentrations of Alcohols and Aldehydes at Different Ethanol Concentrations. *Italian J. Food Sci.* **1999**, *11*, 241-248.
17. Seuvre, A.M.; Espinoza-Díaz, M.A.; Voilley, A. Transfer Aroma Compounds Through the Lipidic-Aqueous Interface in a Complex System. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1106-1110.
18. Statistical Analysis System; *PC-SAS User's Guide*. SAS Institute, Inc.; Cary, NC, 1999.

19. Li-Chan, E.; Nakai, S.; Wood, D.F. Relationship Between Functional (Fat Binding, Emulsifying) and Physicochemical Properties of Muscle Proteins. Effects of Heating, Freezing, pH and Species. *J. Food Sci.* **1985**, *50*(4), 1034-1040.
20. Dickinson, E. Hydrocolloids at Interfaces and the Influence on the Properties of Dispersed Systems. *Food Hydrocol.* **2003**, *17*, 25-39.
21. Phillipe, E.; Seuvre, A.M.; Colas, B.; Langendorff, V.; Schippa, C.; Voilley, A. Behavior of Flavour Compounds in Model Food Systems: A Thermodynamic Study. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 1393-1398.
22. Gianelli, P.; Flores, M.; Toldrá, F. Interactions of Soluble Peptides and Proteins from Skeletal Muscle on the Release of Volatile Compounds. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 6828-6834.
23. Boudaud, N.; Dumont, J.P. Interactions Between Flavor Components and Beta-Lactoglobulin. In *Flavor-Food Interactions*; McGorin, R.J., Leland, J.V., Eds.; American Chemical Society: Washington, 1996; 90-97.
24. Langurieux, S.; Crouzet, J. Protein-Aroma interactions. In *Food and Macromolecules*; Dickinson, E.; Lorient, D.; Eds.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, England, 1995; 123-133.
25. O'Neill, T.E.; Kinsella, J.E. Binding of Alkaline Flavors to Lactoglobulin: Effects of Conformational and Chemical Modification. *J. Agric. Food Chem.* **1987**, *35*, 906-909.
26. Schirle-Keller, J.P.; Reineccius, G.A.; Hatchwell, L.C. Flavor Interactions with Fat Replacers: Effect of Oil Level. *J. Food Sci.* **1994**, *59*, 813-815.

Table 1 Emulsion mean particle diameter ($D_{3,2}$), apparent viscosity (η_{app}), emulsifying capacity (EC) and fraction volume of the disperse phase (ϕ_{dp}), varying pH and protein extract concentration.

	$D_{3,2}$ (μm)	η_{app} (poise)	EC ($\text{mL}_{oil}/\text{g}_{protein}$)	Fraction volume (ϕ_{dp})
Fixed variables: 25% canola oil, 35% protein extract, $\Gamma=0.6$				
pH				
4.5	37.65 ^a	62.1 ^a	6.329 ^a	0.2692 ^a
5.5	37.2 ^a	93.1 ^a	7.338 ^a	0.3067 ^b
6.5	5.5 ^b	112.5 ^b	8.016 ^b	0.4311 ^c
7.5	3.4 ^c	212.0 ^c	8.581 ^c	0.7713 ^d
Fixed variables: 25% canola oil, pH 7.5, $\Gamma=0.6$				
% protein extract				
20	27.1 ^a	50.5 ^a	8.89 ^a	0.0664 ^a
25	26.9 ^b	131.2 ^b	10.94 ^a	0.4419 ^b
30	2.9 ^c	157.0 ^b	11.15 ^a	0.6689 ^c
35	2.8 ^c	212.3 ^c	11.74 ^b	0.7713 ^d

^{a,b} different letters indicate significant differences ($\alpha=0.05$)

FIGURE CAPTIONS

Figure 1 SDS-PAGE densitograms of proteins in the extract, the continuous and the disperse phases

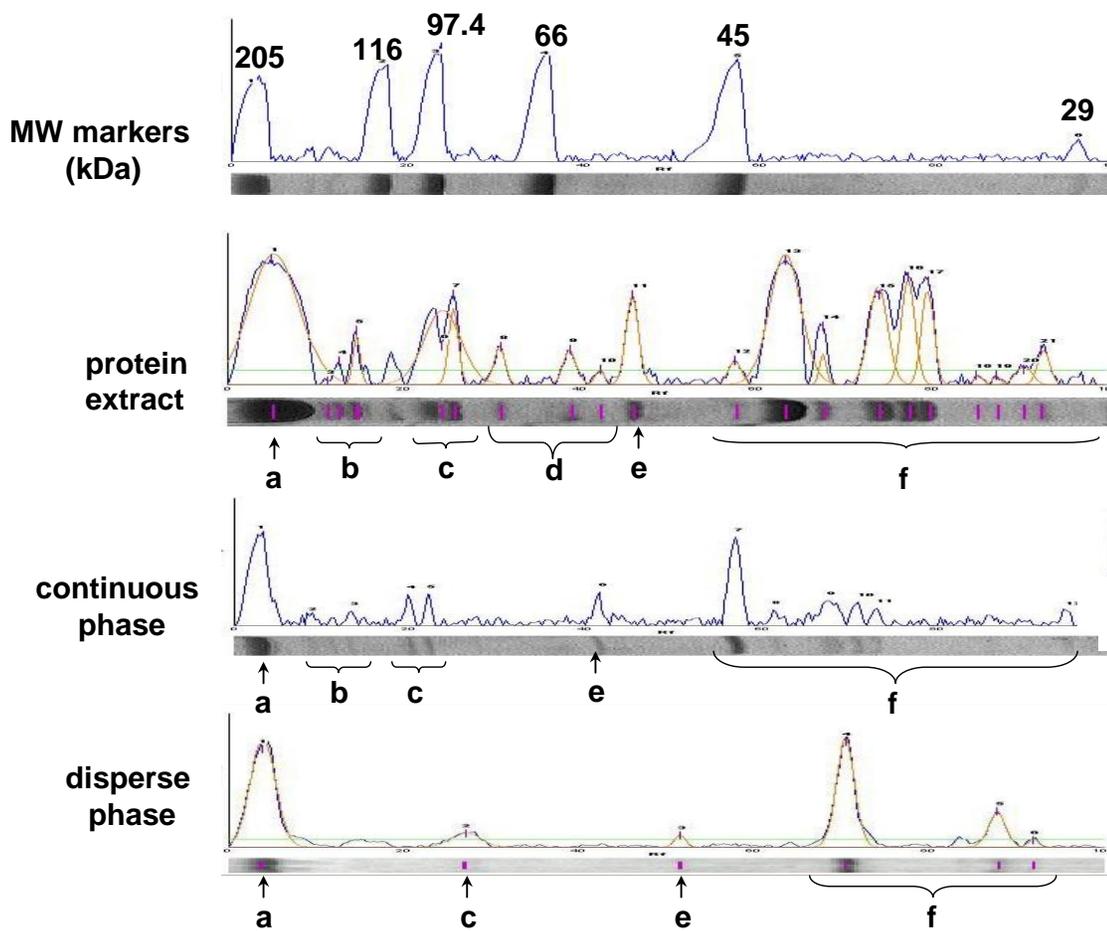
Figure 2 Volatile release index of 2-methyl pyrazine

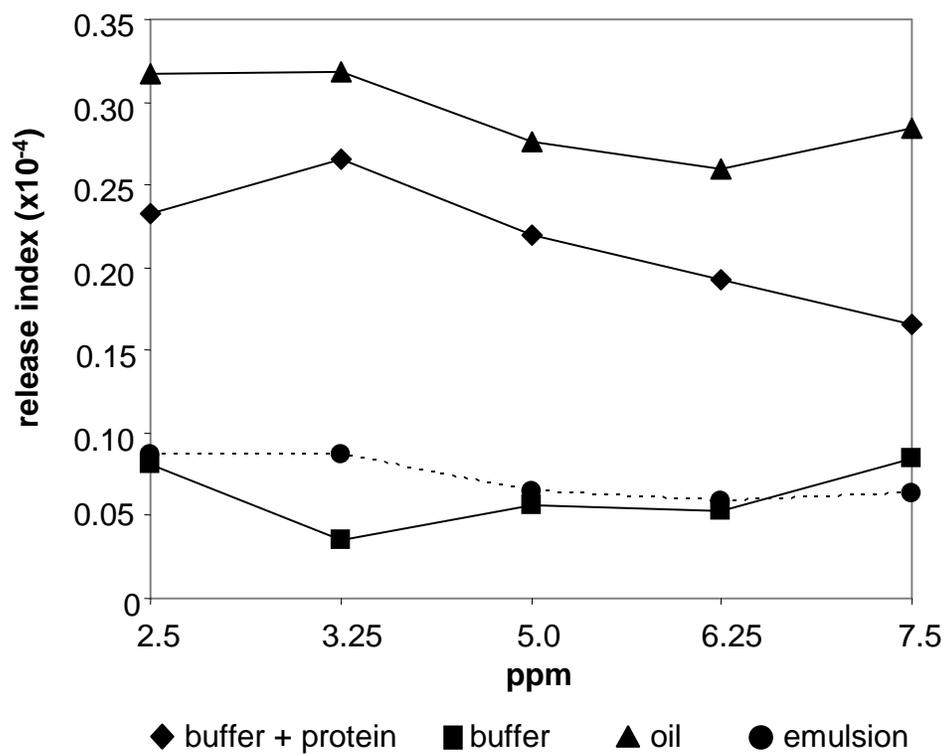
Figure 3 Volatile release index of 1-ethyl-3,5-dimethyl pyrazine

Figure 4 Volatile release index of hexanal

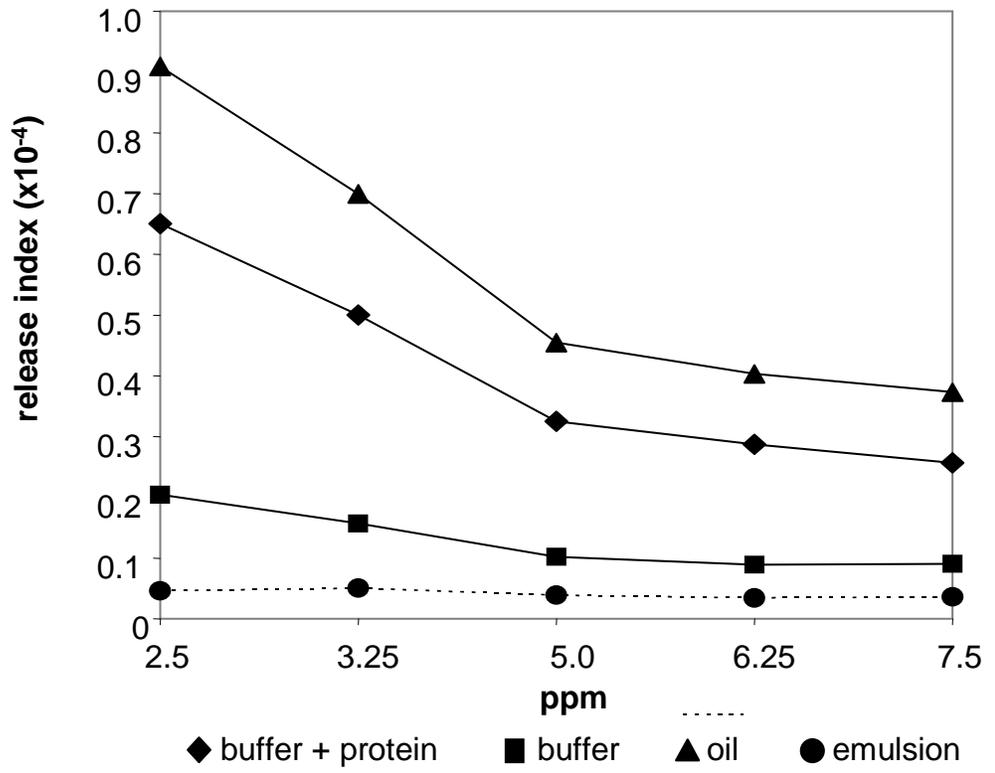
Figure 5 Volatile release index of nonanal

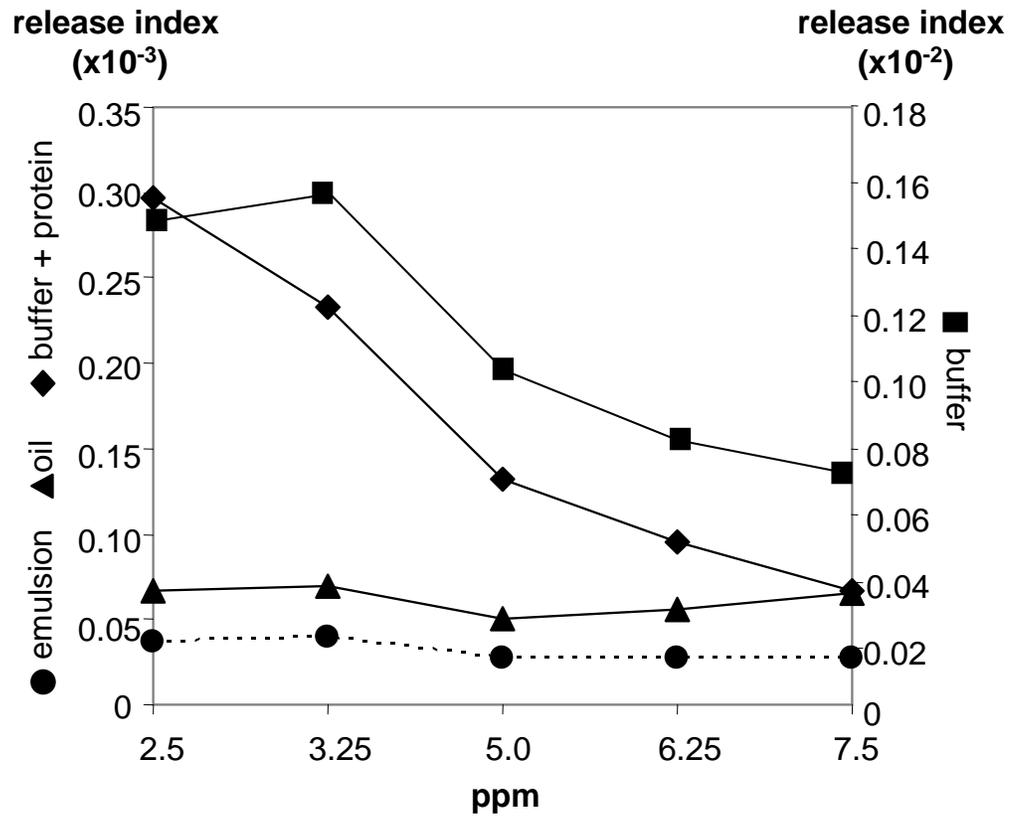
Figure 6 Volatile release index of octanal

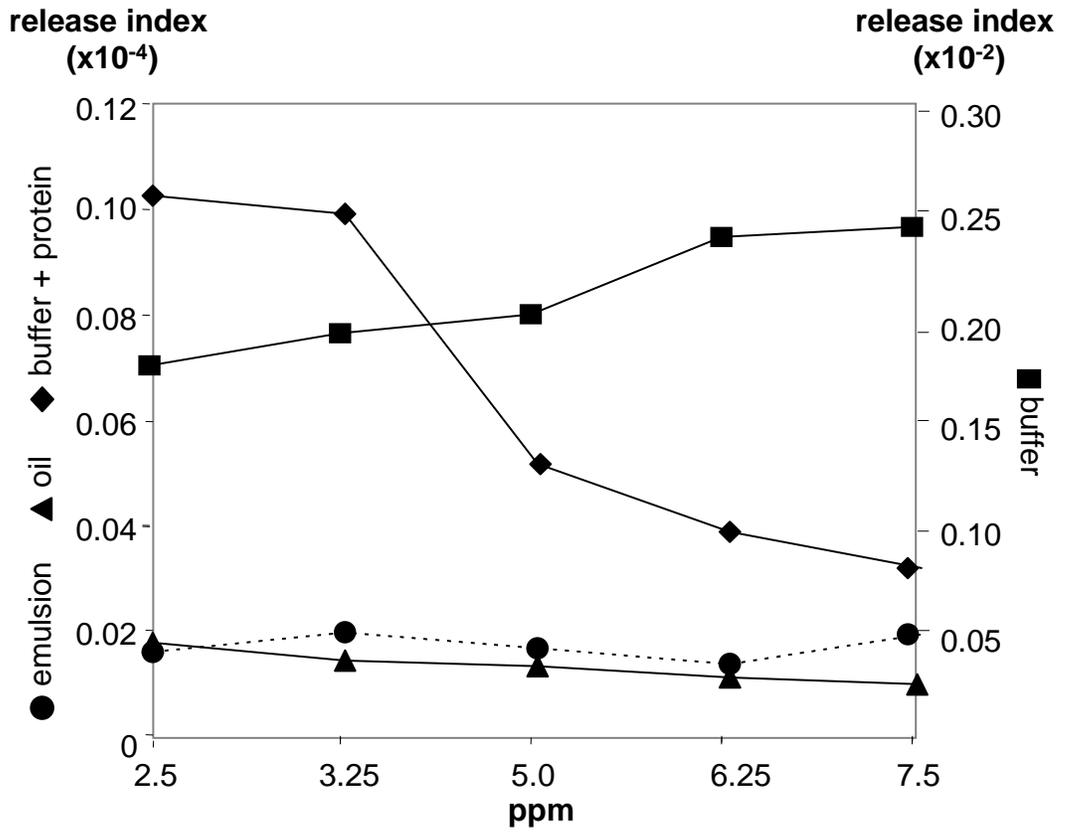


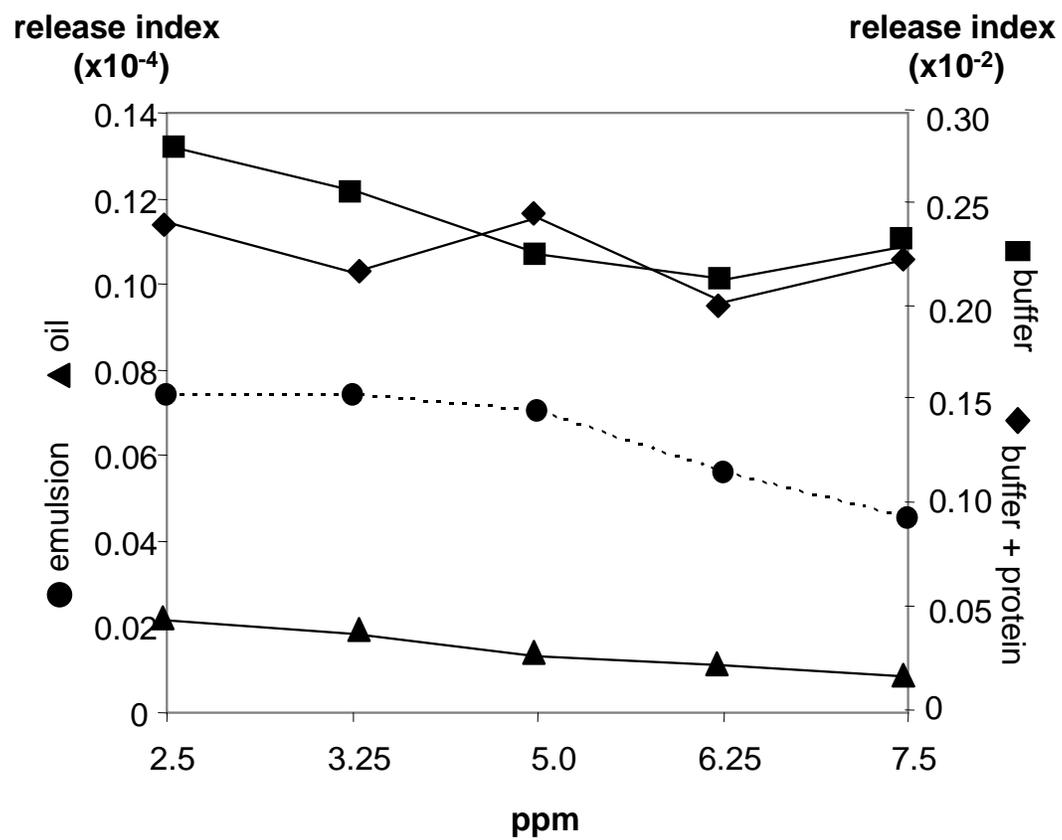


a) myosin (>200 kDa); b) 120 to 100 kDa; c) 100 to 80 kDa; (d) intermediate or regulatory proteins; e) 60 to 50 kDa; f) degradation products (<45 kDa)









Iztapalapa, D.F. 9 de julio de 2007

El Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

ESTUDIOS PRELIMINARES DE LA CONTRIBUCIÓN DE LAS FASES LIPÍDICA Y ACUOSA DE UNA EMULSIÓN CÁRNICA MODELO A LA PERCEPCIÓN DE AROMA A CARNE

que presentó

Victoria Marisol Herrera Jiménez

Comité Tutorial

Directora: Dra. Isabel Guerrero Legarreta
Departamento de Biotecnología, UAMI



Codirector: Dr. Héctor Escalona Buendía
CIATEJ, Guadalajara, Jal.

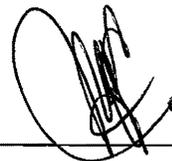


Asesora: Dra. Edith Ponce Alquicira
Departamento de Biotecnología, UAMI

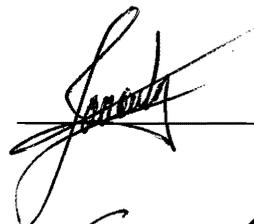


Sinodales:

Dra. María Eugenia Jaramillo
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN



Dr. Jorge Soriano Santos
Departamento de Biotecnología, UAMI



Dra. Gabriela Rodríguez Serrano
Departamento de Biotecnología, UAMI

