

**UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología  
Área de Nutrición y Bromatología**



**EFFECTOS DE VARIOS TRATAMIENTOS CULINARIOS  
SOBRE LA COMPOSICION DE LA JUDIA VERDE**

**CARLOS DE LA CRUZ GARCIA**

Santiago de Compostela, Junio de 2000

**UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología  
Área de Nutrición y Bromatología**



**EFFECTOS DE VARIOS TRATAMIENTOS CULINARIOS  
SOBRE LA COMPOSICION DE LA JUDIA VERDE**

**CARLOS DE LA CRUZ GARCIA**

Santiago de Compostela, Junio de 2000

**PILAR BERMEJO BARRERA, DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE QUIMICA ANALITICA, NUTRICION Y BROMATOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA**

**INFORMA:** Que D. Carlos de la Cruz García presenta el trabajo titulado “EFECTOS DE VARIOS TRATAMIENTOS CULINARIOS SOBRE LA COMPOSICION DE LA JUDIA VERDE” realizado bajo la dirección de la Dra. Julia López Hernández y del Dr. Jesús Simal Lozano, en el laboratorio de Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela.

Fdo. Dra. Dña. Pilar Bermejo Barrera

Santiago de Compostela, Junio de 2000.

**JULIA LOPEZ HERNANDEZ, PROFESORA TITULAR DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA Y JESUS SIMAL LOZANO, CATEDRATICO DE BROMATOLOGIA, TOXICOLOGIA Y ANALISIS QUIMICO**

**AUTORIZAN** a Carlos de la Cruz García a presentar la Tesis titulada “EFECTOS DE VARIOS TRATAMIENTOS CULINARIOS SOBRE LA COMPOSICION DE LA JUDIA VERDE” para optar al Grado de Doctor, la cual ha sido realizada bajo nuestra dirección en el laboratorio de Bromatología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que conste se expide la presente en Santiago de Compostela, en Junio de 2000.

Fdo. Dra. Dña. Julia López Hernández

Fdo. Dr. D. Jesús Simal Lozano

## AGRADECIMIENTOS

*Quisiera expresar mi sincero agradecimiento a todos aquellos que han contribuido, de una manera u otra, a la realización de esta memoria:*

*A mis directores, Dra. Julia López Hernández y Dr. Jesús Simal Lozano, por los conocimientos que de forma constante he recibido y sigo recibiendo.*

*A mis compañeras y profesores, que han mantenido un ambiente de trabajo que hemos disfrutado todos, en especial a las Dras. M<sup>a</sup> José González y M<sup>a</sup> José Oruña y a la futura Dra. Ana I. Rodríguez-Bernaldo de Quirós.*

*A mi familia, a todos los que a mi alrededor han compartido este tiempo y a los que sin saberlo, como los profesores Antonio Carpintero y Víctor Lens, me han seguido desde años.*

*A todos ellos, gracias.*





*A mis hermanos Álvaro, Elisardo y Luís.*

# INDICE GENERAL

<b>INDICE DE TABLAS Y FIGURAS</b>	ix
<b>ABREVIATURAS</b>	xii
<b>I INTRODUCCION</b>	1
I.1.- Evolución de los tratamientos	2
I.2.- Objetivo	3
I.3.- Referencias bibliográficas	6
<b>II MODIFICACIONES DE COMPONENTES VOLATILES</b>	7
II.1.- Resumen	8
II.2.- Introducción	8
II.3.- Material y Métodos	10
II.3.1.- Muestras	10
II.3.2.- Muestreo mediante Espacio de Cabeza Dinámico	10
II.3.3.- Cromatografía de Gases	10
II.3.4.- Cromatografía de Gases / Espectrometría de Masas	11
II.3.5.- Identificación de Compuestos	11
II.4.- Resultados y Discusión	12
II.4.1.- Aldehidos	12
II.4.2.- Alcoholes	13
II.4.3.- Cetonas	14
II.4.4.- Ésteres	14
II.4.5.- Compuestos Sulfurados	14
II.4.6.- Terpenos	14
II.5.- Tablas y Figuras	16
II.6.- Referencias bibliográficas	21
II.7.- Apéndice	23
<b>III MODIFICACIONES DE PIGMENTOS</b>	38
III.1.- Resumen	39
III.2.- Introducción	39

III.3.- Material y Métodos	40
III.3.1.- Muestras	40
III.3.2.- Procesado	40
III.3.3.- Análisis por HPLC	40
III.3.4.- Comparación del Contenido en Pigmentos	42
III.4.- Resultados y Discusión	43
III.5.- Tablas y Figuras	45
III.6.- Referencias bibliográficas	53
<b>IV MODIFICACIONES DE ACIDOS ORGANICOS</b>	<b>55</b>
IV.1.- Resumen	56
IV.2.- Introducción	56
IV.3.- Material y Métodos	57
IV.3.1.- Muestras	57
IV.3.2.- Procesado	57
IV.3.3.- Análisis por HPLC	58
IV.4.- Resultados y Discusión	59
IV.5.- Tablas y Figuras	61
IV.6.- Referencias bibliográficas	71
<b>V MODIFICACIONES DE AMINOACIDOS</b>	<b>72</b>
V.1.- Resumen	73
V.2.- Introducción	73
V.3.- Material y Métodos	74
V.3.1.- Muestras	74
V.3.2.- Procesado	74
V.3.3.- Reactivos	75
V.3.4.- Equipo de Cromatografía	75
V.3.5.- Preparación de Muestras y Estándares	75
V.3.6.- Proceso de Derivatización	76
V.3.7.- Proceso Cromatográfico	76
V.4.- Resultados y Discusión	76
V.5.- Tablas y Figuras	78
V.6.- Referencias bibliográficas	84

<b>VI MODIFICACIONES DE CARBOHIDRATOS</b>	85
VI.1.- Resumen	86
VI.2.- Introducción	86
VI.3.- Material y Métodos	87
VI.3.1.- Muestras	87
VI.3.2.- Procesado	87
VI.3.3.- Reactivos	88
VI.3.4.- Procedimiento	88
VI.4.- Resultados y Discusión	89
VI.5.- Tablas y Figuras	91
VI.6.- Referencias bibliográficas	97
<b>VII MODIFICACIONES DE ACIDOS GRASOS</b>	99
VII.1.- Resumen	100
VII.2.- Introducción	100
VII.3.- Material y Métodos	101
VII.3.1.- Muestras	101
VII.3.2.- Procesado	101
VII.3.3.- Procedimiento	102
VII.4.- Resultados y Discusión	103
VII.5.- Tablas y Figuras	105
VII.6.- Referencias bibliográficas	110
<b>VIII CONCLUSIONES GENERALES</b>	111

## ABREVIATURAS

<b>3D</b>	Tres Dimensiones
<b>BOE</b>	Boletín Oficial del Estado
<b>CSIC</b>	Centro Superior de Investigaciones Científicas
<b>EUR-15</b>	Estados de la Unión Europea. Grupo de los quince
<b>FA</b>	Fatty Acid (ácido graso)
<b>FAME</b>	Fatty Acid Methyl Ester (Ester metílico del ácido graso)
<b>FID</b>	Flame Ionization Detector (detector de ionización de llama)
<b>Fig.</b>	Figura
<b>GC</b>	Gas Chromatography (cromatografía de gases)
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography (cromatografía líquida de alta resolución)
<b>i.d.</b>	Internal Diameter (diámetro interno)
<b>M</b>	Molaridad
<b>m/z</b>	unidades de masa/carga
<b>MD</b>	Mass Detector (detector de masas)
<b>mf</b>	Muestra Fresca
<b>MIA</b>	Materia Insoluble en Alcohol
<b>MS</b>	Mass Spectrometry (espectrometría de masas)
<b>N</b>	Normalidad
<b>NDF</b>	Neutral Detergent Fiber (fibra neutro detergente)
<b>PC</b>	Personal Computer (ordenador personal)
<b>PTC</b>	Phenyl Tio Carbamide (fenil tio carbamida)
<b>PTIC</b>	Phenyl Tio Iso Cyanate (fenil tio iso cianato)
<b>p/p</b>	Peso/Peso
<b>rpm</b>	Revoluciones Por Minuto
<b>SDF</b>	Soluble Detergent Fiber (fibra soluble detergente)
<b>SST</b>	System Suitability Test (test de idoneidad del sistema)
<b>UV</b>	Ultra Violeta
<b>VIS</b>	Visible
<b>Vit.</b>	Vitamina

**v/v** Volumen/Volumen  
**y col.** y colaboradores

No se incluyen las abreviaturas correspondientes al Sistema Internacional de Unidades ni las estadísticas o interpretables por su contexto. (Decreto 1257/74, de 25 de abril de 1974, publicado en el BOE nº110 de 08/5/1974).



# INTRODUCCION



## **I.1.- Evolución de los tratamientos.**

Hace unos quinientos mil años las glaciaciones forzaron al hombre a adaptarse rápidamente al nuevo entorno; el uso de cuevas por grupos de 50-100 individuos creó un ambiente propicio para una mayor acción social. Es entonces cuando el hombre descubre el fuego. Alrededor del hogar se reforzarán los lazos que unen a la familia y a la tribu.

El control del fuego constituye un hito en la evolución del hombre prehistórico. El fuego no sólo mantiene al hombre caliente sino también ilumina su hogar, le protege contra animales salvajes, le proporciona un centro a la comunidad y modifica profundamente sus alimentos. Las carnes asadas tienen una textura y sabor muy diferente de las crudas; además se alteran más lentamente, aumenta su digestibilidad y se eliminan microorganismos potencialmente peligrosos (J. A. Ordóñez, 1998).

A partir de ese momento los tratamientos culinarios fueron evolucionando, tanto en el terreno de los alimentos animales como el de los vegetales. Tradicionalmente los alimentos vegetales se han consumido crudos en ensaladas, o bien cocidos en sopas, como guarnición o como plato principal. Dependiendo del papel que desarrolle en la mesa el modo de cocción varía; en las sopas se intenta extraer al máximo los nutrientes al agua de cocción, mientras al usarse como plato principal debe evitarse esta circunstancia al máximo. Para ello el alimento se introduce directamente en agua hirviendo, evitando así las pérdidas de nutrientes por difusión. Hoy día se dispone de un gran abanico de posibilidades para cocinar vegetales. Desde la tradicional olla con agua hirviendo al calentamiento selectivo del agua de composición del vegetal mediante irradiación con microondas, pasando por la cocción a vapor o con sobrepresión. Procesos tan simples como poner los vegetales a remojo o el escaldado tienden a modificar tanto la composición como la disponibilidad de los nutrientes (Vidal-Valverde y col., 1992). Es de suponer que procesos más drásticos, como los reseñados anteriormente, alterarán de manera más profunda las propiedades nutritivas del alimento. Pese a que se han realizado numerosos estudios sobre la composición de vegetales y cómo les afecta el calentamiento, muy pocos incluyen más de un tratamiento térmico.

## I.2.- Objetivo.

Pareció por tanto interesante estudiar en profundidad cómo varía la composición de alimentos vegetales al someterlos a los tratamientos culinarios más usuales; cocción a vapor, a presión, mediante microondas y con la tradicional olla tapada. Para ello hubo que elegir un representante de los alimentos vegetales. Se escogió la judía verde por ser un grupo consumido tanto en crudo como cocinado. Además es un grupo con relevancia económica en España. Nuestro país participa en la producción de hortalizas de la Europa de los quince (EUR-15) dedicándole una superficie de 425 mil Ha (un 22,5% del dedicado en EUR-15), con una producción de 10.544 Tm (el 28,9% del total EUR-15) (“Hechos y cifras del Sector Agroalimentario Español 1988”, 2000). Dentro de las hortalizas se eligió la judía verde (*Phaseolus vulgaris*, L.) por su consumo principalmente cocinado, ya que lo que se intenta es ver las modificaciones con el cocinado. Su cultivo en invernaderos permite disponer de muestras frescas durante todo el año, sin menospreciar tampoco su importancia económica. Su producción en España ha ido aumentando durante las últimas décadas, pasando de 149 mil Tm en 1970 a 277 mil Tm en 1990 (lo que significa un crecimiento del 85,9%) (“Hechos y cifras del Sector Agroalimentario Español 1988”, 2000). Desde entonces, y en lo que a Galicia concierne, su producción ha crecido de las 12.367 Tm de 1990 a las 15.935 mil Tm en 1997, que supone un aumento del 29% en siete años (“Anuario de estadística agraria 1997”). De hecho, la judía verde viene siendo objeto de estudio en este departamento desde hace ocho años, abriéndose con el tiempo nuevos caminos de investigación. Actualmente es objeto de estudio-mejora genética por el Departamento de Mejora Vegetal del CSIC.

Antes de su estudio en profundidad ha sido necesario fijar las condiciones bajo las cuales las judías serán cocidas. Dado que el tamaño de muestra de partida varía en función del parámetro a determinar, se fijaron los tiempos de cocción para cada tratamiento, y según la muestra, se tomaron distintos volúmenes de agua escogiendo el más adecuado en cada caso. En la tabla I.1 se muestran estos tiempos.

<b>Tratamiento</b>	<b>Tiempo (minutos)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
Vapor	40	92
Olla tapada	30	97
Presión	5	120
Microondas	5	80 W*

\* potencia del horno (ante la imposibilidad de medición)

**Tabla I.1.-** Tiempo y temperatura empleado en los distintos tratamientos.

Los parámetros medidos, presentados en esta tesis como capítulos independientes, abarcaron tanto principios inmediatos como los carbohidratos y proteínas, como componentes minoritarios como la grasa (expresada como ácidos grasos), o generados por los propios tratamientos térmicos como los aromas (componentes volátiles). La Tabla I.2 presenta la composición de la judía verde combinando valores dados por distintos autores.

<b>COMPONENTE</b>	<b>g/100g de tejido fresco</b>
<b>Humedad</b>	90.2
<b>Proteínas</b>	2.20
<b>Grasa</b>	0.23
<b>Carbohidratos Totales</b>	6.00
<i>Fructosa</i>	1.75
<i>Glucosa</i>	1.00
<i>Sacarosa</i>	0.59
<i>Almidón</i>	-
<i>Fibra</i>	1.5
<b>Cenizas</b>	0.7

**Tabla I.2.-** Composición de la judía verde cruda (M. J. González, 1996)

En este trabajo se presentan, en primer lugar, las modificaciones en componentes asociados a los parámetros organolépticos como son los componentes volátiles (capítulo

II) y el color (capítulo III). Por otra parte se encuentran los componentes asociados con parámetros nutricionales como los ácidos orgánicos y Vitamina C (capítulo IV), los aminoácidos (capítulo V), los carbohidratos (capítulo VI) y los ácidos grasos (capítulo VII).

Todos los capítulos que forman esta tesis han sido enviados a revistas internacionales especializadas, y fruto de ello se han publicado los siguientes artículos:

- “Effects of various culinary treatments on the pigment content of green beans (*Phaseolus vulgaris*, L.)”, Journal of Food Research International, 1997, 30 (10):787-791.
- “Effects of various culinary treatments on the organic acid content of green beans (*Phaseolus vulgaris*, L.)”, Deutsche Lebensmittel Rundschau, 1999, 95 (8):323-326.
- “Effects of various culinary treatments on the amino acid content of green beans”, Deutsche Lebensmittel Rundschau, 1999, 95 (12):507-510.
- “Comparision of volatile components in raw and cooked green beans using dinamic headspace sampling and microwave desorption”, Eur Food Res Technol, 2000, 210:226-230.
- “Gas chromatographic determination of fatty acid content in vegetables during different heat-treatments”, póster en el 9 Symposium on Handling of Environmental and Biological Samples in Chromatography, 1999.
- “Gas chromatographic determination of the fatty acid content of heat-treated green beans”, aceptada el 24-Mayo-2000, Journal of Chromatography.
- “Effects of various culinary treatments on the carbohydrates content of green beans (*Phaseolus vulgaris*, L.)”, en prensa.

### I.3.- Referencias bibliográficas.

- 1.- Ordoñez-Pereda, J. A., “Tecnología de los Alimentos; Volumen I: Componentes de los alimentos y procesos.” Editorial Síntesis, S.A., Madrid, (1998).
- 2.- González-Castro, M. J., “Estudio de ditintos componentes de *Phaseolus vulgaris*, L. Modificación de la composición con diversos procesos de conservación.”, Tesis de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela, (1996).
- 3.- Vidal-Valverde, C.; Frías, J. And Esteban, R. (1992). Dietary Fiber in processed Lentils. *Journal of Food Science* 57(5): 1161-1163.
- 4.- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.  
(<http://www.mapya.es/page/agric/index.htm>); “Superficies y producciones agrícolas”.
- 5.- Consellería de Agricultura, Pesca e Gandería.  
(<http://www.xunta.es/conselle/ag/public/aea97.htm>); “Anuario de estadística agraria, 1997”.



## **II**

### **COMPARACION DE LOS COMPONENTES VOLATILES EN JUDIAS VERDES CRUDAS Y COCINADAS CON GC-MS MEDIANTE ESPACIO DE CABEZA DINAMICO Y DESORCION CON MICROONDAS**

**(“Comparison of volatile components in raw and cooked green beans using dynamic headspace sampling and microwave desorption”, Eur Food Res Technol, 2000, 210:226-230)**

## II.1.- Resumen

Se evaluaron los efectos que cuatro tratamientos culinarios (hervido a vapor, en olla tapada, a presión y con horno de microondas) tienen sobre el perfil de componentes volátiles de las judías verdes. Los compuestos volátiles tanto en las judías verdes crudas como en las cocinadas se analizaron por espacio de cabeza dinámico, haciendo pasar el espacio de cabeza a través de un adsorbedor, seguido de una desorción mediante microondas a un cromatógrafo equipado con un detector de masas. Se identificaron veintisiete compuestos, entre ellos alcoholes, aldehidos, cetonas, ésteres, terpenos, compuestos sulfurados y alquenos. Todos los tratamientos térmicos implicaron importantes cambios en el perfil de compuestos volátiles, en particular un incremento en los compuestos carbonílicos y una disminución en los compuestos alcohólicos, que fue más notable en el caso del hervido en olla tapada. Está probado que los cambios en el aroma durante el cocinado de las judías verdes dependen de procesos como la oxidación de los lípidos, así como de otro tipo de reacciones, por ejemplo la degradación de Strecker.

## II.2.- Introducción

El aroma es un factor de aceptabilidad importante para cualquier producto alimenticio. Los vegetales pueden ser comidos crudos, cocinados o procesados, y dependiendo del modo de su preparación el contenido en volátiles puede variar mucho. Muchos de los compuestos volátiles están presentes por todo el vegetal (Oruña-Concha y col., 1998), otros son producidos cuando se rompen al cortarlos (Narain y col. 1990), al masticarlos (Van Ruth y col., 1995) o licuarlos (Buttery y col., 1990), y otros aparecen como productos de reacción durante el cocinado (Wu y col., 1986; Petersen y col., 1998) o el procesado (Nisperos-Carriedo and Shaw, 1990), (Shamalia y col., 1992).

El aroma de los alimentos frescos se produce normalmente por compuestos presentes “in vivo” y por otros producidos por degradación enzimática durante el almacenamiento y el procesado. El aroma de los alimentos cocinados es debido a una compleja cadena de reacciones químicas, por ejemplo la degradación de Strecker, dependiente de parámetros como humedad, temperatura y tiempo de cocinado.

Los compuestos volátiles están generalmente presentes en las plantas como mezclas complejas y su determinación requiere un método analítico como la cromatografía de gases (GC). Debido a que la muestra a inyectar debe estar libre de compuestos no volátiles, es necesario un paso de separación previo al análisis por GC.

El paso de separación puede llevarse a cabo por distintos métodos como destilación a vapor o a vacío (Shimoda y col., 1996), extracción con solventes (Homatidou y col., 1992; Kawakami y col., 1995; Morales y col., 1996), destilación y extracción simultánea (Chitwood y col., 1983; Esteban y col., 1996) y mediante espacio de cabeza estático (Shinohara y col., 1991; Mc Calley y Torres-Grifol, 1992; Clarkson y Cooke, 1996). Algunas de las limitaciones inherentes a estos procedimientos de extracción, como la formación de compuestos interferentes, la necesidad de concentrar las muestras previo su análisis, y la posibilidad de contaminación de la muestra por los solventes, pueden evitarse usando métodos de muestreo con espacio de cabeza dinámico (purga y trampa). En este trabajo, los compuestos volátiles de las judías verdes fueron extraídos mediante el sistema de purga y trampa, adsorbidos en carbón negro grafitado y rápidamente desorbidos mediante calentamiento con microondas. Técnica aplicada con éxito en el análisis de compuestos volátiles en alimentos (Rektorik J, 1985; Scharf y Sarafin, 1995; Fondville-Bagnol y col., 1995; Riedel y col., 1996). El uso de la energía de microondas para este fin es especialmente atractivo ya que permite un calentamiento de la muestra más uniforme que el conseguido con otros métodos tradicionales y puede desorber compuestos selectivamente en función de sus capacidades individuales de absorción de las microondas (Rektorik J, 1985). Los compuestos volátiles desorbidos se identificaron mediante GC con detector de espectrometría de masas (GC-MS).

Las vainas enteras de las judías verdes (*Phaseolus vulgaris*, L.) son frutos usados comúnmente como alimento que pueden comerse cocinados, bien calientes como plato principal bien fríos en ensalada. En este trabajo hemos examinado los efectos que cuatro tratamientos culinarios (hervido a vapor, en olla tapada, a presión y con horno de microondas) tienen sobre el perfil de componentes volátiles de las judías verdes porque pese a su importancia comercial, existe muy poca información al alcance sobre sus componentes volátiles.

## II.3.- Material y Métodos

### II.3.1.- Muestras

Se adquirieron judías verdes frescas (*Phaseolus vulgaris*, L.) (1 Kg) en un local de Santiago de Compostela, pudiendo ser consideradas con igual frescura y calidad a cualquier otra disponible al consumidor.

Se eliminaron los tallos y las judías se trocearon en porciones de 1 cm de largo y bien mezcladas para asegurar su homogeneidad. Las judías ya troceadas se dividieron en lotes de 200 g. El lote de judías frescas troceadas se analizó y los restantes lotes se sometieron a uno de los siguientes tratamientos culinarios:

- 1.- hervido en una olla cubierta con 250 mL de agua durante 30 minutos a 99 °C.
- 2.- hervido a vapor en una olla cubierta durante 40 minutos a 97 °C.
- 3.- hervido a presión con 150 mL de agua durante 5 minutos tras la primera salida de vapor a 112-120 °C.
- 4.- hervido en horno a microondas con 100 mL de agua durante 5 minutos.

Todos los análisis se realizaron por duplicado.

Todos los tratamientos usaron el menor volumen de agua y el menor tiempo de cocción para alcanzar un grado similar de ternura con una palatabilidad adecuada, siendo el obtenido con microondas el producto menos tierno dadas sus características térmicas.

### II.3.2.- Muestreo mediante espacio de cabeza dinámico

Las judías verdes (4 g) se transfirieron a un frasco de extracción, el cual se calentó en baño de agua a 40 °C. Durante 30 min. se hizo pasar a través de la muestra una corriente de nitrógeno a 30 mL/min. que en su salida atraviesa una trampa de carbón negro grafitado donde cualquier compuesto volátil liberado es adsorbido. Precediendo a la muestra se colocó una trampa de carbón activado para eliminar posibles impurezas de la línea de nitrógeno.

### II.3.3.- Cromatografía de Gases

Los componentes volátiles se determinaron usando un desorbedor de microondas Rektorik MW-1 A (Rektorik, Geneva, Suiza) unido por una interfase termostatzada al sistema GC-MS (Fisons, Modelo 8000 con MSD 800). Los componentes atrapados se desorbieron térmicamente usando microondas a 350 Mhz durante 0,8 seg., y se dirigieron a una columna capilar de GC (30m X 25 mm id X 1 µm de película

compuesta de un 5% difenil-polisiloxano y 95% dimetil-polisiloxano) (DB-5, J&W Scientific). Su eficacia se chequeó importando un cromatograma al “software” Chrom-Card (versión 1.18, CE Instruments, Milano, Italia) ante la imposibilidad de hacerlo con el “software” MassLab. Como gas portador se usó helio a 2,43 mL/min. El programa de temperatura del horno comienza desde 60 °C hasta 220 °C a un ritmo de 4 °C/min., manteniendo esas temperaturas inicial y final 1 y 3 min. respectivamente.

#### II.3.4.- Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas

Las condiciones del Detector de Espectrometría de Masas fueron las siguientes: temperatura de la interfase 250 °C; temperatura de la fuente de iones 200 °C; voltaje de ionización 70 eV; rango de masas 35-200 m/z; y tiempos de barrido y de retraso entre los barridos 0,45 y 0,05 seg. respectivamente. Tanto para el manejo del equipo como para la biblioteca de espectros se usó el “software” MassLab versión 1.4 de Finnigan, Reino Unido; instalado en un PC 486 con 20 Mb de RAM.

#### II.3.5.- Identificación de compuestos

Los componentes se identificaron por comparación de sus espectros de masas con los que componen la librería Willey de espectros de masas (Versión 1.4). En todos se identificaron 27 compuestos con una similitud en porcentaje  $\geq$  de un 85%. Esta similitud se validó por los dos sistemas de comparación (“For” y “Rew”) tras eliminar las interferencias producidas por las masas constituyentes de la línea base. Varios compuestos (hexanal, benzaldehido, 1-octen-3-ol, octanal, limoneno, nonanal y decanal) se identificaron posteriormente por comparación de sus tiempos de retención con los de sus estándares. Con ayuda del “software” MassLinx, versión 2.0, y Word 2000 (Microsoft, EEUU) se importaron cromatogramas desde el MassLab para posteriores comprobaciones con fragmentaciones teóricas de las moléculas analizadas. Estos “software” permiten también realizar representaciones más avanzadas (ver Figura II.2).

## II.4.- Resultados y Discusión

En la Tabla II.1 se recogen los compuestos volátiles identificados en judías verdes crudas y cocinadas. Sus espectros de masas, número de identificación CAS, fórmula y peso molecular conforman un apéndice al presente capítulo. Éstos compuestos pueden encuadrarse dentro de las siguientes familias químicas: aldehidos (de los que se encontraron 7), alcoholes (8), cetonas (6), ésteres (3), compuestos azufrados (1), terpenos (1) y n-alquenos (1) (Figura II.1).

### II.4.1.- Aldehidos

Los aldehidos lineales, como el 2-butenal (sólo detectado el olla tapada), hexanal, octanal, nonanal y decanal, provienen en su mayoría de la degradación oxidativa de ácidos grasos insaturados (oleico, linoleico y linolénico) y se ha demostrado que están involucrados en la ruta de la lipoxigenasa e hidroperoxidasa (Belitz y Grosch, 1988). Es sabido que son una ruta importante en la contribución al aroma de varias legumbres (De Lumen y col., 1978). Las cantidades de hexanal, octanal, nonanal y decanal se vieron incrementadas en el cocinado; esto puede explicarse por el hecho de que aunque las enzimas sean destruidas durante el procesado térmico, las altas temperaturas aceleran los procesos de oxidación, los cuales no están catalizados enzimáticamente. Este efecto es menor en el hervido a vapor debido a la menor temperatura de cocción (92 °C).

La formación de aldehidos de 6 carbonos (hexanal) y alcoholes (3-hexen-1-ol) en el vegetal está relacionada con la destrucción celular (Wu y Liou, 1986). La presencia de aldehidos de 6 carbonos y alcoholes es altamente responsable del característico olor a verde de las plantas y árboles, y estos compuestos son también constituyentes del aroma de algunas frutas (Olías y col., 1993).

La mayor ruta de formación de los aldehidos de cadena ramificada parece ser la desaminación-decarboxilación oxidativa, vía degradación de Strecker (García y col., 1991). El aldehido 3-metil butanal, sólo detectado en las judías verdes cocinadas, se deriva del aminoácido leucina (Belitz y Grosch, 1988). Estas reacciones suceden durante los procesos de secado y cocinado (Whitfield, 1992).

Los aldehidos aromáticos como el benzaldehido derivan del metabolismo del ácido shikímico, que produce como paso intermedio la fenilalanina (Dourtoglou y col., 1994). El benzaldehido es conocido por su olor a almendras enteras y a frutos con hueso (Narain et al, 1990) como el melocotón. Todos los tratamientos térmicos, especialmente

la cocción a presión, aumentan los niveles de benzaldehído probablemente porque este compuesto es generado térmicamente por la degradación vía Strecker (Hayashi y col., 1990).

Los mayores contenidos de aldehídos generados por degradación vía Strecker se observaron en el cocinado a presión, lo cual puede ser explicado por las altas temperaturas inducidas por este tratamiento.

#### II.4.2.- Alcoholes

Los alcoholes constituyen desde el punto de vista cuantitativo, la familia más importante de los compuestos volátiles en la judía verde cruda (73%). La presencia de alcoholes con cadena de igual longitud que la de compuestos carbonílicos encontrados entre los volátiles del vegetal es una clara evidencia de la actividad oxidorreductasa en los tejidos. Su umbral de percepción aromático es mayor que el de los aldehídos, así que su influencia en el aroma debe ser menor. Sin embargo, alcoholes insaturados como el 1-octen-3-ol y 3-hexen-1-ol poseen un umbral de percepción menor, y por ello deben jugar un papel más importante en el aroma (Seik y col., 1977). El compuesto más abundante en las muestras crudas es el 1-octen-3-ol (47%), el cual, junto con el hexanal, ha sido descrito como uno de los principales compuestos volátiles derivados del ácido linoleico en judías verdes (De Lumen y col., 1978).

La biogénesis del 3-metil-1-butanol está catalizada, vía degradación de Strecker, por la L-leucina aminotransferasa en una reacción asociada con el ácido 2-cetoglutámico, quien actúa como un grupo amino aceptor (Straus y col., 1986). Al igual que los aldehídos generados por degradación vía Strecker, los contenidos más altos de 3-metil-1-butanol se hallaron en las judías verdes cocidas a presión.

El alcohol 2-butoxi etanol posiblemente no sea un compuesto natural de las judías y su presencia parece sugerir que ha sufrido alguna contaminación por productos químicos agrícolas.

Todos los tratamientos térmicos, pero especialmente el cocinado en olla tapada, producen disminuciones en el contenido de compuestos alcohólicos. Las grandes pérdidas de alcoholes son atribuibles a la alta solubilidad de los alcoholes en el agua (Josephson y col., 1987), y este efecto se incrementa en el cocinado en olla tapada debido al mayor volumen de agua empleado (250 mL).

#### II.4.3.- Cetonas

Algunas de las cetonas deben derivar de ácidos grasos insaturados, como en la 1-penten-3-ona la cual deriva del ácido linolénico (Belitz y Grosch, 1988). Los contenidos en cetonas se incrementan con todos los tratamientos térmicos excepto en la cocción a presión.

El compuesto 6-metil-5-hepten-2-ona ha sido descrito como un producto de la degradación hidrolítica por calentamiento del neral y el geranial (Chen y Ho, 1989). Esto puede ser también el resultado división oxidativa de carotenoides como el licopeno y fitoeno (Buttery y col., 1988).

#### II.4.4.- Ésteres

Los ésteres se forman por esterificación de ácidos carboxílicos y alcoholes (Mottram, 1991). Se identificaron dos ésteres de 6 carbonos en la muestra cruda. Estos compuestos producen notas frutales (Chyau y col., 1992), en particular aquellos formados por ácidos de cadena corta. Ambos ésteres se degradaron debido al calor, dado que todos los tratamientos térmicos produjeron su completa pérdida.

#### II.4.5.- Compuestos azufrados

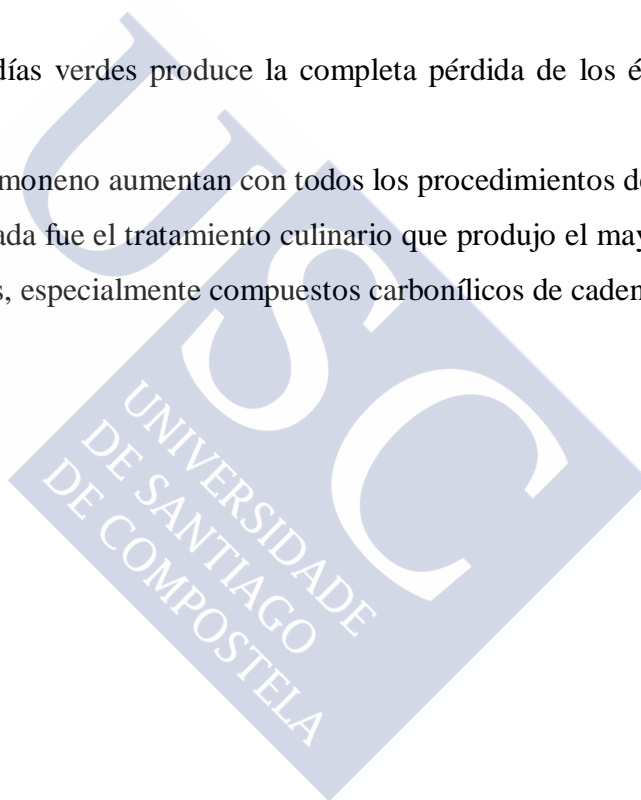
Estos compuestos provienen de la rotura de aminoácidos sulfurados, reacción que se encuentra acelerada por las altas temperaturas. Deben influir en el aroma global dado que poseen un olor fuerte (Schutte L, 1974). El único compuesto azufrado encontrado fue el sulfuro de dimetilo. Es reconocible por su olor similar a cebolla-repollo (Bouseta y col., 1996).

#### II.4.6.- Terpenos

Estos compuestos son constituyentes normales de la fracción insaponificable de la grasa vegetal. Muchos de estos volátiles se reconocen al poseer unas propiedades aromáticas distintivas, contribuyendo así pues al aroma característico de sus respectivas variedades (Horvat y col., 1991). El limoneno, con un aroma cítrico agradable, fresco, ligero y dulce, fue el único terpeno detectado.

En el perfil característico de la judía verde cruda y cocinada, predominan cierto tipo de compuestos. Los perfiles de la Fig. II.1 de unas muestras representativas muestran claramente dónde se sitúan estos compuestos y cómo varían sus contenidos. La figura II.3 muestra un cromatograma típico de judías cocidas en olla. Los cambios más importantes fueron los siguientes:

- 1) todos los tratamientos produjeron una disminución en el contenido de los alcoholes e incrementaron en el contenido de aldehidos y cetonas (Kermasha y col., 1988), mucho más marcado en el caso de la olla tapada en donde los compuestos carbonílicos se convierten en el grupo predominante.
- 2) 1-octen-3-ol, el más abundante de los componentes de las muestras crudas, disminuye durante todos los procedimientos de cocinado, excepto en cocinado a presión
- 3) El cocinado de las judías verdes produce la completa pérdida de los ésteres de 6 carbonos
- 4) Sulfuro de dimetilo y limoneno aumentan con todos los procedimientos de cocinado
- 5) El cocinado en olla tapada fue el tratamiento culinario que produjo el mayor número de compuestos volátiles, especialmente compuestos carbonílicos de cadena corta.



## II.5.- Tablas y Figuras

**Tabla II.1.-** Compuestos volátiles identificados y sus medias % Área (n=2) en judías verdes crudas y cocinadas.

**Figura II.1.-** Comparación de perfiles de familias de volátiles (% Área) de judías verdes crudas y cocinadas: a) compuestos mayoritarios y b) compuestos minoritarios.

**Figura II.2.-** Representación tridimensional de volátiles en judías. El cursor en cruz marca el cromatograma (eje x) y el espectro de masas para ese tiempo (eje y).

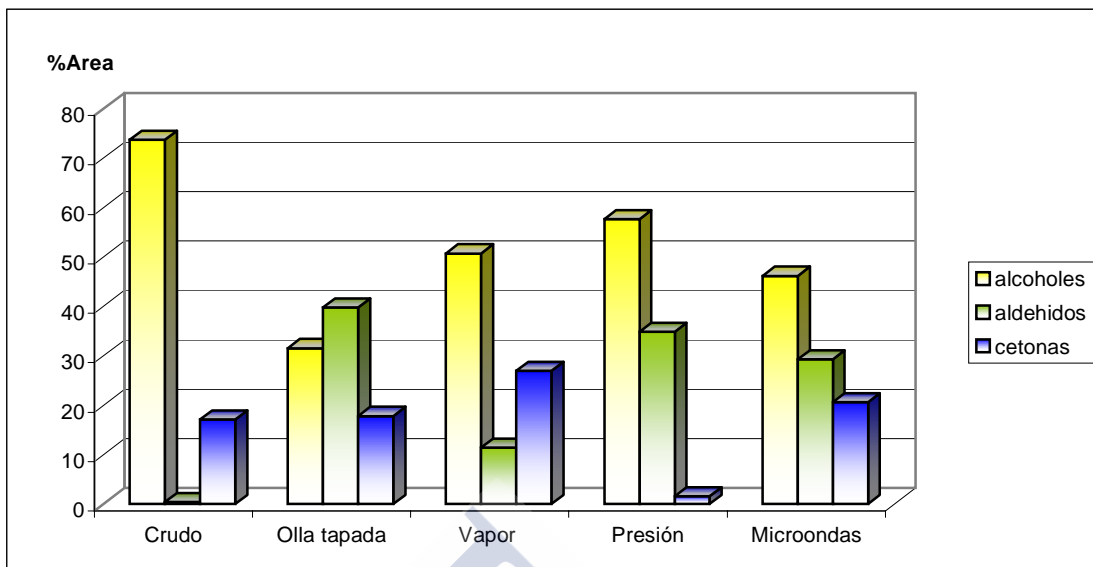
**Figura II.3.-** Cromatograma de los componentes volátiles de una muestra de judías cocidas en olla tapada.



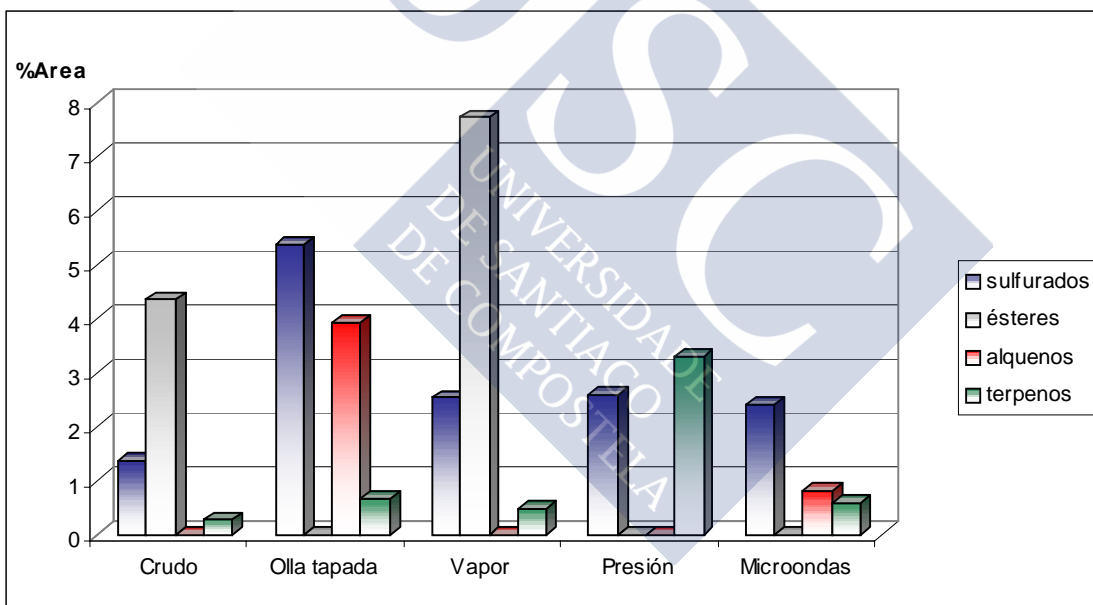
Nº	NOMBRE DEL COMPUESTO	Tiempo Retención	Crudo	Olla tapada	Vapor	Presión	Microondas
1	2-Butenal	3.3		7.0			
2	3-Metil-3-buten-2-ona	3.7		2.2			
3	Ciclopentanol	3.8		1.1			
4	1-Penten-3-ona	3.9		2.5			
5	3-Metil butanal	4.1		8.9	7.9	13.7	7.3
6	4-Octen-3-ona	4.8	1.2				
7	Sulfuro de dimetilo	5.3	1.4	5.4	2.5	2.6	2.4
8	3-Metil-1-Butanol	5.6		1.9	1.0	7.2	
9	Hexanal	6.6	2.7	15.9	0.2	9.2	17.4
10	Acetato de isobutilo	7.0			7.7		
11	4-Hidroxi-4-metil-2-pentanona	7.9	9.1	8.8	24.9	1.5	17.6
12	6-Hepten-1-ol	8.4	1.4				
13	3-Hexen-1-ol	8.4	1.3				
14	2-Butoxi etanol	10.3	17.3	15.6	46.6	2.8	41.8
15	Benzaldehido	12.6	0.1	1.0	0.6	3.1	0.9
16	1-Octen-3-ol	13.1	47.1	12.5	3.1	40.8	4.4
17	6-Metil-5-hepten-2-ona	13.4		4.2	2.1		3.0
18	3-Octanona	13.4	6.8				
19	3-Octanol	13.7	6.6				
20	3-Etil-1,4-hexadieno	13.8		3.9			0.8
21	Octanal	14.1		1.8	0.6		1.0
22	Acetato de 3-hexenilo	14.2	3.8				
23	Acetato de hexilo	14.4	0.5				
24	2-Etil-1-hexanol	15.1		0.4		6.8	
25	DL-Limoneno	15.4	0.3	0.6	0.5	3.3	0.6
26	Nonanal	18.2	0.2	2.8	1.1	4.8	1.4
27	Decanal	22.3	0.2	2.9	1.0	4.1	1.2

**Tabla II.1.-** Compuestos volátiles identificados y sus medias Area % (n=2) en judías verdes crudas y cocinadas.

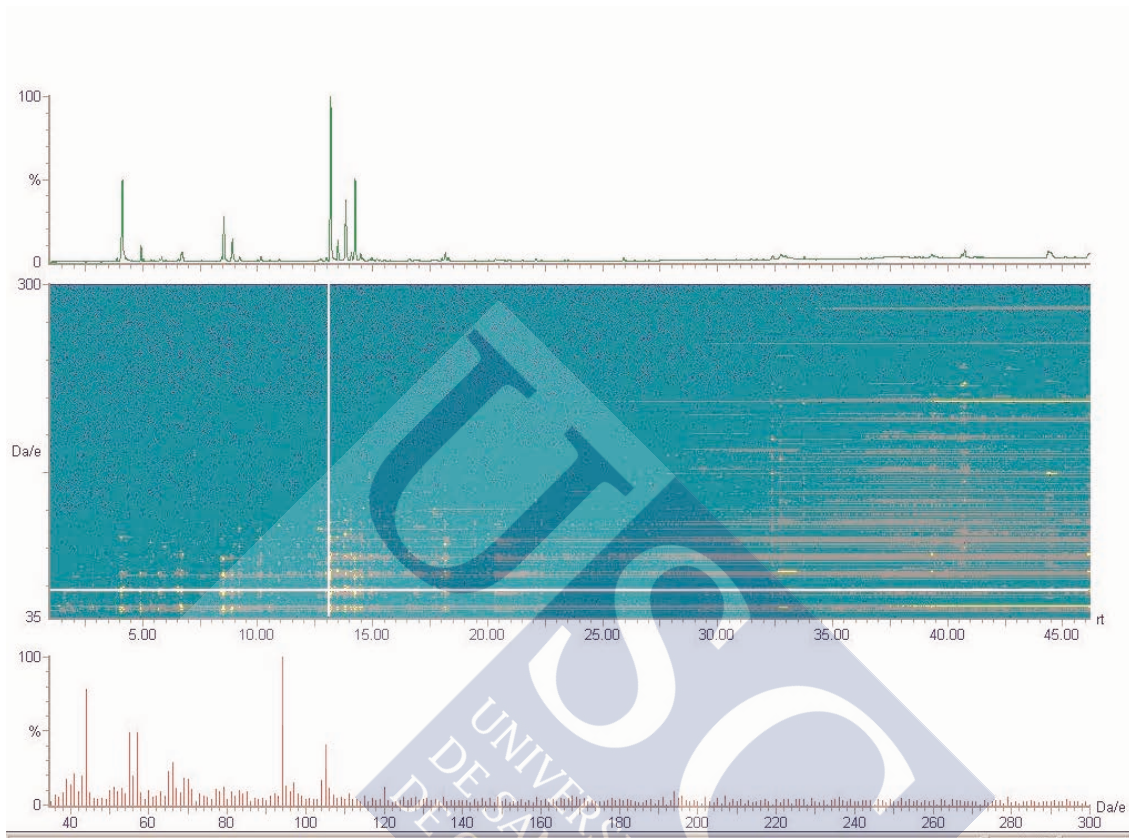
a)



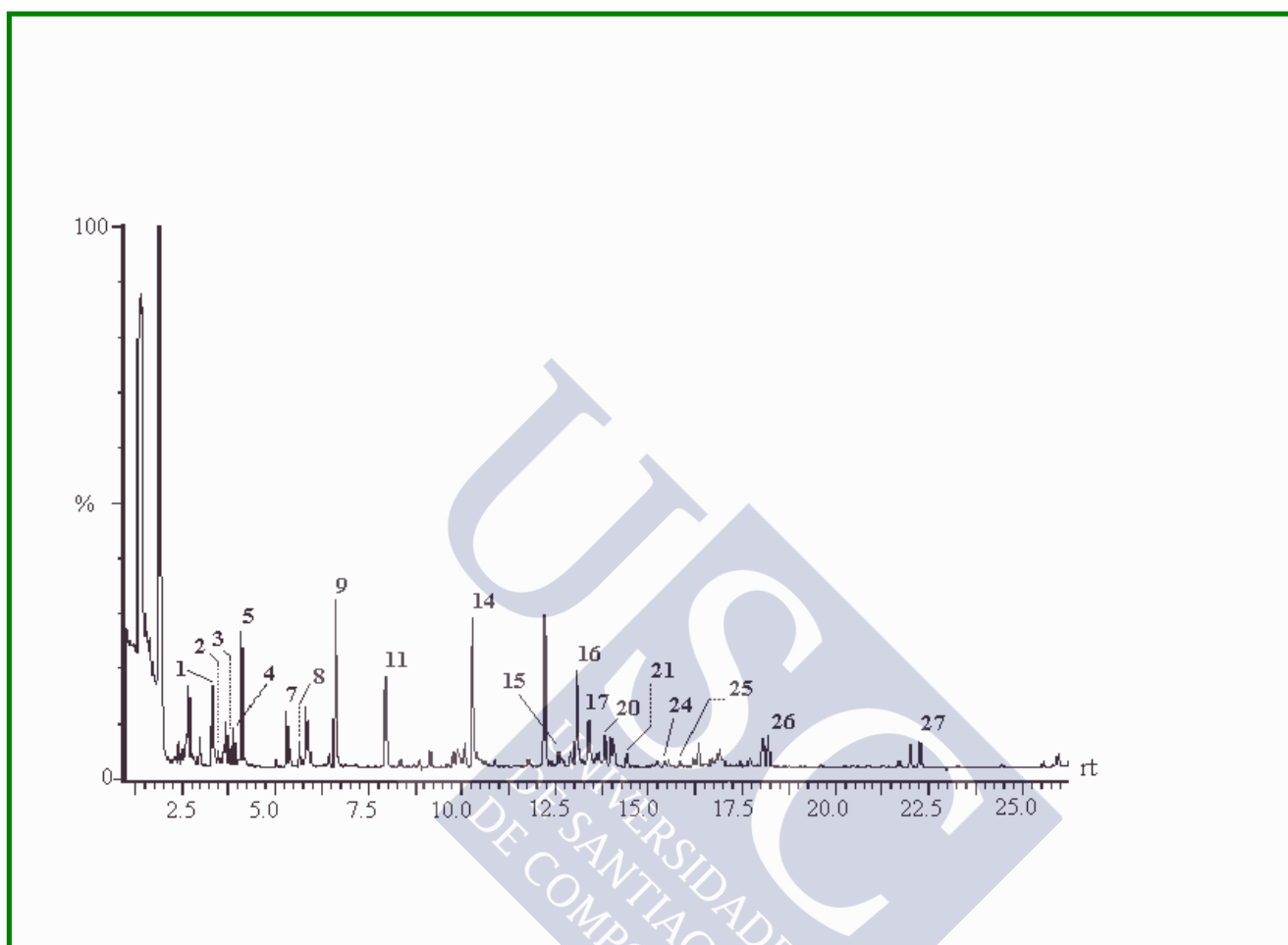
b)



**Figura II.1.** Comparación de perfiles de familias de volátiles (% Área) de judías verdes crudas y cocinadas: a) compuestos mayoritarios y b) compuestos minoritarios.



**Figura II.2.** Representación tridimensional del cromatograma y espectros de masas de volátiles en judías. El cursor en cruz marca el cromatograma (eje x) y el espectro de masas para ese tiempo (eje y).



**Figura II.3.-** Cromatograma de los componentes volátiles de una muestra de judías cocidas en olla tapada.

## II.6.- Referencias bibliográficas

1. Belitz H D, Grosch W (1988) Química de los alimentos. Acribia, Zaragoza, Spain.
2. Bouseta A, Scheirman V, Collin S (1996) J Food Sci 61 (4): 683-687
3. Buttery R G, Teranishi R, Ling L C, Flath R A, Stern D J (1988) J Agric Food Chem 36: 1247-1250
4. Buttery R G, Takeoka G, Teranishi R, Ling L C (1990) J Agric Food Chem 38: 2050-2053
5. Chen C C, Ho C T (1989) In: Thermal Generation of Aromas American Chemical Society: Washington, DC
6. Chitwood R L, Pangborn R M, Jennings W (1983) Food Chem 11: 201-216
7. Chyau C C, Chen S Y, Wu C M (1992) J Agric Food Chem 40: 846-849
8. Clarkson P, Cooke M (1996) Anal Chim Acta 335: 253-259
9. De Lumen B O, Stone E J, Kazeniak S J, Forsythe R H (1978) J Food Sci 43: 698-702
10. Dourtoglou V G, Yannovits N G, Tychopoulos V G, Vamvakias M M (1994) J Agric Food Chem 42: 338-344
11. Esteban J L, Martínez-Castro I, Morales R, Fabrellas B, Sanz J (1996) Chromatographia 43 (1/2): 63-72
12. Fondville-Bagnol A, Sarris J, Bayonove C, Flanzzy C (1995) Sci Aliment 15: 359-366
13. García C, Berdagué J L, Antequera T, López-Bote C, Córdoba J J, Ventanas J (1991) Food Chem 41:23-32
14. Hayashi T, Ishii H, Shinoara A (1990) Food Rev Int 6: 521-536
15. Homatidou V I, Karvouni S S, Dourtoglou V G, Poulos C N (1992) J Agric Food Chem 40: 1385-1388
16. Horvat R J, Arrendale R F, Dull G G, Chapman G W, Kays S J (1991) J Food Sci 56 (3): 714-715.
17. Josephson D B, Lindsay R C, Stiber DA (1987) J Food Sci 52 (1): 10-14
18. Kawakami M, Ganguly S N, Banerjee J, Kobayashi A (1995) J Agric Food Chem 43: 200-207
19. Kermasha S, Van de Voort F R, Metche M (1988) J Agric Food Chem 36: 133-137
20. Mc Calley D V, Torres-Grifol J F (1992) Analyst 117: 721-725

21. Morales A L, Albarracin D, Rodríguez J, Duque C, Riaño L E, Espitia J (1996) *J High Resol Chromatogr* 19: 585-587
22. Mottram D S (1991) Meat. In *Volatile Compounds in Foods and Beverages* H. Maarse. Marcel Dekker, Snc, New York
23. Narain N, Hsieh T C Y, Johnson C E (1990) *J Food Sci* 55 (5): 1303-1307
24. Nisperos-Carriedo M O, Shaw P E (1990) *J Agric Food Chem* 38 (4): 1048-1052
25. Olías J M, Pérez A G, Ríos J J, Sanz L C (1993) *J Agric Food Chem* 41: 2368-2373
26. Oruña-Concha M J, López-Hernández J, Simal-Lozano J, Simal-Gándara J, González-Castro M J, De la Cruz-García C (1998) *J Chromatogr Sci* 36: 583-588
27. Petersen M A, Poll L, Larsen M (1998) *Food Chem* 61 (4): 461-466
28. Rektorik J (1985) Thermal desorption of solid traps by means of microwave energy. Pat sandra, Pub. Huetig Verlag, Heidelberg
29. Riedel K, Ruppert T, Conze C, Scherer G, Adlkofer F (1996) *J Chromatogr A* 719: 383-389
30. Scharf J, Sarafin R (1995) *J High Resol Chromatogr* 18: 253-258
31. Schutte L (1974) *Critical Reviews in Food Technology* 4: 457
32. Seik T J, Albin I A, Sather L A, Lindsay R C (1977) *J Dairy Sci* 54:1-4
33. Shamaila M, Powrie W D, Skura B J (1992) *J Food Sci* 57 (5): 1173-1176
34. Shimoda M, Shiratsuchi H, Nakada Y, Wu Y, Osajima Y (1996) *J Agric Food Chem* 44: 3909-3912
35. Shinohara A, Sato A, Ishii H, Onda N (1991) *Chromatographia* 32 (7/8): 357-364.
36. Straus C, Wilson B, Gooley P, Williams P (1986) In *Biogeneration of Aromas*; ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington
37. Van Ruth S M, Roozen J P, Cozijnsen J L (1995) *Food Chem* 53: 15-22
38. Whitfield F B (1992) *Crit Rev Food Sci Nutr* 31: 1-58
39. Wu C, Liou S, Wang M (1986) *JAOCS* 63 (9): 1172-1175
40. Wu C, Liou S (1986) *J Agric Food Chem* 34: 770-772

**II.7**

**APÉNDICE**



Entry No. 118621 of 139859

Library Name: WILEY

Name: 2-BUTENAL

CAS: 4170-30-3

Formula: C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O

Mol Wt: 70

Text:

Value 1:

Value 2:

Flags:

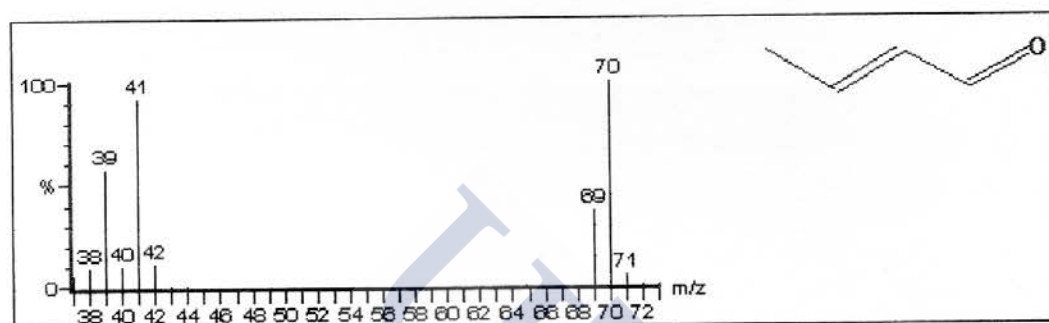


Figura 1.- Espectro de masas del 2-Butenal.

Entry No. 119170 of 139859

Library Name: WILEY

Name: 3-BUTEN-2-ONE, 3-METHYL-

CAS: 814-78-8

Formula: C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O

Mol Wt: 84

Text:

Value 1:

Value 2:

Flags:

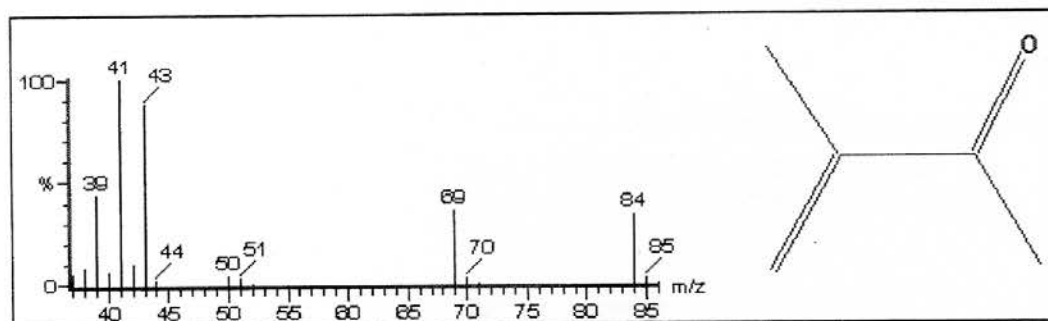


Figura 2.- Espectro de masas de la 3-Metil-3-buten-2-ona.

Entry No. 119165 of 139859

Library Name: WILEY

Name: 1-PENTEN-3-ONE

CAS: 1629-58-9

Formula: C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O

Mol Wt: 84

Text:

Value 1:

Value 2:

Flags:

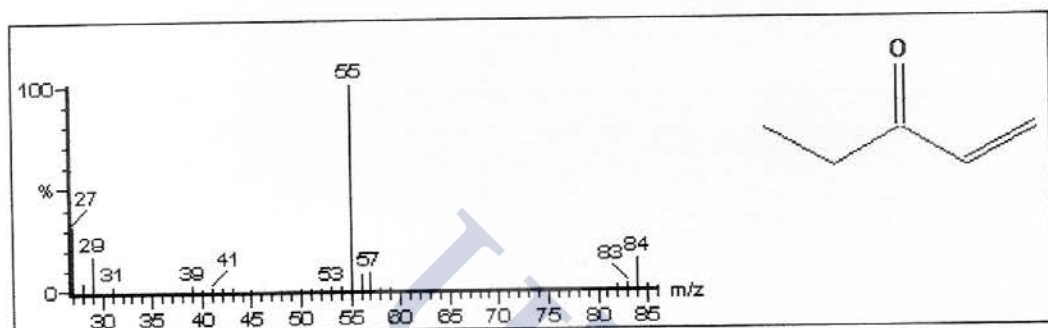


Figura 3.- Espectro de masas de la 1-Penten-3-ona.

Entry No. 119406 of 139859

Library Name: WILEY

Name: CYCLOPENTANOL

CAS: 96-41-3

Formula: C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>O

Mol Wt: 86

Text:

Value 1:

Value 2:

Flags:

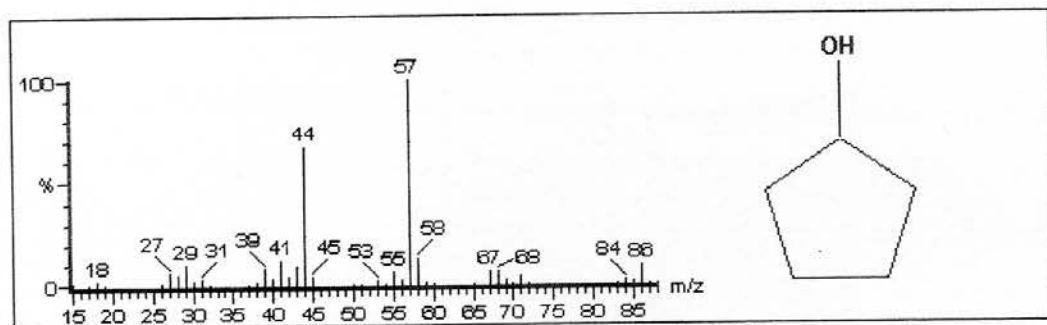


Figura 4.- Espectro de masas del Ciclopentanol.

Entry No. 119356 of 139859

Library Name: WILEY

Name: BUTANAL, 3-METHYL-

CAS: 590-86-3

Formula: C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>O

Mol Wt: 86

Text:

Value 1:

Value 2:

Flags:

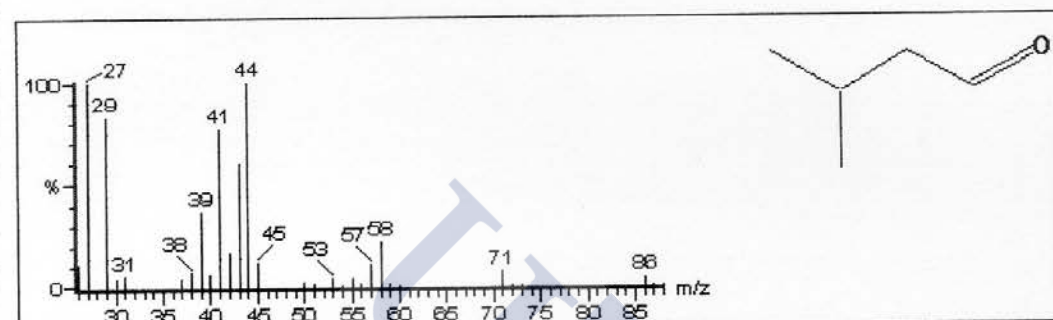


Figura 5.- Espectro de masas del 3-Metil butanal.

Entry No. 119605 of 139859

Library Name: WILEY

Name: 1-BUTANOL, 3-METHYL- (IMPURE)

CAS: 123-51-3

Formula: C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>O

Mol Wt: 88

Text:

Value 1:

Value 2:

Flags:

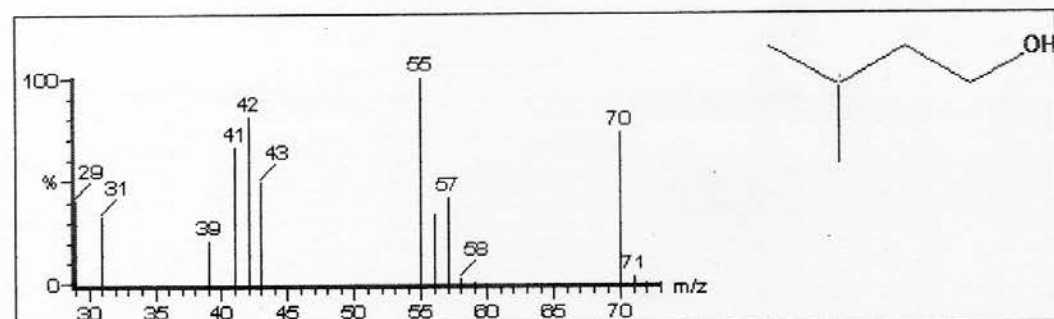


Figura 6.- Espectro de masas del 3-Metil-1-butanol.

Entry No. 119805 of 139859

Library Name: WILEY

Name: DISULFIDE, DIMETHYL

CAS: 624-92-0

Formula: C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>S<sub>2</sub>

Mol Wt: 94

Text:

Value 1:

Value 2:

Flags:

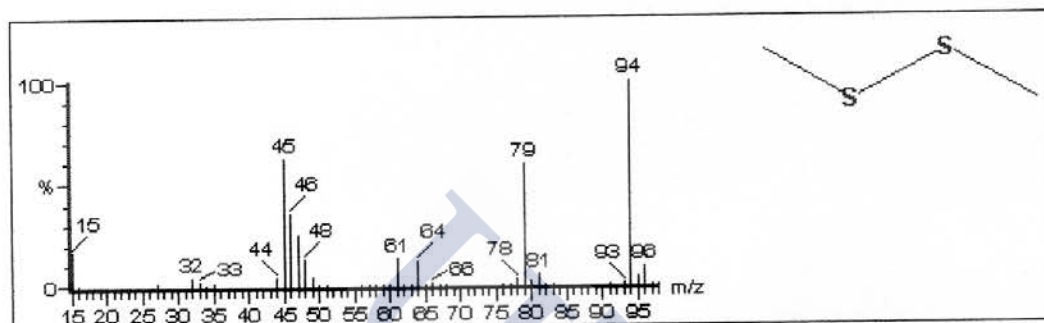


Figura 7.- Espectro de masas del Disulfuro de dimetilo.

Entry No. 120294 of 139859

Library Name: WILEY

Name: HEXANAL

CAS: 66-25-1

Formula: C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O

Mol Wt: 100

Text:

Value 1:

Value 2:

Flags:

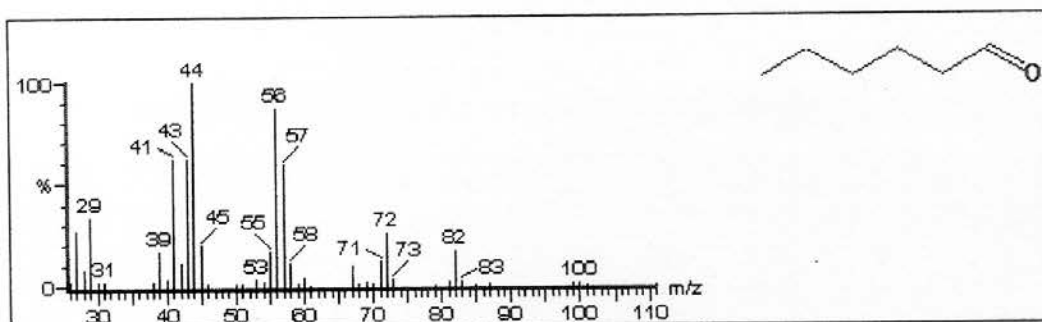


Figura 8.- Espectro de masas del Hexanal.

Entry No. 120364 of 139859

Library Name: WILEY

Name: 3-HEXEN-1-OL, [Z]-

CAS: 928-96-1

Formula: C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O

Mol Wt: 100

Text:

Value 1:

Value 2:

Flags:

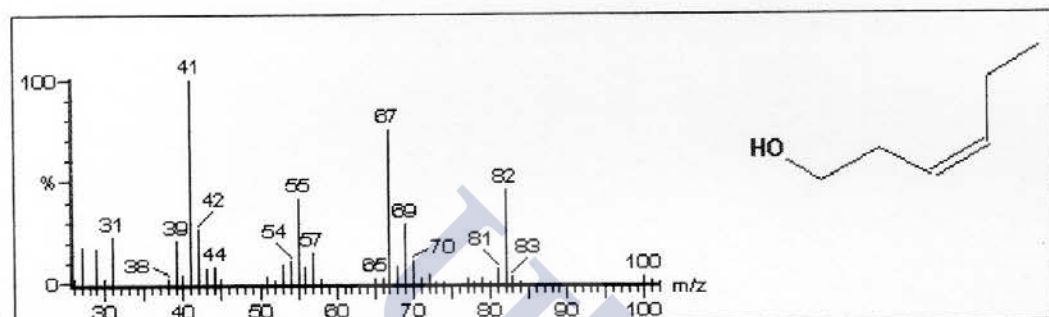


Figura 9.- Espectro de masas del 3-Hexen-1-ol.

Entry No. 120872 of 139859

Library Name: WILEY

Name: BENZALDEHYDE

CAS: 100-52-7

Formula: C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O

Mol Wt: 106

Text:

Value 1:

Value 2:

Flags:

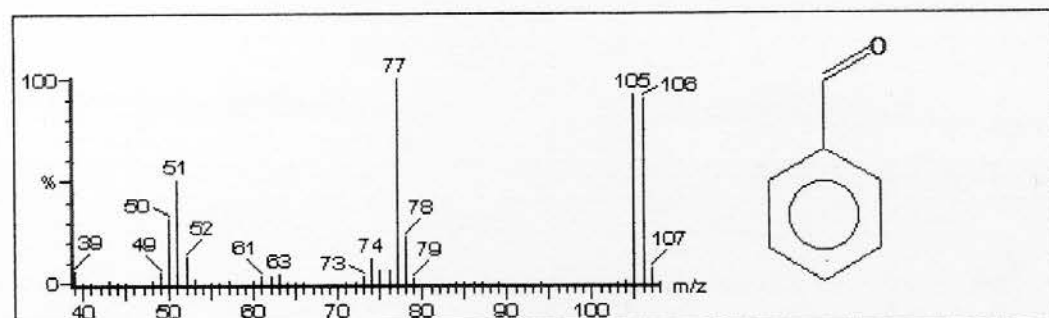


Figura 10.- Espectro de masas del Benzaldehído.

Entry No. 3154 of 139859

Library Name: WILEY

Name: 1,4-HEXADIENE, 3-ETHYL-

CAS: 2080-89-9

Formula: C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>

Mol Wt: 110

Text:

Value 1:

Value 2:

Flags:

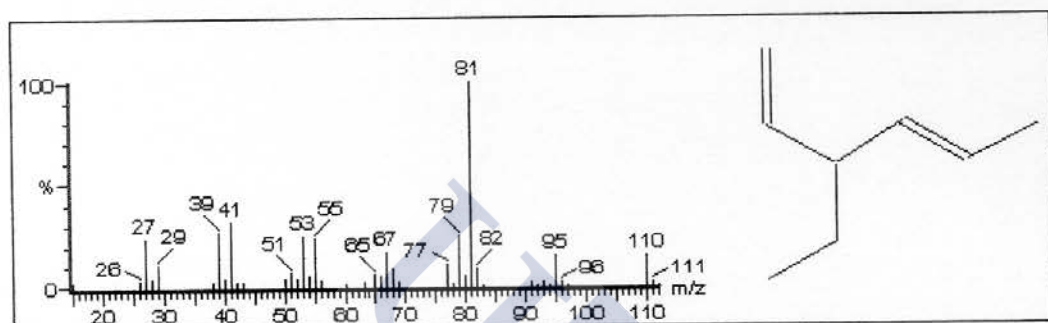


Figura 11.- Espectro de masas del 3-Etil-1,4-hexadieno.

Entry No. 4038 of 139859

Library Name: WILEY

Name: 7-HYDROXYHEPTENE-1

CAS: 0-00-0

Formula: C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>O

Mol Wt: 114

Text:

Value 1:

Value 2:

Flags:

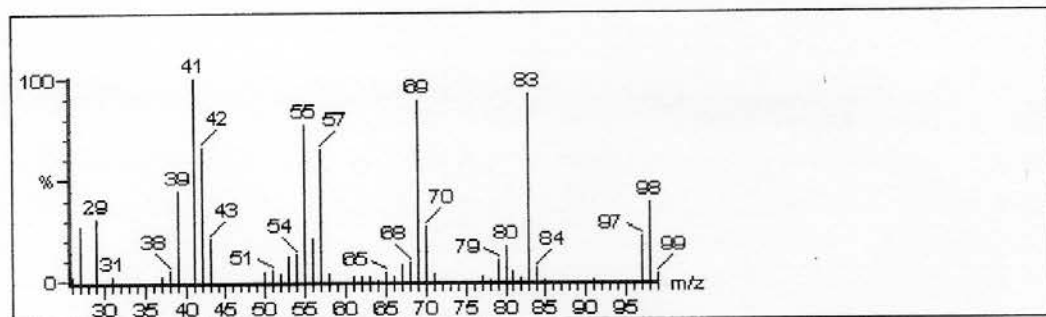


Figura 12.- Espectro de masas del 6-Hepten-1-ol.

Entry No. 121840 of 139859

Library Name: WILEY

Name: ACETIC ACID, 2-METHYLPROPYL ESTER

CAS: 110-19-0

Formula: C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>

Mol Wt: 116

Text:

Value 1:

Value 2:

Flags:

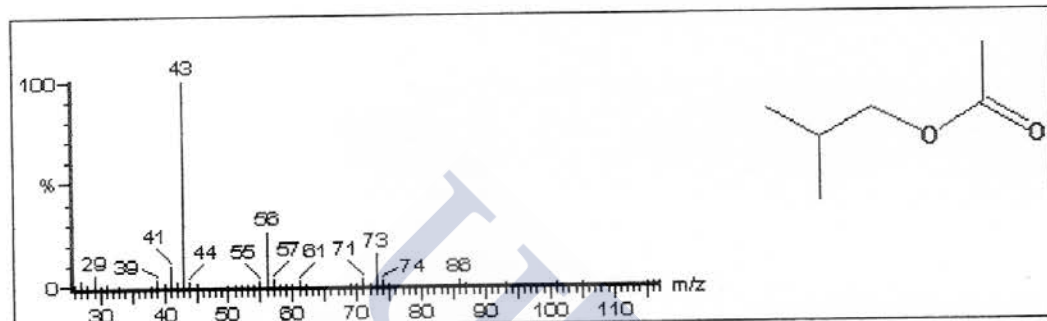


Figura 13.- Espectro de masas del Acetato de isobutilo.

Entry No. 121852 of 139859

Library Name: WILEY

Name: 2-PENTANONE, 4-HYDROXY-4-METHYL-

CAS: 123-42-2

Formula: C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>

Mol Wt: 116

Text:

Value 1:

Value 2:

Flags:

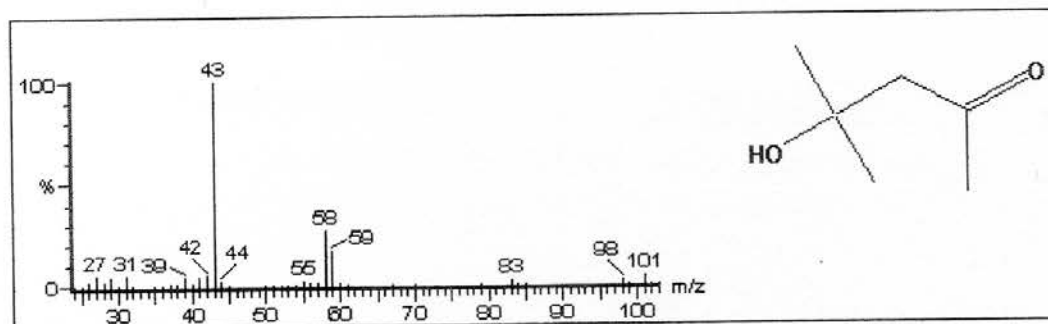


Figura 14.- Espectro de masas de la 4-Hidroxi-4-metil-2-pentanona.

Entry No. 122113 of 139859

Library Name: WILEY

Name: ETHANOL, 2-BUTOXY-

CAS: 111-76-2

Formula: C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>

Mol Wt: 118

Text:

Value 1:

Value 2:

Flags:

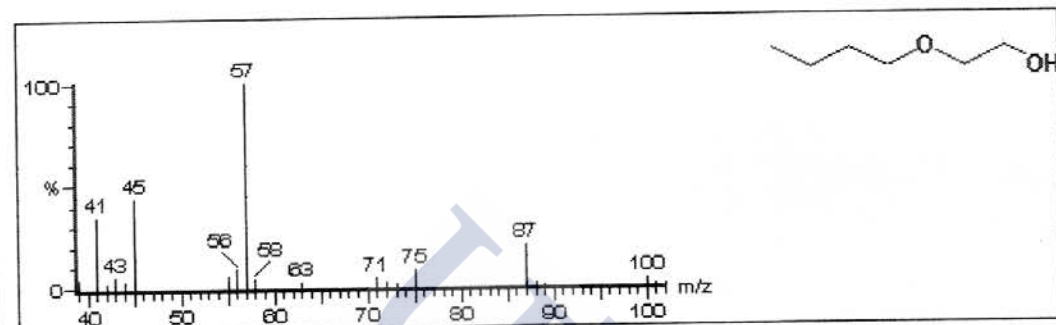


Figura 15.- Espectro de masas del 2-Butoxi etanol.

Entry No. 122899 of 139859

Library Name: WILEY

Name: 4-OCTEN-3-ONE

CAS: 14129-48-7

Formula: C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>O

Mol Wt: 126

Text:

Value 1:

Value 2:

Flags:

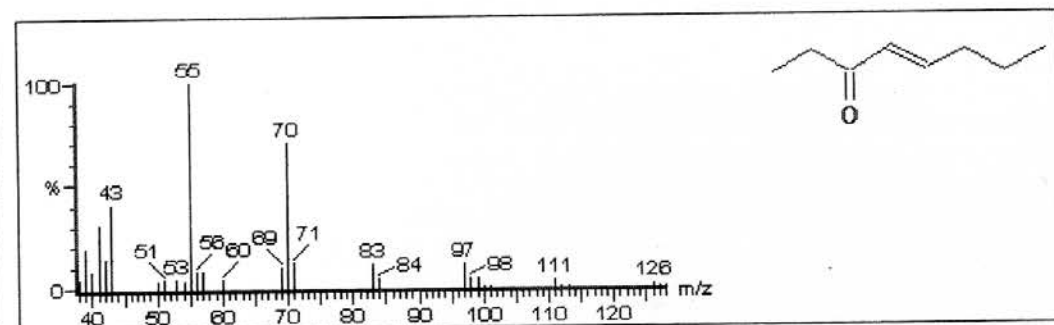


Figura 16.- Espectro de masas de la 4-Octen-3-ona.

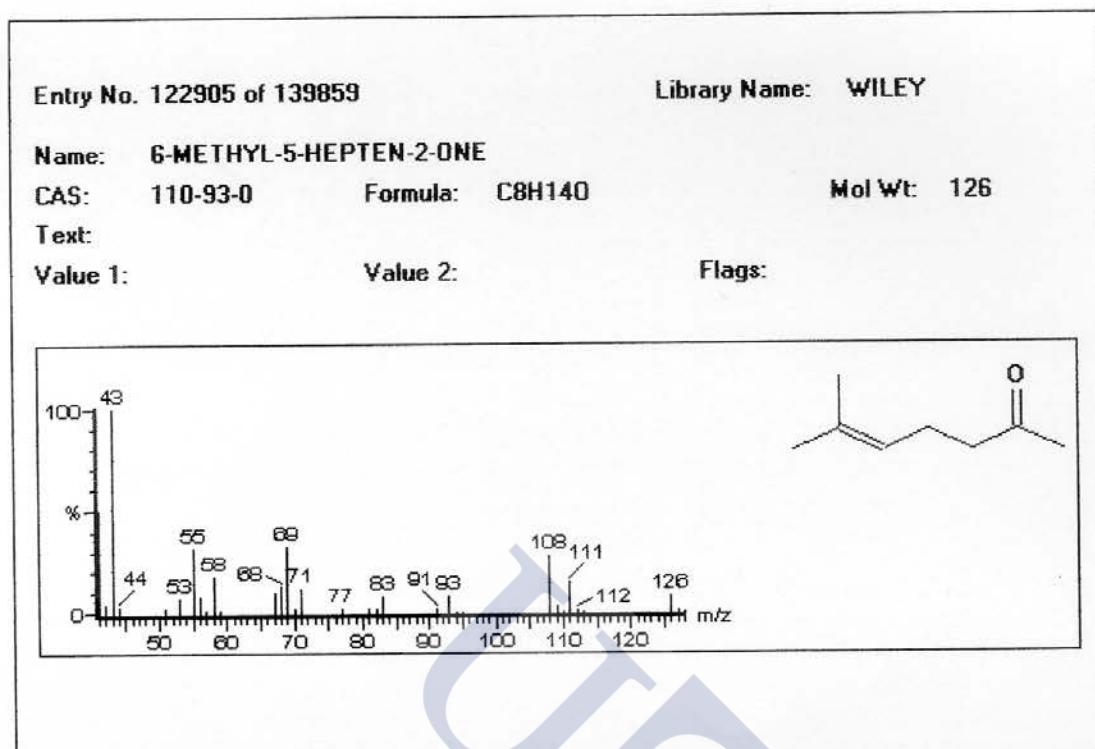


Figura 17.- Espectro de masas de la 6-Metil-5-hepten-2-ona.

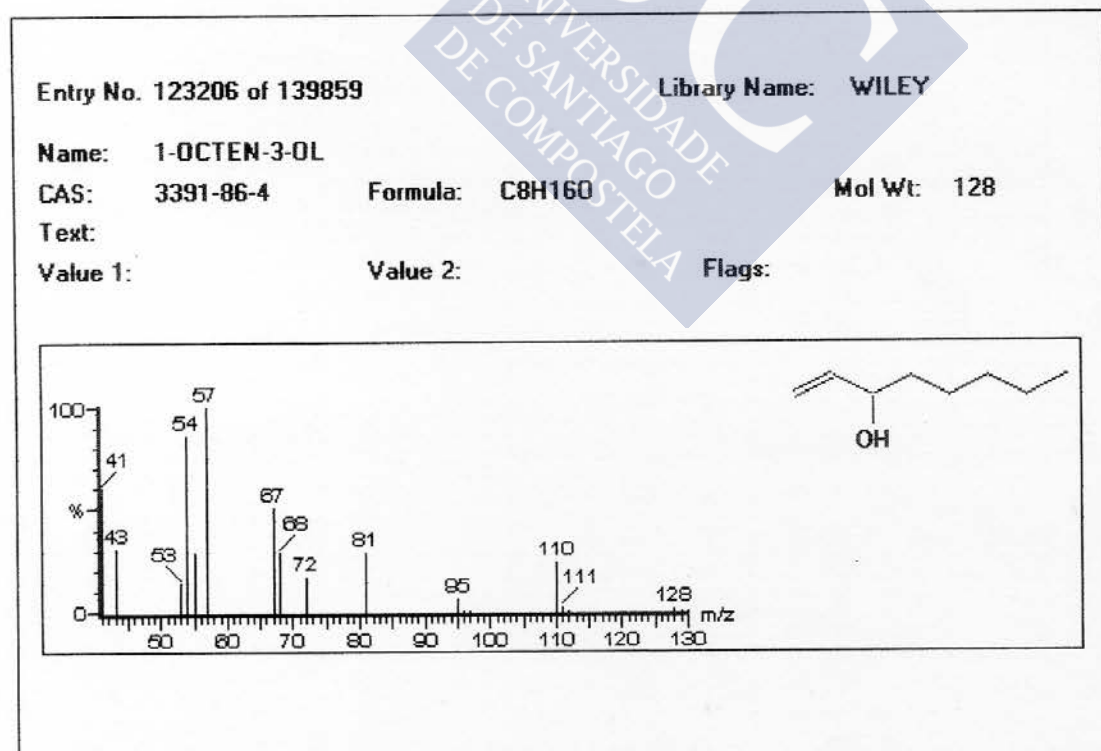


Figura 18.- Espectro de masas del 1-Octen-3-ol.

Entry No. 123179 of 139859

Library Name: WILEY

Name: 3-OCTANONE

CAS: 106-68-3

Formula: C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>O

Mol Wt: 128

Text:

Value 1:

Value 2:

Flags:

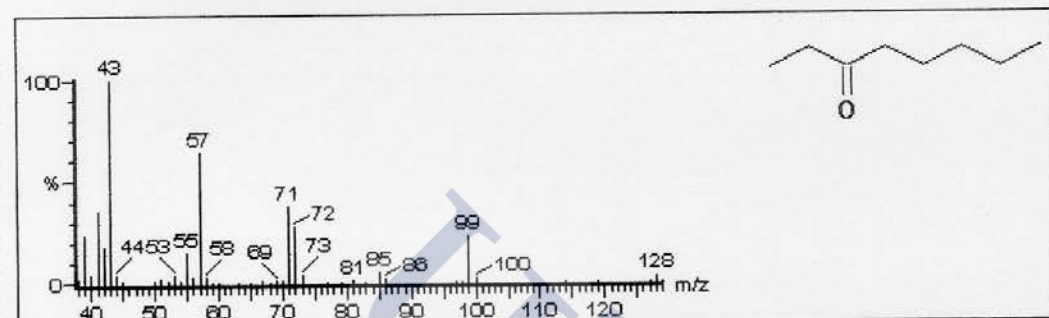


Figura 19.- Espectro de masas de la 3-Octanona.

Entry No. 123158 of 139859

Library Name: WILEY

Name: OCTANAL

CAS: 124-13-0

Formula: C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>O

Mol Wt: 128

Text:

Value 1:

Value 2:

Flags:

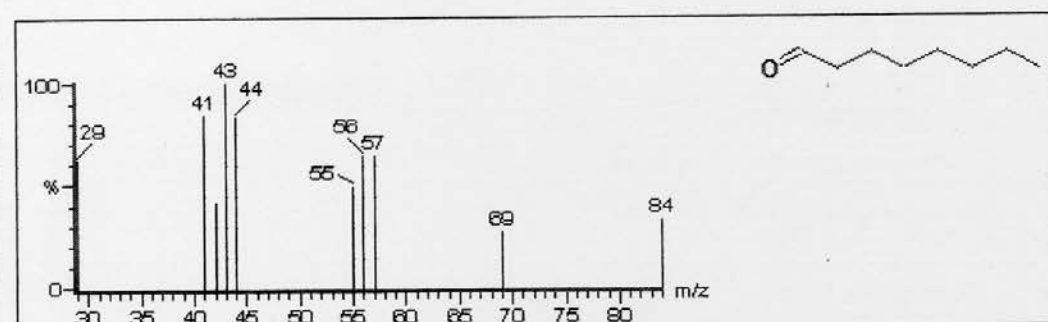


Figura 20.- Espectro de masas del Octanal.

Entry No. 123496 of 139859

Library Name: WILEY

Name: 3-OCTANOL

CAS: 589-98-0

Formula: C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>O

Mol Wt: 130

Text:

Value 1:

Value 2:

Flags:

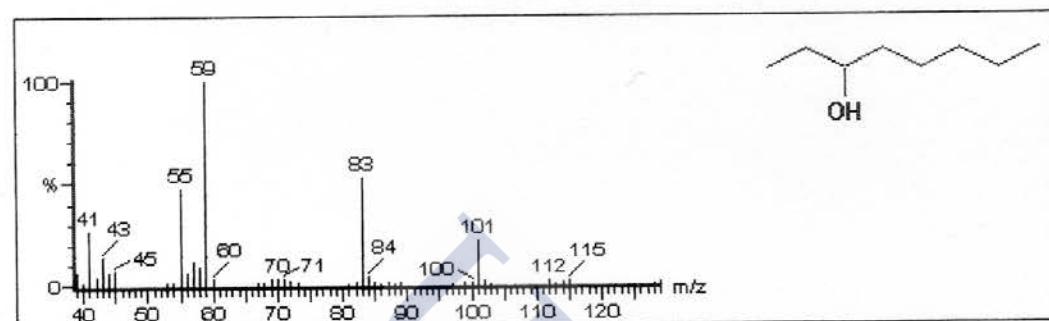


Figura 21.- Espectro de masas del 3-Octanol.

Entry No. 123522 of 139859

Library Name: WILEY

Name: 1-HEXANOL, 2-ETHYL-

CAS: 104-76-7

Formula: C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>O

Mol Wt: 130

Text:

Value 1:

Value 2:

Flags:

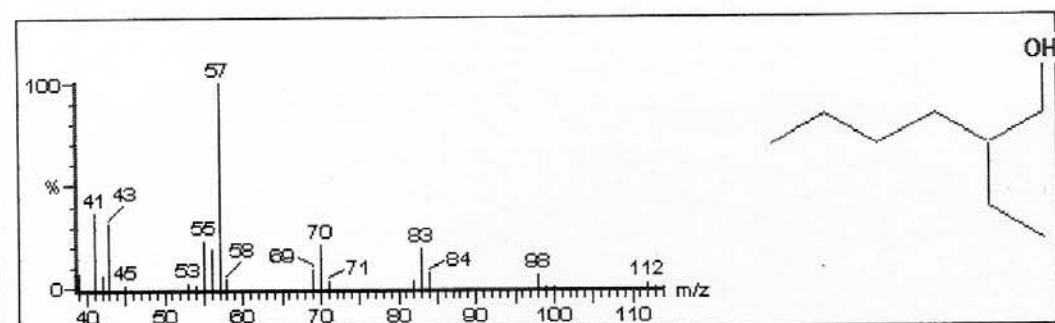


Figura 22.- Espectro de masas del 2-Etil-1-hexanol.

Entry No. 124342 of 139859

Library Name: WILEY

Name: DL-LIMONENE

CAS: 138-86-3

Formula: C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>

Mol Wt: 136

Text:

Value 1:

Value 2:

Flags:

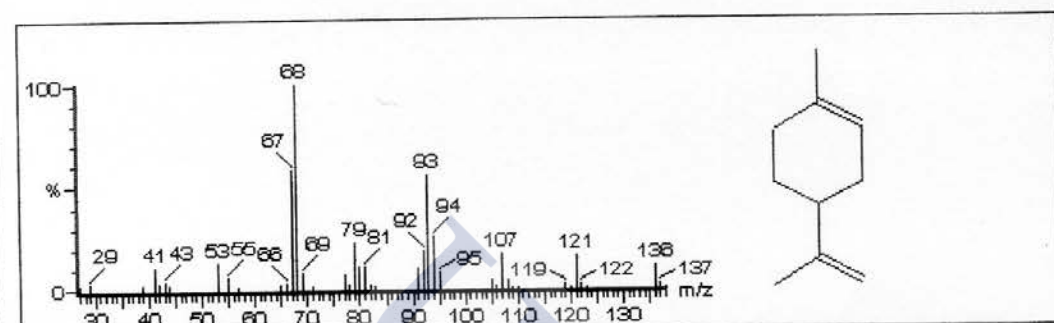


Figura 23.- Espectro de masas del DL-Limoneno.

Entry No. 124969 of 139859

Library Name: WILEY

Name: 3-HEXEN-1-OL, ACETATE, [Z]-

CAS: 3681-71-8

Formula: C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>

Mol Wt: 142

Text:

Value 1:

Value 2:

Flags:

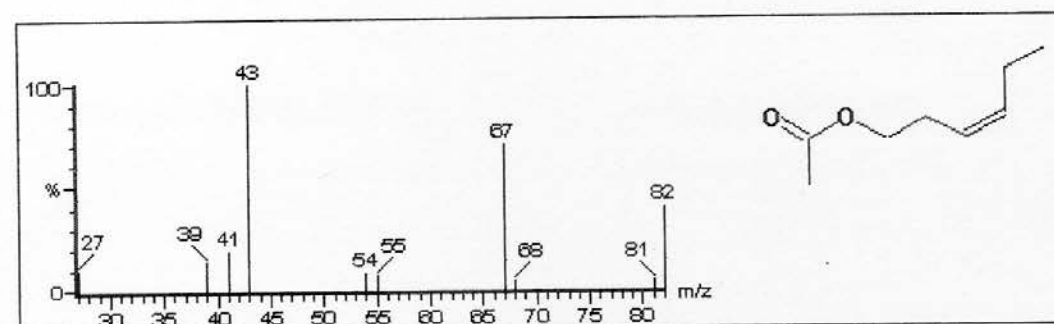
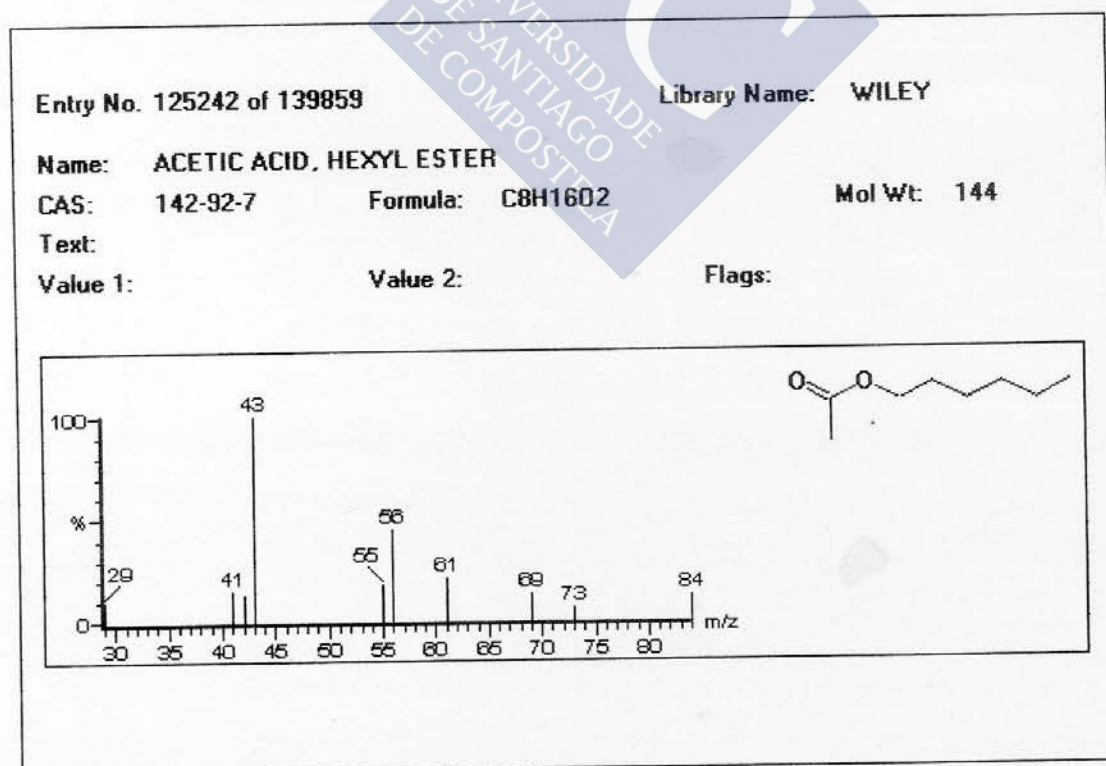
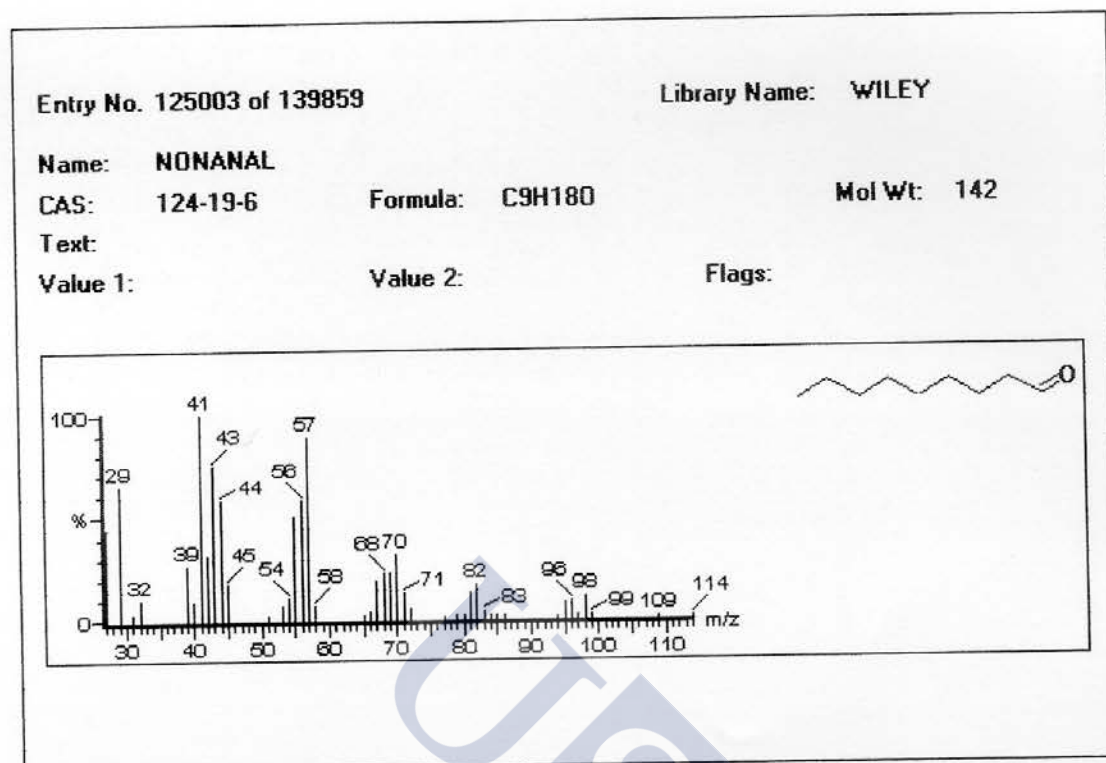


Figura 24.- Espectro de masas del Acetato de 3-hexenilo.



Entry No. 126828 of 139859

Library Name: WILEY

Name: DECANAL

CAS: 112-31-2

Formula: C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O

Mol Wt: 156

Text:

Value 1:

Value 2:

Flags:

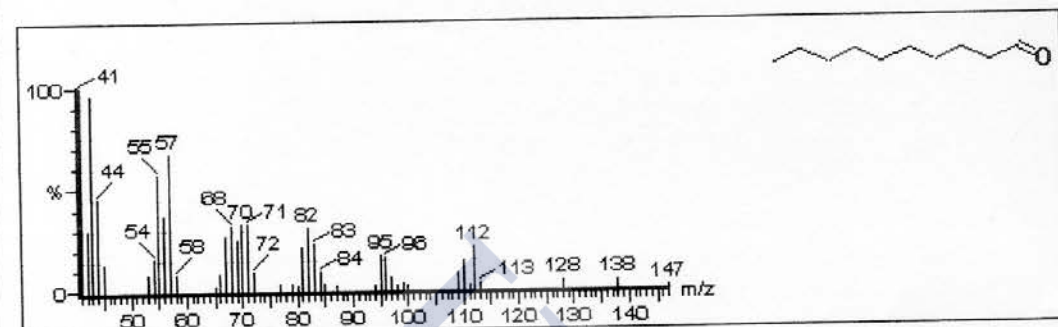


Figura 27.- Espectro de masas del Decanal.

UNIVERSIDADE  
DE SANTIAGO  
DE COMPOSTELA

### III

## **EFECTOS DE DISTINTOS TRATAMIENTOS TERMICOS EN EL CONTENIDO DE PIGMENTOS EN JUDIAS VERDES (*Phaseolus vulgaris*, L.)**

**“Effects of various culinary treatments on the pigment content of green beans (*Phaseolus vulgaris*, L.)”, Journal of Food Research International, 1997, 30 (10):787-791.**

### III.1.- Resumen

Se evaluaron los efectos que cuatro tratamientos culinarios (hervido a vapor y en olla tapada, en olla a presión y con horno de microondas) tienen sobre el contenido de clorofila *a* y *b*, all-trans-luteína, feofitina *a* y *b*, y all-trans- $\beta$ -caroteno (provitamina A) en judías verdes (*Phaseolus vulgaris*, L.). Los pigmentos en judías frescas y cocinadas se determinaron por HPLC en fase reversa con detección UV. El hervido en olla tapada, a presión o con microondas produjo pérdidas de pigmentos menores que con el cocinado a vapor. Dado que el cocinado a presión conlleva menores pérdidas de nutrientes (por ejemplo, vitamina C), se recomienda sobre el método tradicional del hervido en olla tapada.

### III.2.- Introducción

El color de los vegetales es una propiedad sensorial importante y puede usarse como un criterio de calidad del vegetal (Chen y col., 1995).

En las plantas la mayoría de los pigmentos son carotenoides y clorofilas, las cuales se encuentran juntas en la mayoría de los tejidos fotosintéticos. Los carotenoides, precursores de la vitamina A, pueden actuar a dosis altas como inhibidores de tumores (Harris y col., 1991) y úlceras (Mozsic y col., 1984). Las clorofilas son la mayor fuente de magnesio en la dieta (Buss y col., 1987). Los carotenoides principales en las judías verdes son la luteína y el  $\beta$ -caroteno (Heinonen y col., 1989), y las clorofilas predominantes son la clorofila *a* y *b*, las cuales suelen encontrarse en una proporción entorno a 3:1 (Belitz and Grosch, 1988).

Las judías verdes son un componente importante de la dieta española (Moreiras y col., 1988). En este trabajo se examinan los efectos que sobre el contenido de clorofilas y carotenoides de judías verdes frescas, tienen distintos tratamientos térmicos como hervido a vapor y en olla, cocción a presión y en horno a microondas. Las clorofilas y los carotenoides fueron determinados por un método de HPLC desarrollado en nuestro laboratorio (López-Hernández y col., 1993), que ha sido considerada la técnica más rápida, simple y reproducible para el análisis de mezclas de estos pigmentos en alimentos.

### III.3.- Material y Métodos

#### III.3.1.- Muestras

Las judías fueron adquiridas a primera hora de la mañana de cada día de muestreo en un mismo local de venta, y se pueden considerar con igual frescura y calidad a cualquier otra disponible al consumidor. Un total de ocho lotes de judías fueron analizados. Los contenidos de clorofilas *a* y *b*, all-trans-luteína, feofitina *a* y *b* y all-trans-caroteno fueron también determinados en el vegetal fresco cada día de compra.

#### III.3.2.- Procesado

En el mismo día de adquisición se obtuvieron 5 muestras de 10 gramos de judía troceada manualmente representativos del lote. Una de las muestras es inmediatamente analizada (fresco) y las otras cuatro sometidas inmediatamente a uno de los siguientes tratamientos culinarios:

- 1.- hervido en una olla cubierta con 250 mL de agua durante 30 minutos.
- 2.- hervido a vapor en una olla cubierta durante 40 minutos.
- 3.- hervido a presión con 150 mL de agua durante 5 minutos tras la primera salida de vapor.
- 4.- hervido en horno a microondas con 100 mL de agua durante 5 minutos.

Todos los tratamientos usan el menor volumen de agua y el menor tiempo de cocción para alcanzar un grado similar de ternura con una palatabilidad adecuada, siendo las muestra cocinadas mediante microondas el producto menos tierno dadas las características térmicas de las microondas (calientan menos las partes con menos agua, las más correosas).

#### III.3.3.- Análisis por HPLC

Los patrones de clorofila *a*, clorofila *b*, all-trans-luteína (pureza 70%) y all-trans- $\beta$ -caroteno (pureza 95%) pertenecen a Sigma-Aldrich (Madrid, España). Los solventes de grado HPLC: metanol, acetonitrilo, diclorometano y hexano pertenecen a Scharlau (Barcelona, España), acetona y éter de petróleo de Normasolv (Madrid, España) y tetrahidrofurano (estabilizado con 2,6-dietaributyl-methylphenol) también de Scharlau. Los patrones de feofitinas *a* y *b* se prepararon con clorofilas *a* y *b* sometiéndolas a un

calentamiento en medio ácido (13% HCl, 70°C, 5 minutos). Se sabe que la degradación de las clorofilas formando estos compuestos (también feoforbidos) está favorecida por el calor y un medio ácido (Belitz and Grosch, 1988). Las feofitinas se han identificado por su espectro visible (Daood y col., 1989).

Las judías, una vez cocinadas, se escurrieron durante un minuto e inmediatamente se homogeneizaron con ayuda de un mortero. Diez gramos del homogeneizado se mezclaron con 1 g de carbonato cálcico, 20 g de sulfato sódico anhidro y una pequeña cantidad de arena de mar. La arena de mar es usada como abrasivo con el objetivo de romper los tejidos vegetales. Se añadió acetona-éter de petróleo (50:50 v/v) al homogeneizado en pequeños volúmenes y se recogieron por filtración a vacío a través de un papel Whatman 541 hasta que el residuo quedase incoloro. Los filtrados fueron diluidos a 100 mL y 10 mL de este extracto evaporados a sequedad en un baño a 37°C bajo corriente de nitrógeno. El residuo seco es redisolto en 2 mL de hexano, filtrado (millipore 0.22 µm de tamaño de poro) para retener las partículas insolubles antes de la inyección. Cada una de las muestras homogeneizadas fue analizada por duplicado.

El equipo de HPLC comprende un cromatógrafo equipado con una bomba ternaria SP8800, bloque de inyección Reodyne de 20 µL, un detector UV-VIS de barrido y “software” Spectra Focus conectado de modo que no fue necesario el uso de un integrador, la señal del detector se recibe directamente por la puerta en serie de un PC Pentium (cromatógrafo, bomba y detector de Spectra Physics, Madrid, España). La columna, una C18 Spherisorb ODS2 (tamaño de partícula de 5 µm; diámetro interno 4.6 x 250 mm; de Sugelabor, Madrid, España). El proceso comienza en elución isocrática durante 9 minutos con una mezcla de metanol (15%), acetonitrilo (75%), y 1:1 hexano:diclorometano (10%); sigue en gradiente hasta los 16 minutos tras la inyección para alcanzar la composición final de 15% metanol, 40% acetonitrilo y 45% de 1:1 hexano:diclorometano, manteniéndose esta mezcla de forma isocrática hasta los 24 minutos. El flujo se mantiene constante a 0.8 mL/min. Tras cada inyección la columna es reequilibrada pasándole la mezcla inicial a 2 mL/min. Para chequear la eficacia de la columna se utilizó la página de cálculo del “software” PC-1000, que incluye con la integración el SST (“System Suitability Test”).

La identificación de los pigmentos se basa en la comparación de sus tiempos de retención y sus espectros visibles de absorción con sus respectivos patrones. Las longitudes de onda seleccionadas para la detección de los pigmentos fueron 410 nm

para la feofitina *a*, 430 nm para la feofitina *b* y clorofila *a*, 450 nm para all-trans-luteína y  $\beta$ -Caroteno, y 460 nm para la clorofila *b*. Para la identificación por comparación de espectros de absorción se utilizó el “software” PC 1000 versión 3.0 (Thermo Separation Products, Fremont-California, EEUU) que trabaja sobre el sistema operativo OS/2 Warp versión 3.0 de IBM. Este “software” permite crear una biblioteca de espectros para su posterior comparación con espectros seleccionados de otras muestras. Para crear esta pequeña biblioteca de espectros se usaron los patrones de Sigma-Aldrich, así como los obtenidos en el laboratorio para las feofitinas. Por otra parte, este “software” permite una presentación en 3D de los cromatogramas (Figura III.4).

#### III.3.4.- Comparación del contenido en pigmentos

La comparación entre el contenido en pigmentos de la judía fresca y las cocinadas se llevó a cabo mediante una exploración comparativa de los resultados (“Box and Wisker Plot”) usando los programas informáticos Statistica para Windows, Realase 4.5, Statsoft, Inc. 1993 y Standford Graphics para Windows, versión 2.1c.

El sistema de “box and wisker plot” resume la distribución de la variable categorizada por otros grupos o variables independientes mediante tres componentes:

1. Una línea central que indica la tendencia central.
2. Una caja que indica la variabilidad entorno a esta tendencia central.
3. Márgenes o bigotes (“wiskers”) entorno a la caja que indican el rango de variación.

En la Figura III.2 se presenta este tipo de análisis para los pigmentos. La caja muestra el cuartil inferior, la mediana (línea central) y el cuartil superior, mientras los bigotes indican el rango donde los valores son aceptables. Los valores fuera de este rango, que equivale a 1.5 veces cada uno de los cuartiles, son considerados “outliers” (fuera de los límites) y si la distancia es mayor de 3 veces el rango intercuartílico entonces son considerados valores extremos o aberrantes (“extreme values”).

Tras esto, y para reducir el número de datos comparados, los valores de las medianas de cada uno de los ocho lotes analizados, sometidos a cada uno de los distintos tratamientos, se representaron en una figura comparando el efecto de los distintos tratamientos culinarios en el contenido total de pigmentos (eje de ordenadas), contenido individual de pigmentos (área de los sectores) y contenido total de las judías (áreas de los círculos).

### III.4.- Resultados y Discusión

El contenido en pigmentos de las judías crudas y cocinadas aparece reflejado en la Tabla III.1. El contenido en pigmentos de las judías objeto de estudio está expresado como mg de pigmento por 100 g de muestra fresca. La precisión del método para la medida de los diferentes pigmentos en la judía fresca y tratada por distintos procedimientos se estimó como %RSD de una serie de 10 alícuotas de una sola muestra. Cada una se sometió al proceso completo, obteniendo valores desde 2.32 hasta 3.3 %.

Para los diferentes pigmentos de la judía se detectaron valores fuera de rango y valores extremos en los datos usados (mg de pigmentos en 100 g de muestra fresca) al usar el “box-and-whisker-plot” (Figura III.2). Los datos de las medianas se usaron para preparar la Figura III.3. La mediana no se ve seriamente afectada por las variaciones entre las muestras de judías; las grandes variaciones son identificadas como valores extremos. Esta figura muestra que todos los tratamientos térmicos, especialmente con el cocinado a vapor, reducen el total de pigmentos extraídos, a excepción del cocinado con microondas. Las grandes pérdidas de pigmentos son atribuibles a la degradación térmica de las clorofilas en feofitinas, y este efecto es mayor en las cocidas a vapor por su también mayor tiempo de cocinado (40 min). En la figura III.5 se muestra el espectro de la clorofila *a*.

Es conocido que la degradación de clorofilas en feofitinas se ve favorecida por unas condiciones ácidas, las cuales son comunes en los tejidos vegetales (Belitz and Grosch, 1988). Las clorofilas estuvieron mejor protegidas en el hervido en olla, a presión y con microondas. Esto puede explicarse por los relativos bajos niveles de ácidos orgánicos que poseen las judías así tratadas, respecto a las cocidas a vapor (Cruz-García y col., 1999).

En contraste con el contenido en clorofilas, el contenido en carotenoides ( $\beta$ -caroteno y luteína) se incrementó por todos los tratamientos culinarios. En la Figura III.6 se muestra el espectro del  $\beta$ -caroteno y su comparación con el producido por un patrón. Este incremento inducido por el calor ya ha sido observado previamente (Granado y col., 1992), y ha sido atribuido a que el calor aumenta la extractibilidad química de los carotenoides (Khachik and Beecher, 1987). El incremento para la luteína es similar en todos los tratamientos térmicos, mientras que en caso del  $\beta$ -caroteno, este incremento es

mayor en la olla tapada y en la cocción a vapor que en los otros tratamientos que usan tiempos más cortos.



### III.5.- Tablas y Figuras

**Tabla III.1.-** Contenido en pigmentos (mg/100 g mf) de judías frescas y cocinadas; rango cuartílico de ocho muestras.

**Figura III.1.-** Cromatogramas de pigmentos de judías cocidas en olla tapada a  $\lambda=410$  y 430 nm a  $\lambda=450$  y 460 nm.

**Figura III.2.-** “Box and Whisker plot” de (a) clorofila *a*, (b) luteína, (c) clorofila *b*, (d) feofitina *b*, (e) feofitina *a* y (f)  $\beta$ -caroteno.

**Figura III.3.-** Representación de los efectos de varios tratamientos culinarios (eje x) en el contenido total de pigmentos en judías verdes (área de los círculos y eje y) y el contenido individual de pigmentos (área de los sectores).

**Figura III.4.-** Cromatograma 3D de pigmentos de judías crudas.

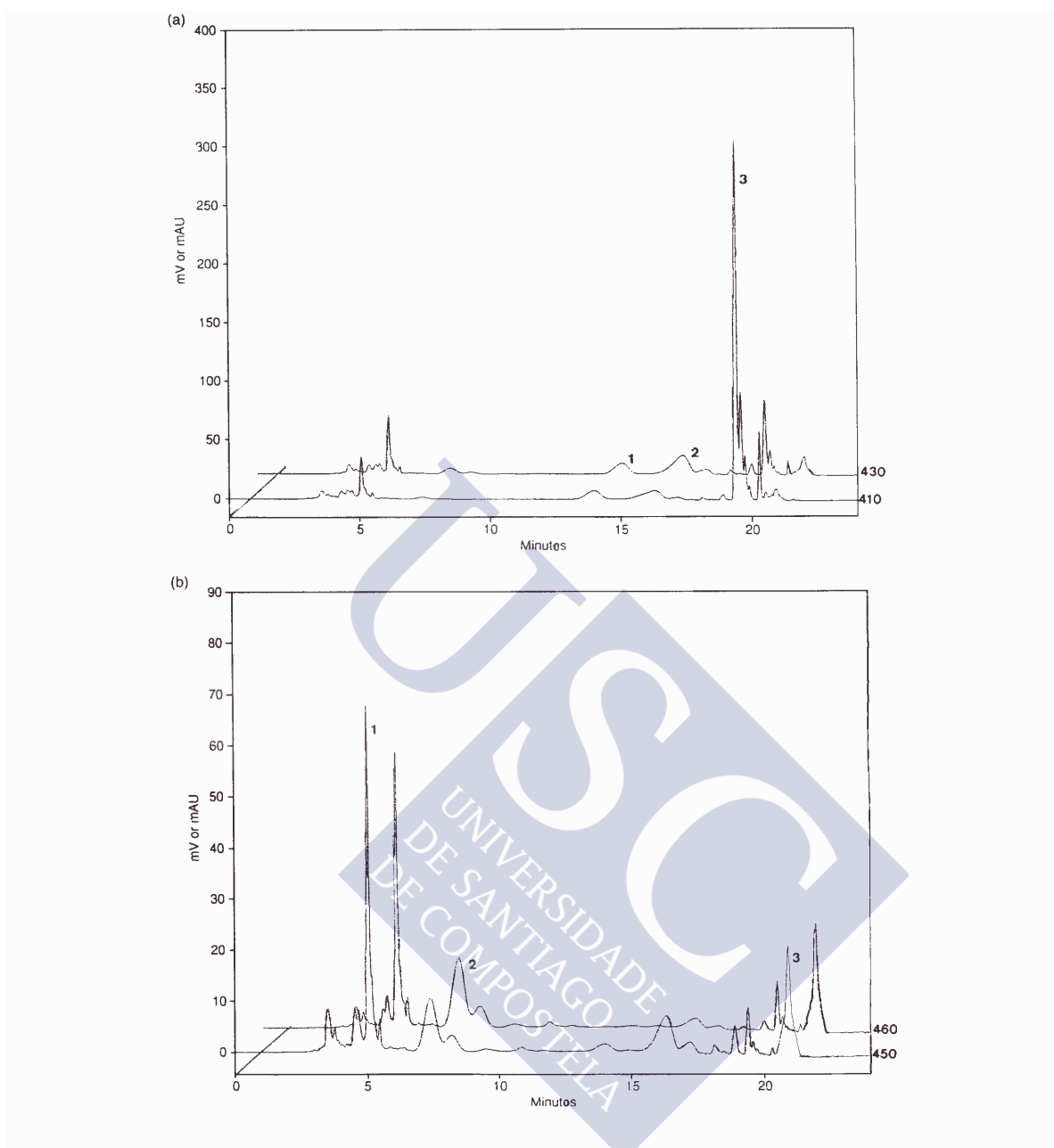
**Figura III.5.-** Espectro de la clorofila *a* en una muestra de judías cocidas en olla.

**Figura III.6.-** Comparación de espectros de  $\beta$ -caroteno de una muestra de judías (A) y un patrón (B).

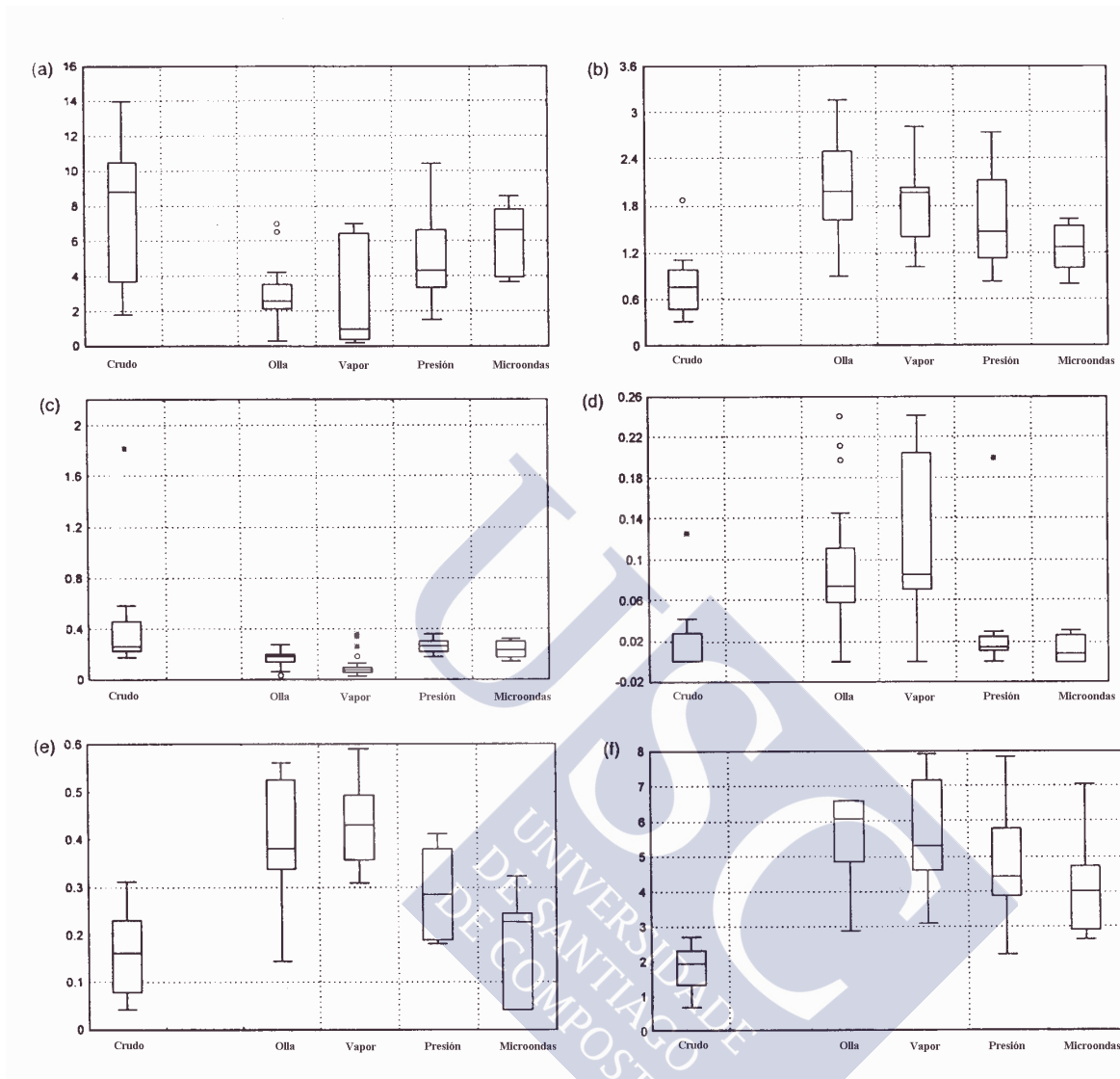


<b>Pigmento</b>	<b>Fresco</b>	<b>Olla tapada</b>	<b>Vapor</b>	<b>Presión</b>	<b>Microondas</b>
<b>Clorofila <i>a</i></b>	3,66-10,50	2,13-3,55	0,34-6,74	3,33-6,65	3,94-7,85
<b>Luteína</b>	0,47-0,99	1,61-2,50	1,39-2,03	1,12-2,12	1,00-1,54
<b>Clorofila <i>b</i></b>	0,22-0,46	0,13-0,20	0,06-0,09	0,22-0,30	0,17-0,30
<b>Feofitina <i>b</i></b>	0,00-0,03	0,06-0,11	0,07-0,20	0,01-0,03	0,00-0,03
<b>Feofitina <i>a</i></b>	0,08-0,23	0,34-0,52	0,35-0,49	0,19-0,38	0,04-0,25
<b>β-caroteno</b>	1,32-2,32	4,81-6,59	4,56-7,17	3,85-5,79	2,86-4,70

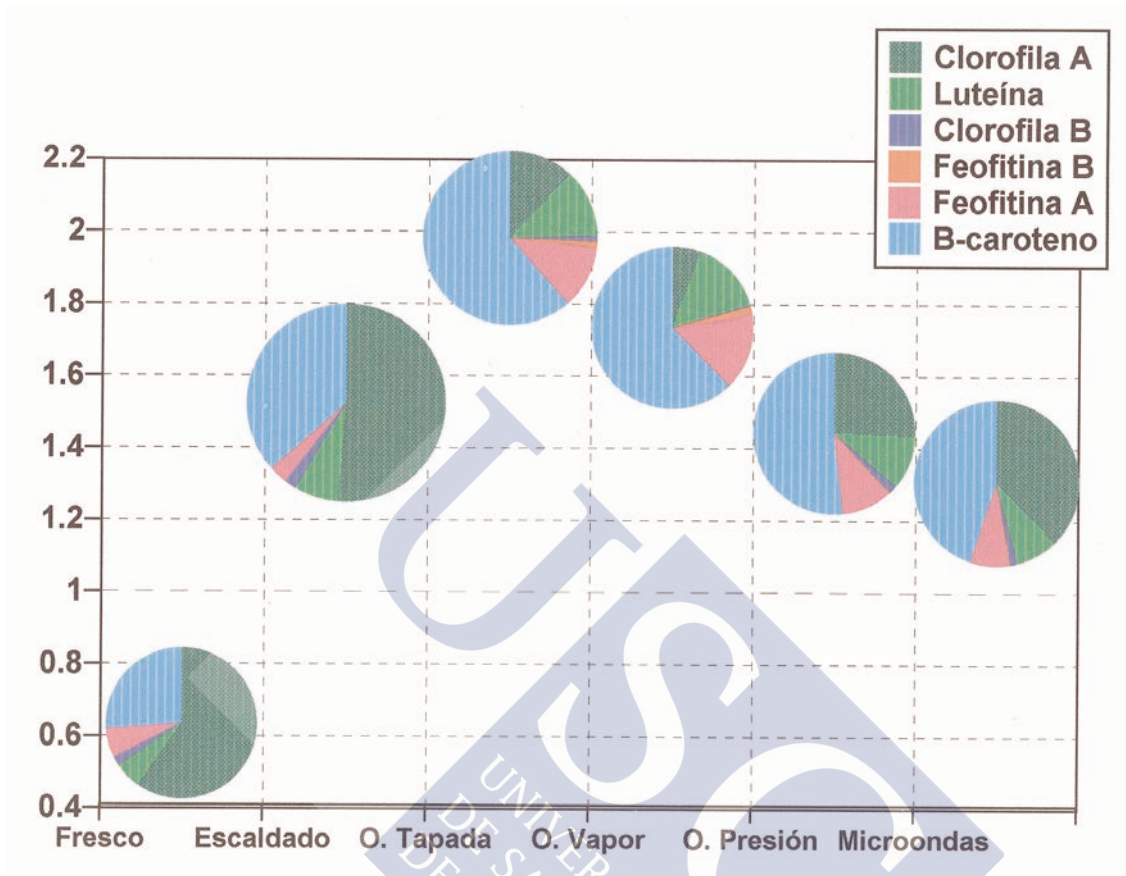
**Tabla III.1.-** Contenido en pigmentos (mg/100 g mf) de judías crudas y cocinadas; rango cuartílico de ocho muestras.



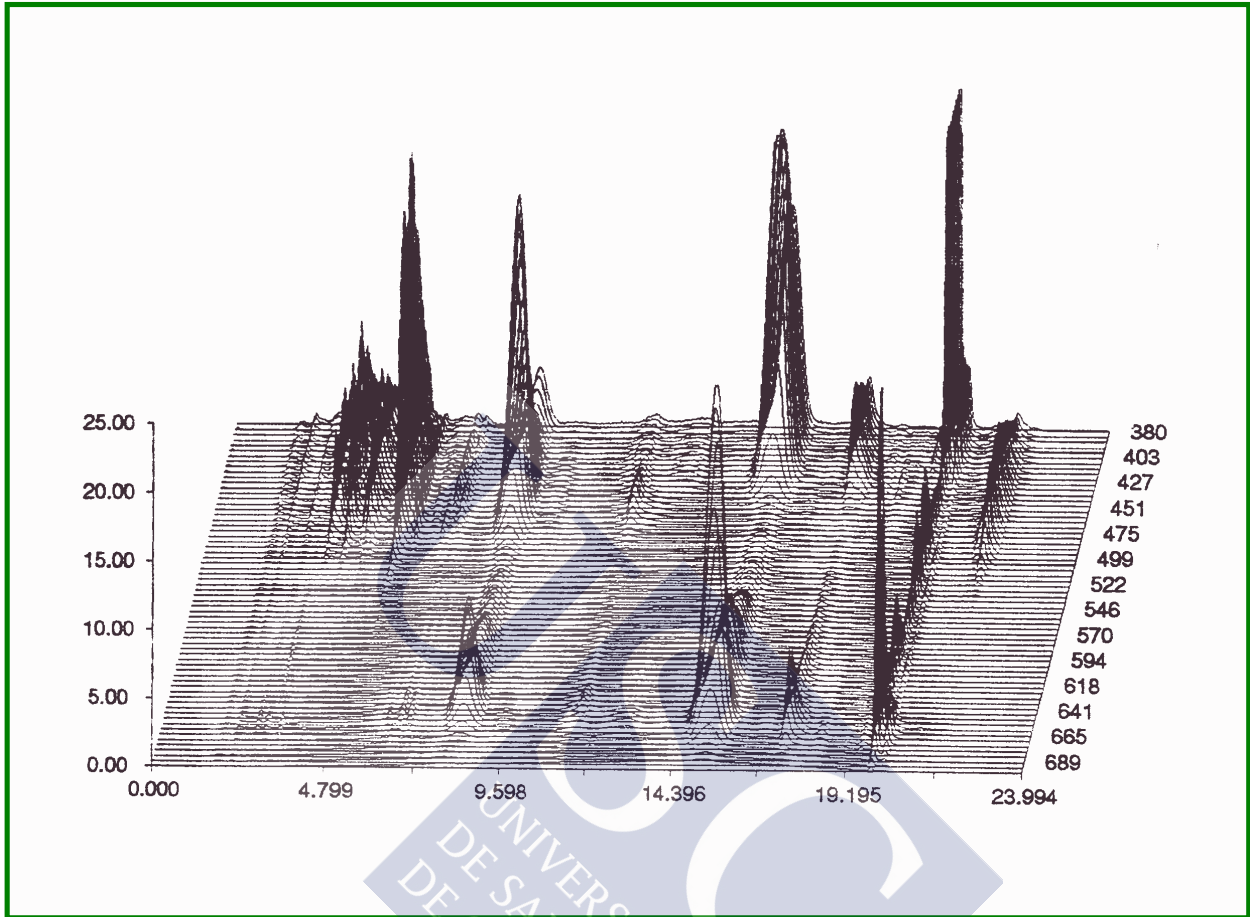
**Figura III.1.-** Cromatogramas de pigmentos de judías cocidas en olla tapada; a) ( $\lambda=410$  nm) muestra la feofitina *a* (3) y ( $\lambda=430$  nm) muestra la clorofila *a* (1) y al feofitina *b* (2); y b) ( $\lambda=450$  nm) muestra la luteína (1) y el  $\beta$ -caroteno (3), y ( $\lambda=460$  nm) muestra la clorofila *b* (2).



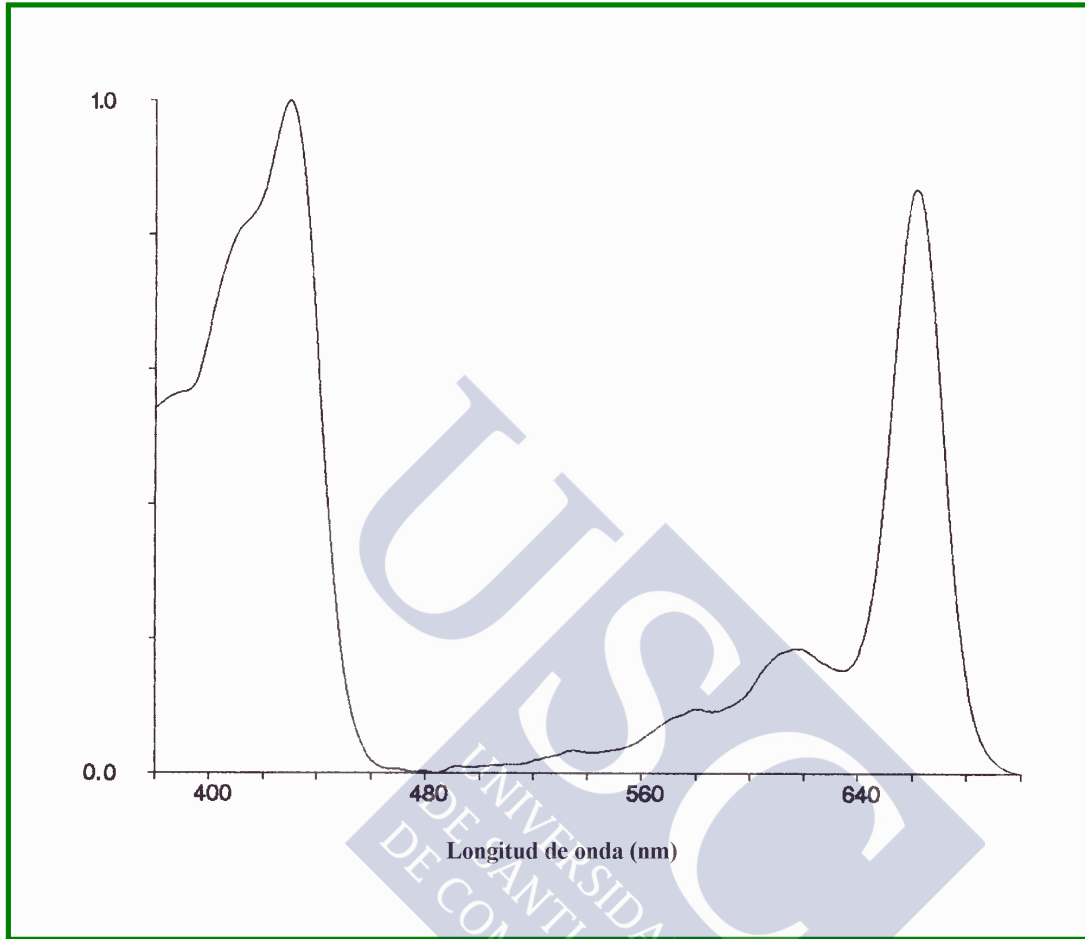
**Figura III.2.-** “Box and Whisker plot” de (a) clorofila *a*, (b) luteína, (c) clorofila *b*, (d) feofitina *b*, (e) feofitina *a* y (f)  $\beta$ -caroteno. (Eje y en mg/100 g mf).



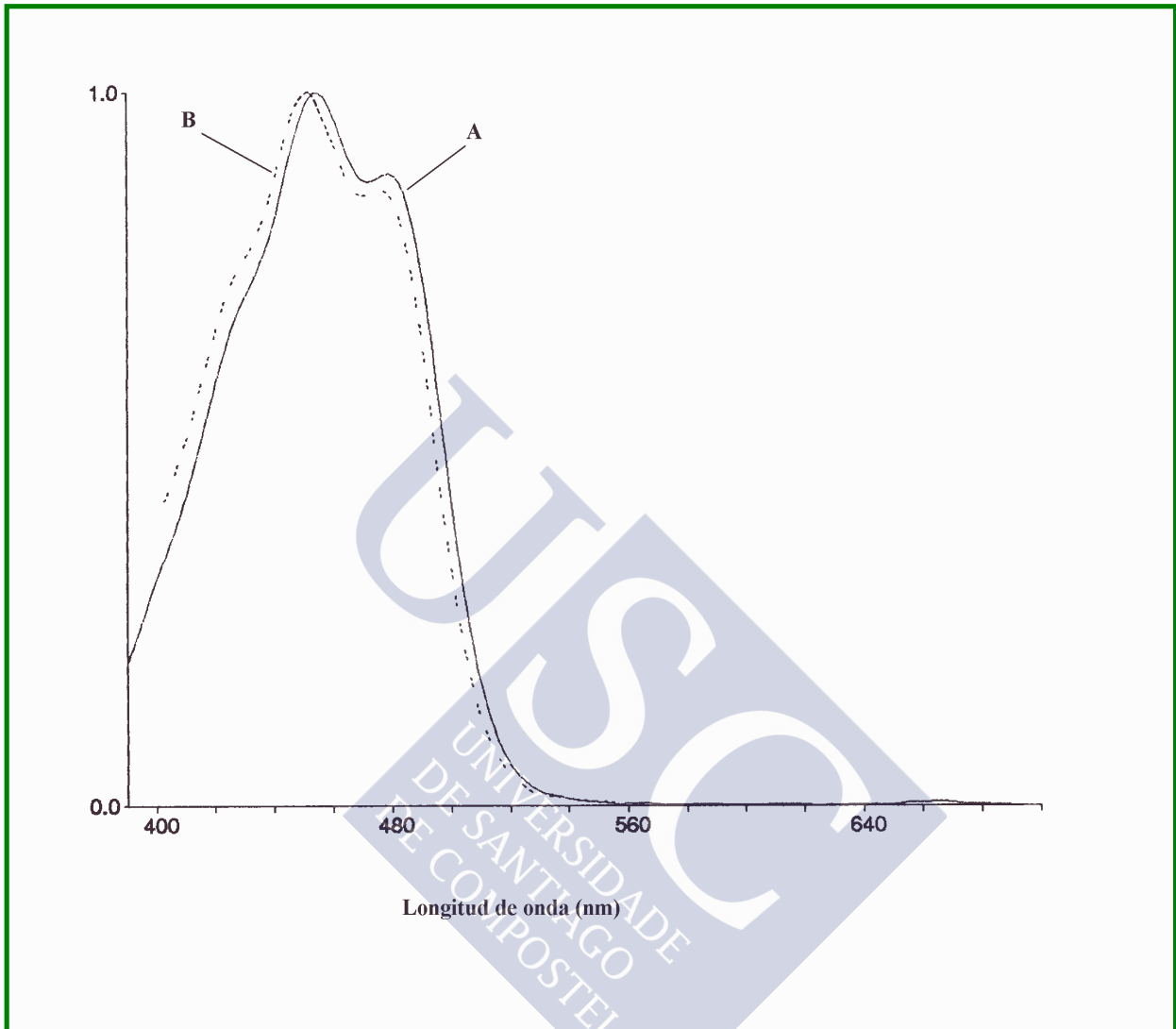
**Figura III.3.-** Representación de los efectos de varios tratamientos culinarios (eje x) en el contenido total de pigmentos –mg/100 g mf- en judías verdes (área de los círculos y eje y) y el contenido individual de pigmentos (área de los sectores).



**Figura III.4.-** Cromatograma en tres dimensiones de pigmentos de judías crudas.



**Figura III.5.-** Espectro de absorción de la clorofila *a* en una muestra de judías cocidas en olla.



**Figura III.6.-** Comparación de espectros de  $\beta$ -caroteno de una muestra de judías (A) y un patrón (B).

### III.6.- Referencias bibliográficas

1. Belitz, H. D. and Grosch, W. (1988) Química de los Alimentos, Capítulo 17. Acribia, Zaragoza, España.
2. Buss, D., Tyler, H., Barber S. and Crawley, H. (1987) Manual of Nutrition, p. 46. Acribia, Zaragoza, España.
3. Chen, B. H., Pene, H. Y. And Chen, H. E. (1995) Changes of carotenoids, color and vitamin A contents during processing of carrot juice. *J. Agric. Food Chem.* 43, 1912-1918.
4. Daood, H. G., Czincotal, B., Hoschke, A. and Biacs, P. (1989) High performance liquid chromatography of chlorophylls and carotenoids from vegetables. *J. Chromatogr.* 472, 296-302.
5. De la Cruz-García, C., González-Castro, M. J., Oruña-Concha, M. J., López-Hernández, J., Simal-Lozano, J. and Simal-Gándara, J. (1999) The effects of various culinary treatments on the organic acid content of green beans (*Phaseolus vulgaris*, L.) *Deut. Lebensm. Rundsch.* 95, 323-326.
6. Granado, F., Olmedilla, B., Blanco, I. and Rojas Hidalgo, E. (1992) Carotenid composition in raw and cooked Spanish vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 40, 2135-2140.
7. Harris, R. W. C., Key, T. J. A., Sillocks, D. B. And Wald, N. J. (1991) A case-control study of dietary carotene in men with lung cancer and in men with other epithelial cancers. *Nutr. Cancer* 15, 63-68.
8. Heinonen, M. I., Ollilainen, V., Linkola, E. K., Varo, P. T. and Koivistoinen, P. E. (1989) Carotenoids in Finnish foods: vegetables, fruits and berries. *J. Agric. Food Chem.* 37, 655-659.
9. Khachik, F. and Beecher, G. R. (1987) Application of a C-45- $\beta$ -carotene as an internal standard for the quantification of carotenoids in yellow/orange vegetables by liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 35, 732-738.
10. López-Hernández, J., Vázquez-Odériz, M. L., Romero-Rodríguez, A. and Simal-Lozano, J. (1993) HPLC determination of major pigments in the bean *Phaseolus vulgaris*. *J. Agric. Food Chem.* 41, 1613-1615.

11. Moreiras, O., Carbajal, A. and Perea del Pino, I. M. (1988) Evolución de los hábitos alimentarios en España. (1987) Capítulo 3. Secretaría General Técnica, Madrid, España.
12. Mozsic, G., Javor, T., Toth, G., Zsoldos, T. and Tigyy, A. (1984) Interrelationships between the gastric citoprotective effects of vitamin A and  $\beta$ -carotene and the gastric mucosal superoxide



**IV**

**EFFECTOS DE VARIOS TRATAMIENTOS CULINARIOS  
EN EL CONTENIDO DE ACIDOS ORGANICOS  
DE LA JUDIA VERDE (*Phaseolus vulgaris*, L.)**

**“Effects of various culinary treatments on the organic acid content of green beans  
(*Phaseolus vulgaris*, L.)”, Deustche Lebensmittel Rundschau, 1999, 95 (8):323-326**

#### **IV.1.- Resumen**

Se evaluaron los efectos que el escaldado y cuatro tratamientos culinarios (hervido a vapor, en olla tapada, a presión y con microondas) tienen sobre el contenido en vitamina C y sobre los ácidos oxálico, málico y fumárico. La determinación de los ácidos orgánicos en judías frescas y tratadas se realiza mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (columna ODS2) con detector UV, y una solución de ácido metafosfórico (pH 2.2) como eluyente. El cocinado a vapor y a presión de las judías verdes causan pérdidas de ácidos orgánicos significativamente menores que cociéndolas en olla tapada, y en general también menores que con el cocinado con microondas. Por esto se recomienda el cocinado a vapor o a presión frente al método tradicional de cocerlas en olla tapada.

#### **IV.2.- Introducción**

La elaboración y cocinado de alimentos altera inevitablemente su composición pudiendo también alterar sus propiedades organolépticas y nutritivas. De entre todos los componentes más sensibles a estos efectos están los ácidos orgánicos, en especial el ácido ascórbico (Vit. C), cuyo déficit puede tener consecuencias serias en el hombre al no poder biosintetizarla por lo que debe de incluirla en su dieta. La vitamina C está casi exclusivamente en las frutas y vegetales, variando la cantidad presente según la especie y la variedad (Morrison, M.H. 1975), según factores como el estado de desarrollo (Primo Yúfera, E. 1979), tamaño (Selman, J.D. and Rolfe, E.J 1982), tiempo transcurrido desde la recolección hasta el procesado (Kozar, S., y col., 1988), y de factores locales como el clima (Saccani, G., y col., 1995). La figura IV.6 muestra el espectro ultravioleta de la vitamina C. De los otros ácidos orgánicos encontrados en las frutas y vegetales los más abundantes son, cítrico, málico y quínico. Los vegetales verdes tienen en general un bajo contenido en ácidos orgánicos, de cualquier modo estos componentes merecen su estudio por su importancia como agentes antimicrobianos y aromáticos (Picha, D. H. 1985).

Mientras numerosos estudios se han realizado midiendo el contenido en Vit. C en alimentos vegetales (Mueller, H.R. 1990), muy pocos han estudiado al resto de los ácidos orgánicos. En este trabajo se examinan los efectos de cuatro tratamientos culinarios (hervido a vapor, en olla tapada, a presión y con microondas) en el contenido de ácido ascórbico, málico, oxálico y fumárico de judías verdes frescas. Los efectos del escaldado fueron también estudiados pero dado que no es un tratamiento culinario estrictamente hablando si no más bien un tratamiento usado antes de la conservación (Belitz, H.D. and Grosch, W., 1988) se optó por no incluirlo. Los ácidos orgánicos fueron determinados simultáneamente por HPLC con detector de barrido UV (Vázquez-Odériz, M. L., y col., 1994). El ácido cítrico no pudo determinarse debido al solapamiento de este pico con uno de los productos formados durante el cocinado.

### **IV.3.- Material y Métodos.**

#### IV.3.1.- Muestras de Judías.

Las judías verdes frescas (*Phaseolus vulgaris*, L.) se adquirieron en un único establecimiento a primera hora de la mañana de cada día de análisis, y pueden ser consideradas de poseer similares características de frescura a cualquier otra disponible al consumidor. Se analizaron un total de nueve lotes.

#### IV.3.2.- Procesado

En cada día de compra se obtuvieron 6 lotes representativos de judías troceadas de 20 g. Se trocearon manualmente para así evitar la posible oxidación de la Vit. C al contacto con el metal de un cuchillo, dado que cataliza la oxidación de la Vit. C. Un lote se apartó para el análisis en crudo y los restantes fueron sometidos a los siguientes tratamientos:

- 1) escaldado en 250 mL de agua durante 4 min.
- 2) hervido con tapa en 250 mL de agua durante 30 min.
- 3) cocido al vapor durante 40 min.
- 4) cocido a presión en 150 mL de agua durante 5 min.
- 5) cocido a horno de microondas en 100 mL de agua durante 5 min.

Todos los tratamientos usaron agua corriente de la traída.

#### IV.3.3.- Análisis por HPLC

Los ácidos L-ascórbico, L-málico y metafosfórico se obtuvieron de Merck (La Coruña, España), y el fumárico y quínico de Sigma (Madrid, España). El ácido oxálico se obtuvo de Panreac (Barcelona, España).

Todos los análisis se llevaron a cabo por duplicado en tejido vegetal homogeneizado usando mortero. Los ácidos orgánicos fueron extraídos por el método sugerido por Vázquez-Odériz y col. (1994). Resumiendo, 20g de homogeneizado fueron agitados mecánicamente en 60 mL de una solución al 4,5% (p/v) de ácido metafosfórico durante 15 min., la mezcla fue filtrada (Whatman N° 541), y el filtrado diluido hasta completar un volumen de 100 mL con agua de grado HPLC. Se tomó una alícuota y, previa a su inyección en la columna, se filtró a través de un filtro Millipore de 0.45  $\mu$ m.

El equipo de HPLC consiste en un cromatógrafo Spectra-Physics equipado con una bomba ternaria SP8800, bloque de inyección Rheodyne con un bucle de 20  $\mu$ L y detector de barrido UV-VIS controlado por un “software” Spectra Focus (Spectra Physics, Madrid, España) instalado en un PC Pentium. La columna usada fue una Tracer ODS2 (4.6 mm i.d. X 25 cm) con tamaño de partícula de 5  $\mu$ m (Theknochroma, Vigo, España) y con una precolumna (Theknochroma TR-015326) empacada con el mismo relleno. Como fase móvil se usó agua de grado HPLC llevada a pH 2.2 con ácido metafosfórico siendo el flujo de 0.5 mL/min. Las longitudes de onda escogidas para el análisis fueron 215 nm para málico y fumárico y 245 nm para el oxálico y la Vit. C. En la Figura IV.1 se muestra un cromatograma típico del perfil de ácidos orgánicos en la judía verde.

Para la identificación se usó, al igual que con los pigmentos, un “software” más avanzado (PC 1000) de Thermo Separation Products (California, EEUU), que permite crear una biblioteca de espectros. La figura IV.7 muestra la identificación de la vitamina C por comparación de espectros con los recogidos para la biblioteca de sus respectivos patrones. Este “software” permite también realizar de forma inmediata el SST, chequeando continuamente la eficacia de la columna. Además permite la representación en 3D de los cromatogramas (Figura IV.5). También se usaron los tiempos de retención de los patrones elaborados cada día de muestreo. Para la cuantificación se utilizó el método de patrón externo. La curva de calibración se elaboró cubriendo el rango de

concentración de los ácidos orgánicos en las muestras. Estos patrones se prepararon disolviendo convenientemente una solución madre de los ácidos orgánicos en ácido metafosfórico al 4.5% (p/v) con este mismo solvente.

#### **IV.4.- Resultados y discusión.**

Los resultados de los análisis están recogidos en las tablas 1 y 2. La precisión del método (RSD %) para la determinación de los ácidos orgánicos se encuentra en un rango comprendido entre 0.8-1.7 %. Los datos para las judías cocinadas (Tabla IV.2) se presentan como porcentajes (%) tomando como referencia 100% el valor contenido en las judías escaldadas dado que crudas se encuentran (sobre todo la Vit. C) expuestas a la transformación de las enzimas. En las judías escaldadas y cocidas estas enzimas se encuentran inactivadas por los tratamientos térmicos.

Se utilizó un análisis explorativo mediante el test de “box-and-whisker plot” (Fig. IV.2) para detectar valores fuera de los valores medios (“outliers”) y valores extremadamente alejados (“extreme values”), éstos aparecen marcados en cursiva en la Tabla IV.2. Los criterios seguidos en este método de análisis gráfico se ilustran en la Figura IV.3. Los valores de las medianas (menos susceptibles que la media a los valores fuera de márgenes) se representan en la Figura IV.4. Esta figura muestra a) que las mayores pérdidas de ácidos orgánicos corresponden a las judías hervidas en olla y, en menor medida, a las hervidas con horno microondas; b) que la proporción individual de cada ácido orgánico varía poco con independencia del proceso de cocción utilizado; y que la eficacia para conservar la Vit. C sigue el siguiente orden: Vapor>Presión>Microondas>Olla tradicional.

Los efectos que varios tratamientos culinarios tienen en el contenido de ácidos orgánicos de las judías se analizó estadísticamente, aplicando el test de Kruskal-Wallis a los valores en porcentaje del contenido en ácidos orgánicos de las judías cocinadas, excluyendo los valores fuera de márgenes (“outliers” y “extreme values”). Los datos aparecen en la Figura IV.2. Esto indica que hay diferencias significativas entre el contenido de varias de las judías cocidas ( $p \leq 0.05$ ; 3 grados de libertad;  $n = 31$  para el ácido oxálico, 34 para el málico, 30 para el ascórbico, y 34 para el fumárico). Para

establecer dónde recaen estas diferencias, se aplica el test U de Mann-Withney a los datos de la Tabla IV.2. Esto muestra:

- a) que no existen diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre el contenido en ácidos orgánicos de judías cocidas a vapor y en olla a presión.
- b) que esos dos últimos métodos citados poseen significativamente mayores contenidos en todos los ácidos orgánicos que las judías cocidas en olla cubierta ( $p \leq 0.05$ ).
- c) que las judías cocidas a vapor contienen valores más altos de málico, ascórbico y fumárico que las cocidas con microondas ( $p \leq 0.05$ ).
- d) que las judías cocidas a presión presentan contenidos en málico y fumárico mayores que los de las cocidas con microondas ( $p \leq 0.05$ ).
- e) que las judías cocidas con microondas contienen valores mayores de ácido ascórbico que las cocinadas en olla cubierta ( $p \leq 0.05$ ).

El hecho de que las judías cocinadas en olla tapada posean en general los contenidos más bajos de ácidos orgánicos es atribuible al mayor volumen de agua requerida para su cocción (500 mL) y al mayor tiempo empleado (30 min.), lo que incrementa las pérdidas de ácidos orgánicos desde las judías por difusión y degradación térmica respectivamente. Las altas pérdidas de ácidos orgánicos en las judías cocidas con microondas probablemente no se pueden atribuir a estos efectos, dado que el volumen de agua es mucho menor (100 mL) y el tiempo de cocinado fue sólo de 5 min. Más bien estos cambios son atribuibles a la alta temperatura inducida a las judías por este tratamiento, lo que puede incrementar la degradación térmica. El cocinado al vapor se muestra como el más efectivo en la conservación de los ácidos orgánicos de las judías, lo que es debido a la ausencia de contacto directo entre las judías y el agua de cocción, lo que reduce de forma efectiva las pérdidas por difusión.

#### IV.5.- Tablas y Figuras

**Tabla IV.1.-** Contenido en ácidos orgánicos (mg/100 g mf) de judías crudas y cocinadas.

**Tabla IV.2.-** Contenido en ácidos orgánicos de judías verdes cocidas expresado como %, tomando 100% el valor de las judías escaldadas.

**Figura IV.1.-** Cromatograma de judías frescas crudas, mostrando los picos del ácido oxálico (1), ácido málico (2), vitamina C (3) y ácido fumárico (4).

**Figura IV.2.-** “Box and Whisker Plot” de los resultados de la tabla 2.

**Figura IV.3.-** Esquema explicativo del funcionamiento gráfico del test de “Box and Whisker Plot”.

**Figura IV.4.-** Representación que compara los efectos de varios tratamientos culinarios sobre el contenido de vitamina C (eje y) y el valor total e individual del contenido de ácidos orgánicos (áreas de los círculos y los sectores, respectivamente).

**Figura IV.5.-** Representación en 3D de ácidos orgánicos de judías verdes.

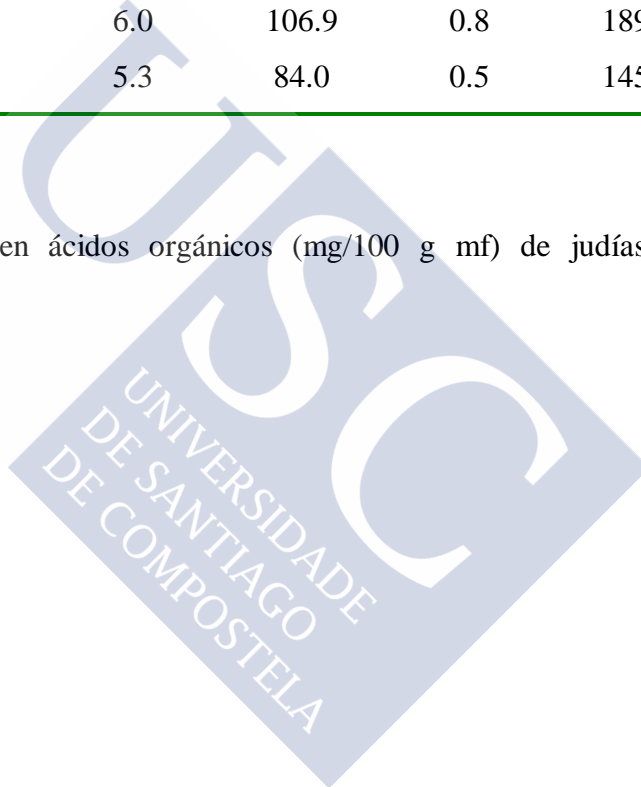
**Figura IV.6.-** Espectro ultravioleta de la vitamina C.

**Figura IV.7.-** Comparación de espectros (búsqueda en biblioteca propia).

UNIVERSIDADE  
DE SANTIAGO  
DE COMPOSTELA

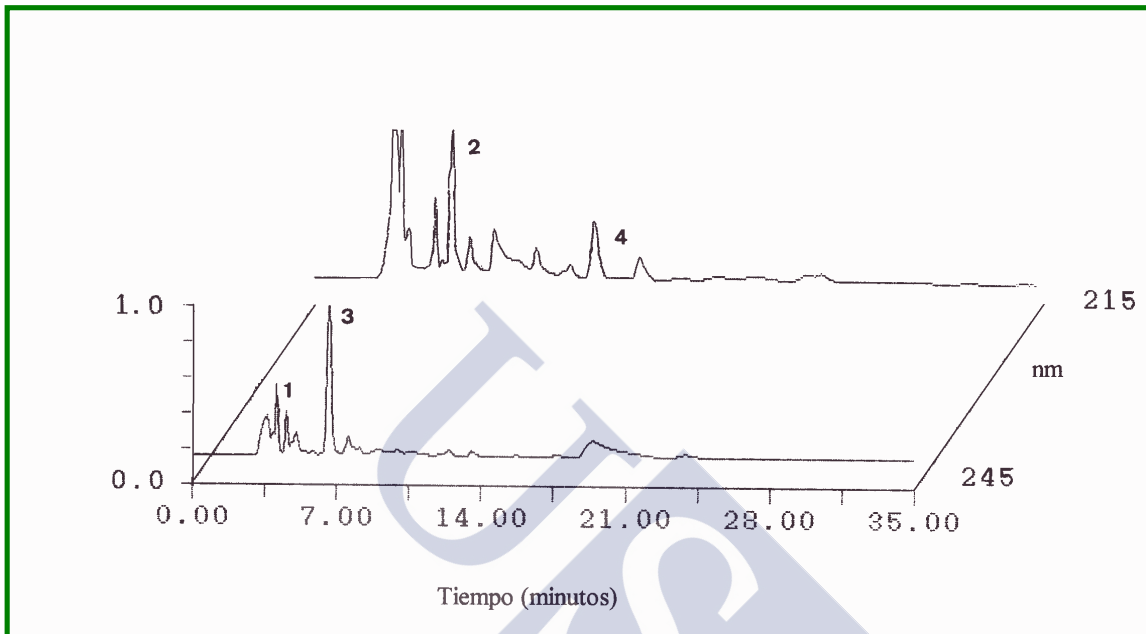
	<b>Oxálico</b>	<b>Vitamina C</b>	<b>Málico</b>	<b>Fumárico</b>	<b>Total</b>
<b>Olla tapada</b>	49.2	3.6	67.2	0.4	120.4
<b>Vapor</b>	65.6	7.4	105.4	0.8	179.3
<b>Presión</b>	75.2	6.0	106.9	0.8	189.0
<b>Microondas</b>	56.1	5.3	84.0	0.5	145.9

**Tabla IV.1.-** Contenido en ácidos orgánicos (mg/100 g mf) de judías crudas y cocinadas.

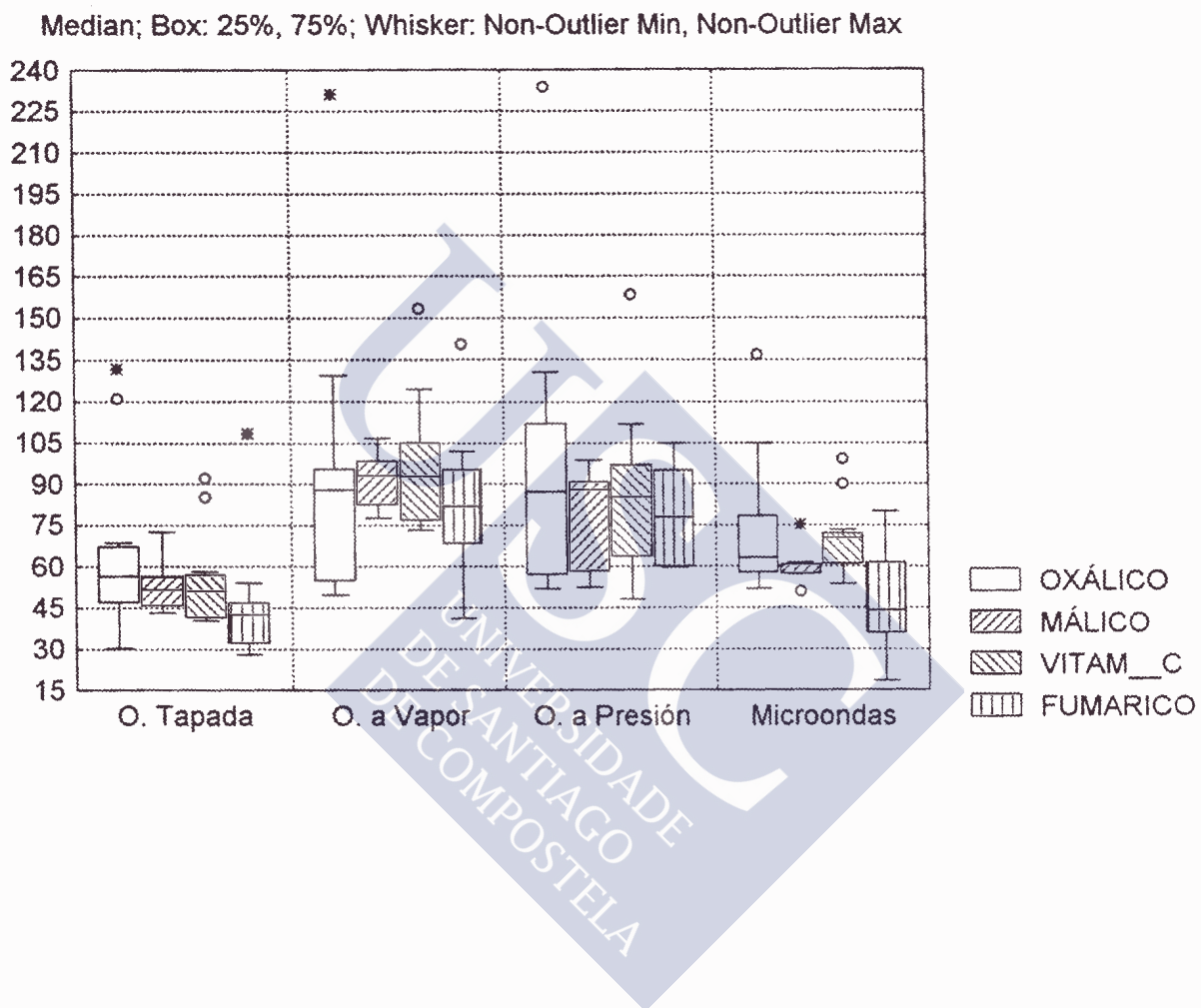


Tratamiento Culinario	Oxálico	Málico	Vitamina C	Fumárico
<b>Olla tapada</b>	56.3	48.6	50.3	41.1
	55.7	43.4	40.4	32
	121.2*	53.2	51	50
	30.3	46.3	56.7	41
	132	59.8	41.3	27.9
	46.9	51.5	46.5	43.7
	65.8	72.4	57.6	54.1
	51.9	45.8	92.1	42.2
	68.8	72.1	85.3*	108.5*
<b>Vapor</b>	93.7	83.7	76.5	95.4
	97.4	91.7	73.3	68.1
	129.6	106.3	105.9	80.7
	49.9	82.3	153.2*	75.9
	231.1*	93.9	92.6	41.1
	54.9	93	87	81.7
	87.7	103.2	104.3	95.5
	69.7	77.5	124.5	101.9
	75.5	106.9	86.5	140.5*
<b>Presión</b>	86.9	52.5	73.2	77.6
	120.3	70.1	48.1	59.7
	130.8	93.01	86.6	87.7
	51.9	87.7	158.4*	102.5
	233.9*	95.2	63.3	74.9
	103.6	88.4	85	103.9
	79.8	82.8	80.3	73.4
	57	58.2	11.7	59.8
	82.6	98.6	107.2	104.9
<b>Microondas</b>	77.2	59.3	68.8	64.1
	59.9	57.9	53.6	43.2
	104.9	60.8	73.3	59.1
	61.2	60.9	99.1*	43.7
	136.9*	75.2*	70.6	18.4
	52	61.6	64.2	78.1
	79.4	57.2	60.7	35.6
	57.7	50.9	89.9*	38
	63.1	60.5	70.1	80.1

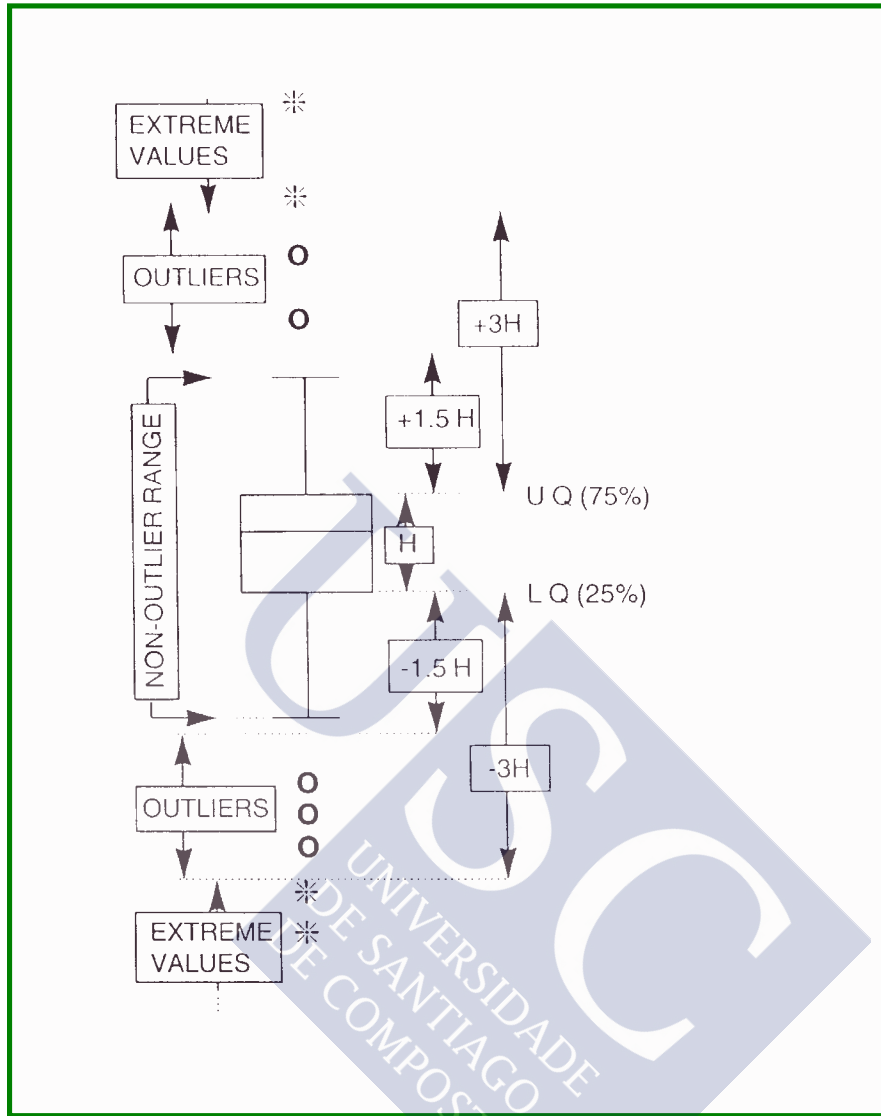
**Tabla IV.2.-** Contenido en ácidos orgánicos de judías verdes cocidas expresado como %, tomando 100% el valor de las judías escaldadas. (\* “outliers” y valores extremos).



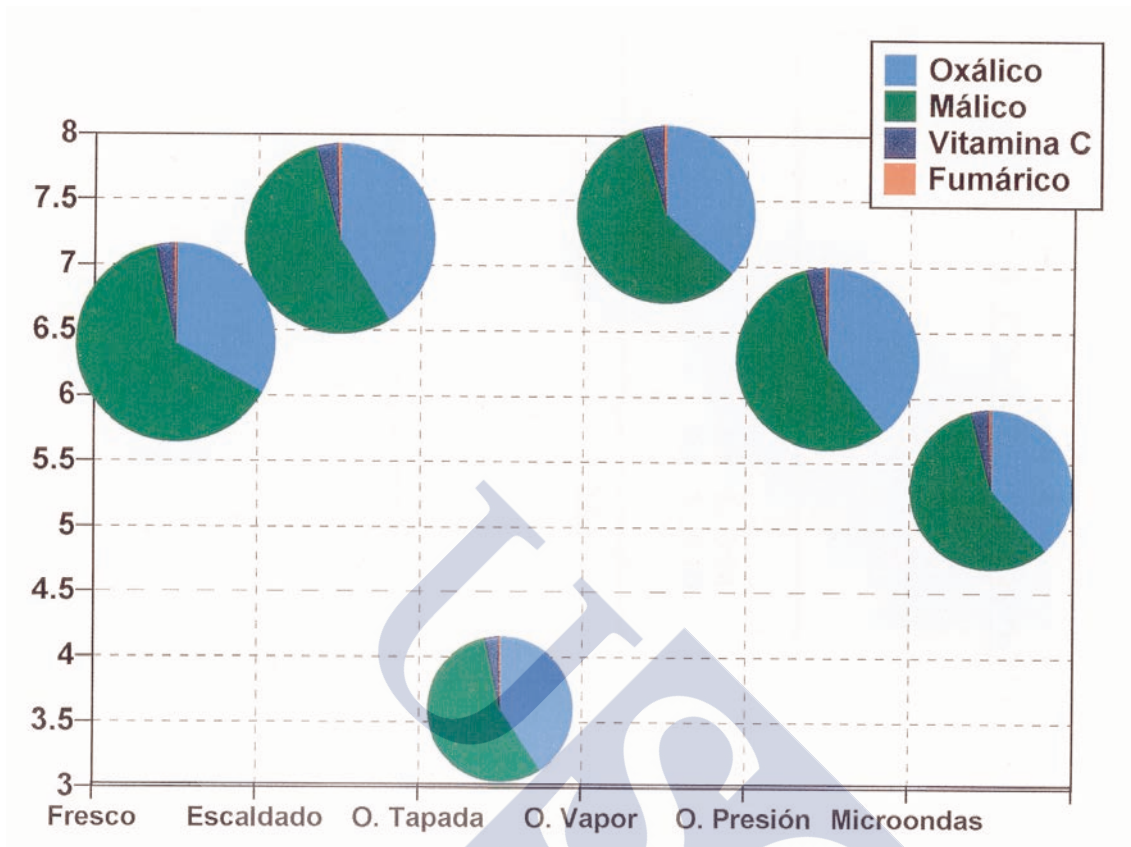
**Figura IV.1.-** Cromatograma de judías frescas crudas, mostrando los picos del ácido oxálico (1), ácido málico (2), vitamina C (3) y ácido fumárico (4).



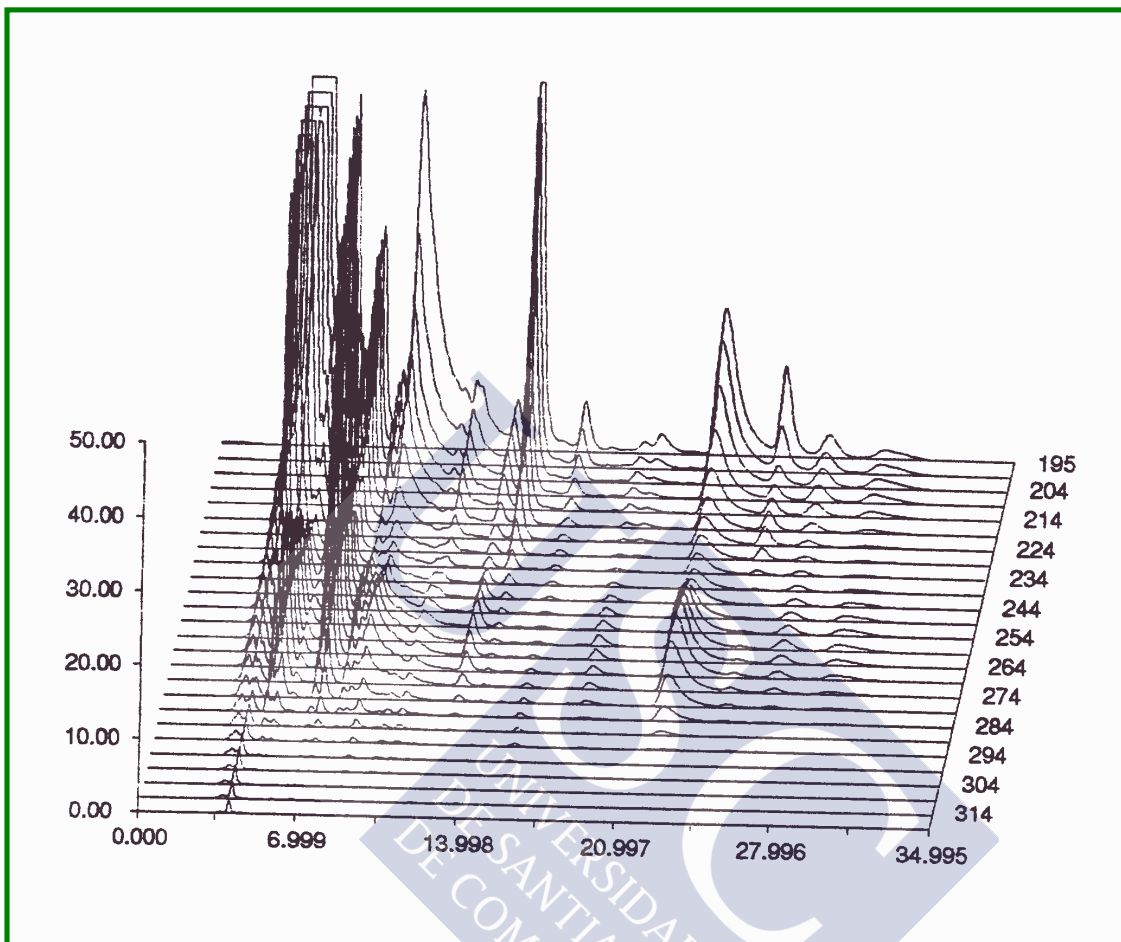
**Figura IV.2.-** “Box and Whisker Plot” de los resultados de la Tabla 2.



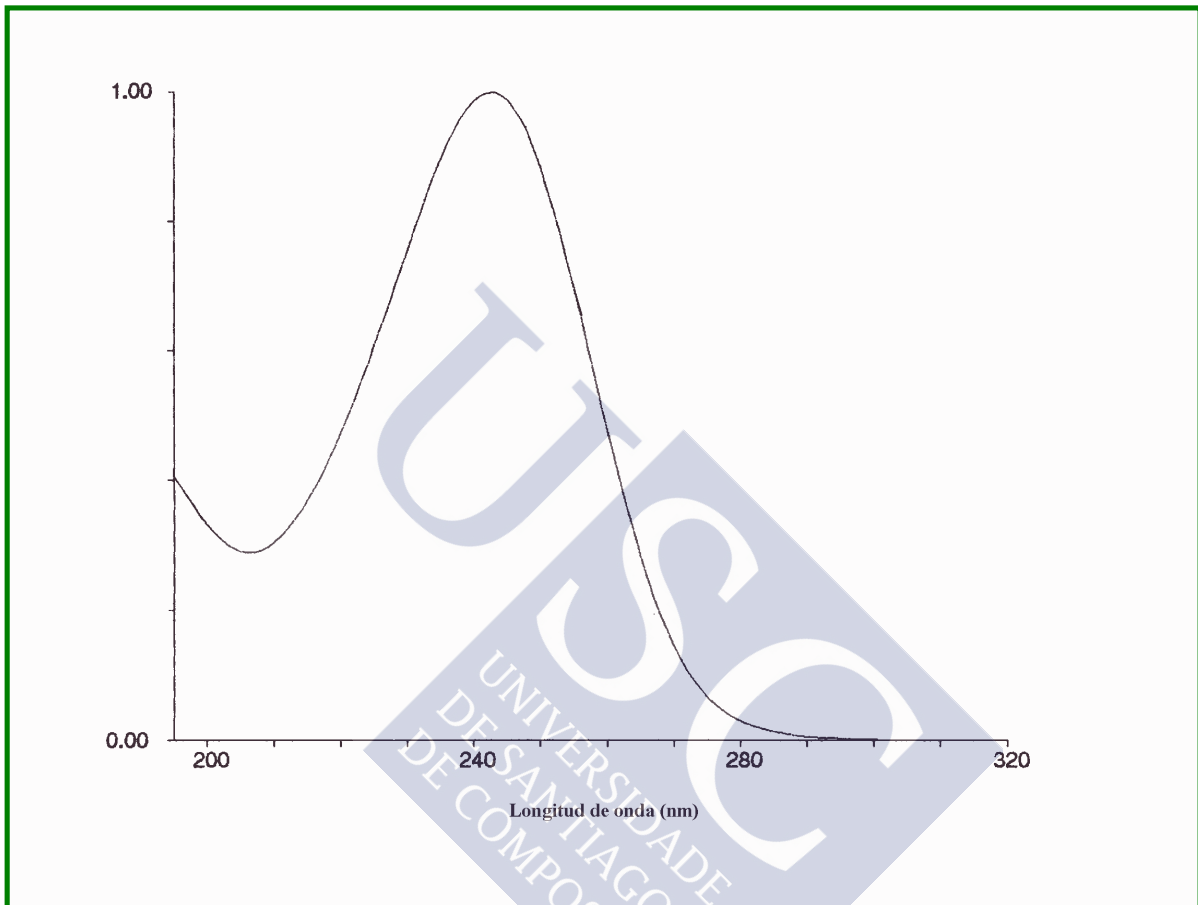
**Figura IV.3.-** Esquema explicativo del funcionamiento gráfico del test de “Box and Whisker Plot”.



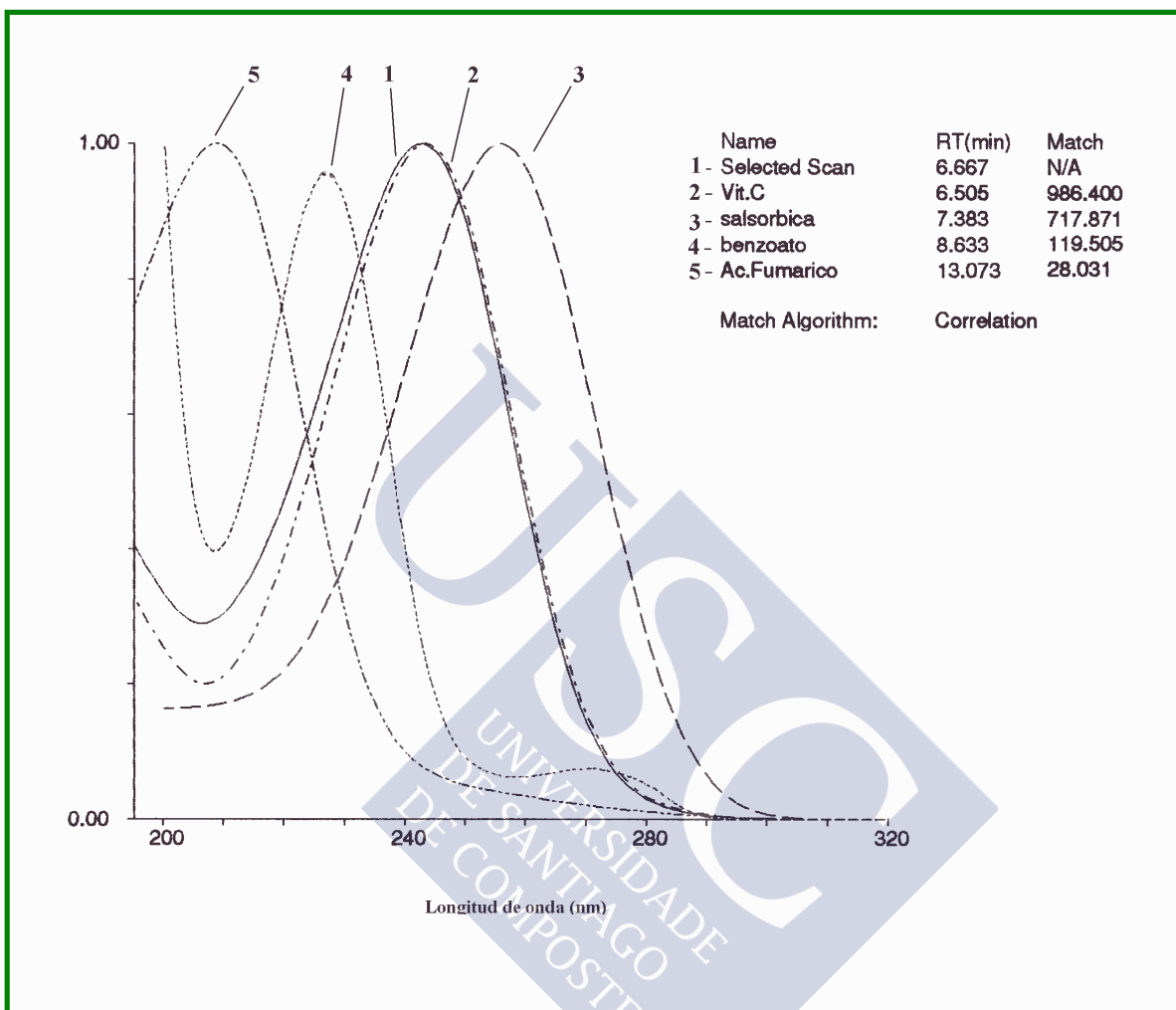
**Figura IV.4.-** Representación que compara los efectos de varios tratamientos culinarios sobre el contenido de vitamina C, mg/100 g mf (eje y) y el valor total e individual del contenido de ácidos orgánicos (áreas de los círculos y los sectores, respectivamente).



**Figura IV.5.-** Representación en 3D de ácidos orgánicos de judías verdes.



**Figura IV.6.-** Espectro ultravioleta de la vitamina C.



**Figura IV.7.-** Comparación de espectros (búsqueda en biblioteca propia).

#### IV.6.- Referencias bibliográficas

1. Belitz, H.D. and Grosch, W. Química de los alimentos. 2<sup>nd</sup> edn. Acribia, Zaragoza, 1988, pp. 363-365, 612.
2. Kozar, S.; Bujak, A.; Eder-Trifunovic, J. and Knievald, G. Determination of L-ascorbic acid in fresh and processed fruit and vegetables by differential pulse polarography. *Fresenius Z Anal. Chem.* 1988, 329:760-763.
3. Morrison, M.H. The vitamin C content of quick frozen green beans. *J. Fd. Technol.* 1975, 10: 19-28.
4. Mueller, H.R. The effects of industrial handling on micronutrients. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 1990, 36: S47-S55.
5. Picha, D. H. Organic acid determination in sweet potatoes by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* 1985, 33, 743-745.
6. Primo Yúfera, E. Química Agrícola III: Alimentos. Vol. III. 1<sup>st</sup> edn. Alhambra, S.A., Madrid, 1979.
7. Saccani, G.; Gherardi, S; Trifirò, A.; Soresi Bordini, C.; Calza, M. and Freddi, C. Use of ion chromatography for the measurement of organic acids in fruit juices. *J. Chromatography A* 1995, 706:395-4033.
8. Selman, J.D. and Rolfe, E.J. Effects of water blanching on pea seeds. II. Changes in vitamin C content. *J. Food Technol.* 1982, 14:301-313.
9. Vázquez-Odériz, M. L.; Vázquez-Blanco, M. E.; López-Hernández, J.; Simal-Lozano, J. and Romero-Rodríguez, M. A. Determination of organic acids and vitamin C in green beans by HPLC with simultaneous detection at two UV wavelengths. *JAOAC Int.* 1994, 77(4):1056-1059.

V

**EFFECTOS DE DISTINTOS TRATAMIENTOS CULINARIOS EN EL  
CONTENIDO DE AMINOACIDOS DE JUDIAS VERDES**

**“Effects of various culinary treatments on the amino acid content of green beans”,  
Deutsche Lebensmittel Rundschau, 1999, 95 (12):507-510**

## V.1.- Resumen

Se ha estudiado el efecto de cuatro tratamientos culinarios diferentes (hervido a vapor, en olla tapada, a presión y con microondas) en el contenido de aminoácidos de las judías verdes (*Phaseolus vulgaris*, L.). Las proteínas se hidrolizaron con ácido clorhídrico y los aminoácidos fueron derivatizados con fenil-isotiocianato, separados en una columna C18 mediante HPLC y determinados con un detector Ultravioleta. Las judías cocidas a vapor y con microondas no mostraron cambios en el contenido de aminoácidos, mientras el hervido de judías en olla tapada y a presión causa importantes pérdidas de aminoácidos respecto a la muestra cruda.

## V.2.- Introducción

El valor nutritivo de las proteínas depende principalmente de su composición en aminoácidos, especialmente de su contenido en los ocho aminoácidos esenciales. Además de su importancia en la dieta, las proteínas también influyen en las propiedades organolépticas de los alimentos: las proteínas afectan a la textura del alimento, y los péptidos pequeños y aminoácidos contribuyen al sabor y aroma, y a los tres les afectan reacciones térmicas y/o enzimáticas que durante la preparación de los alimentos y su almacenamiento generan compuestos aromáticos y coloreados (Belitz and Grosch, 1988).

Durante la preparación y almacenamiento de los alimentos las uniones de los aminoácidos en las proteínas pueden reaccionar químicamente entre ellos o con otras moléculas presentes en el alimento (Baudi Dergal, 1981). Las reacciones que rodean a los aminoácidos durante el cocinado y el procesado de los alimentos son de gran importancia en la producción del aroma (Coleman, W. M., y col., 1994), sabor (Yang, S. y col., 1984), y color (Kawashima, K. y col., 1996), aún cuando estas reacciones pueden ir acompañadas de una reducción de su valor nutritivo (Sher, B. y col., 1989).

En este trabajo examinamos los efectos de cuatro tratamientos culinarios (hervido a vapor, en olla tapada, a presión y con microondas) en el contenido de aminoácidos de judías verdes. Las vainas enteras de las judías verdes (*Phaseolus vulgaris*, L.) son frutos

usados comúnmente como alimento que suelen comerse cocinados, bien calientes como plato principal bien fríos en ensalada.

Los aminoácidos se determinaron mediante un método de cromatografía líquida ultravioleta de alta resolución desarrollado en nuestro laboratorio (González Castro, M. J. y col., 1997).

### **V.3.- Material y Métodos**

#### V.3.1.- Muestras

Se adquirieron judías verdes frescas (*Phaseolus vulgaris*, L.) (500 g) en un local de Santiago de Compostela, y se pueden considerar con igual frescura y calidad a cualquier otra disponible al consumidor.

#### V.3.2.- Procesado

Se eliminaron los tallos de las judías y éstas fueron troceadas uniformemente. Las judías ya troceadas fueron divididas en 5 lotes de 100 g. Uno de los lotes fue triturado y analizado, cada uno de los cuatro restantes fue inmediatamente sometido a uno de los siguientes tratamientos culinarios:

- 1.- hervido en una olla cubierta con 250 mL de agua durante 30 minutos.
- 2.- hervido a vapor en una olla cubierta durante 40 minutos.
- 3.- hervido a presión con 200 mL de agua durante 5 minutos tras la primera salida de vapor.
- 4.- hervido en horno a microondas con 100 mL de agua durante 5 minutos.

Todos los tratamientos usaron el menor volumen de agua y el menor tiempo posible de cocción para alcanzar un grado similar de ternura con una palatabilidad adecuada, siendo el obtenido con microondas el producto menos tierno dadas las características térmicas de las microondas. Todos los análisis se realizaron por duplicado.

### V.3.3.- Reactivos.

Estándares de aminoácidos: L-alanina (Ala), L-arginina (Arg), L-ácido aspártico (Asp), L-ácido glutámico (Glu), L-glicina (Gly), L-histidina (His), L-isoleucina (Ile), L-leucina (Leu), L-lisina (Lys), L-metionina (Met), L-fenilalanina (Phe), L-hidroxiprolina (H-Pro), L-prolina (Pro), L-serina (Ser), L-treonina (Thr), L-tirosina (Tyr), L-valina (Val) y el reactivo de derivatización, fenil isotiocianato (PITC) y la trietilamina se obtuvieron de Sigma Chemical (Madrid, España). El acetonitrilo y metanol de grado HPLC se obtuvieron de Scharlau (Barcelona, España). El acetato de sodio trihidratado y el fosfato de sodio fueron reactivos de grado de Merck (La Coruña, España) y el ácido clorhídrico de Normasolv (Barcelona, España).

### V.3.4.- Equipo de Cromatografía:

El equipo de cromatografía usado fue un HPLC compuesto por una bomba ternaria SP 8800, bloque de inyección Rheodyne (Cotati, CA) con bucle de 20  $\mu$ L, un termostizador de columnas SP 8792, un detector de barrido UV/VIS unido a un ordenador Pentium con "software" PC-1000 versión 3.0 (bomba, termostizador y detector de Thermo Separating Products, Fermont, California) sobre un sistema operativo IBM OS/2 Warp, versión 3.0. Para la separación se usó una columna Spheridorb C-18 de 250x4.6 mm con relleno de 5  $\mu$ m, de Sugelabor (Madrid, España).

### V.3.5.- Preparación de muestras y patrones:

Antes de derivatizar, se hidrolizaron las proteínas de las judías del siguiente modo: se pesó 1 g de la muestra homogeneizada en un tubo Pyrex con tapa de rosca de 16x125 mm, se añadieron 15 mL de HCl 6 N, se pasó corriente de nitrógeno y cerró inmediatamente, y se colocó en un horno a 110°C durante 24 horas. Tras la hidrólisis se filtró a vacío (Whatman nº 541, Maidstone, Inglaterra) el contenido del tubo para separar los sólidos. El filtrado se enrasó a 25 mL con agua, y una alícuota de esta solución se filtró a través de una membrana de 0.50  $\mu$ m de tamaño de poro (millipore, Madrid, España).

Se preparó una solución estándar conteniendo 1.25  $\mu$ mol/mL de cada uno de los aminoácidos en HCl 0.1 M.

### V.3.6.- Procedimiento de derivatización

Se pipetearon de la solución patrón (5, 10, 15, 20  $\mu\text{L}$ ), o 50  $\mu\text{L}$  si es la solución muestra, a un tubo de 10 x 5 mm y se secaron a vacío a 65°C. Al residuo se le añadieron 30  $\mu\text{L}$  del reactivo de derivatización 7:1:1:1 (v/v) metanol/agua/TEA/PITC y tras agitar se dejaron durante 20 min. a temperatura ambiente. Finalmente se eliminaron los solventes con corriente de nitrógeno, y el tubo se cerró y almacenó a 4°C hasta su análisis. Antes de su inyección se añadieron a cada tubo 150  $\mu\text{L}$  de diluyente constituido por una solución 5 mM de fosfato sódico con un 5% de acetonitrilo.

### V.3.7.- Procedimiento cromatográfico

La cromatografía se llevó a cabo a una temperatura constante de 30°C usando el siguiente gradiente: Fase A, un tampón acuoso preparado añadiendo 0.5 mL/L de TEA a una solución 0.14 M de acetato de sodio, y ajustándola a pH 6.0 con ácido acético glacial; y fase B, acetonitrilo/agua (60:40) (v/v). El programa del gradiente usado se muestra en la Tabla V.1.

## V.4.- Resultados y Discusión

La Figura V.1 muestra un cromatograma típico de los PTC-aminoácidos de una muestra de judía verde y la V.2 una representación tridimensional. Los aminoácidos mayoritarios en judía verde fueron el ácido aspártico (25 %) y el ácido glutámico (14 %). La figura V.3 muestra el espectro ultravioleta del ácido aspártico de una muestra de judías crudas.

El contenido en aminoácidos (mg/100 g mf) de judías verdes frescas y cocinadas aparece reflejado en la Tabla V.2. Respecto a los cambios que afectan a los aminoácidos durante el procesado térmico, debe de decirse que las variaciones entre el cocinado a vapor y con microondas no son importantes (la precisión del método para los aminoácidos, % RSD, oscila entre un 1.26 hasta un 3.98 %) (González-Castro y col., 1989), mientras el hervido en olla y a presión causa las mayores pérdidas de aminoácidos (una disminución del 17 % del contenido total de aminoácidos respecto a la muestra fresca).

El hecho de que las judías hervidas en olla tapada muestren esta disminución en el contenido total de aminoácidos puede explicarse por el gran volumen de agua (250 mL) y el tiempo de cocinado empleado (30 min.) necesario para este tipo de tratamiento culinario, que incrementa las pérdidas de aminoácidos por difusión y por la degradación térmica. Las pérdidas de aminoácidos en el cocinado a presión pueden ser atribuidas al volumen de agua empleada (200 mL) y a la alta temperatura aplicada a las judías con este tratamiento (112°-120°C).

La metionina fue el aminoácido que mostró una mayor disminución, especialmente en olla tapada. Esto puede explicarse por la reactividad del grupo tioéter de la metionina, que se encuentra relacionada con reacciones de óxido-reducción (Badui Dergal, 1981). La metionina puede también sufrir roturas térmicas produciendo compuestos sulfurados (Belitz y Grosch, 1988). Las pérdidas en ácido aspártico y glutámico pueden ser atribuidas a la alta reactividad de los grupos amino de la asparagina y la glutamina (asparagina y glutamina son convertidas por hidrólisis ácida en ácido aspártico y glutámico respectivamente) (Lehninger, 1981). La disminución de lisina se debe a su grupo  $\epsilon$ -amino. Los grupos amino de la asparagina, glutamina y lisina reaccionan muy fácilmente con azúcares reductores (química de Maillard); esta reacción es responsable de muchos de los aromas y colores de alimentos cocinados (Baltes, W., 1986).



## V.5.- Tablas y Figuras

**Tabla V.1.-** Programa del gradiente empleado en la separación de los PTC-aminoácidos.

**Tabla V.2.-** Cambios en el contenido de aminoácidos (mg/100g muestra fresca) de las judías verdes durante diferentes tratamientos térmicos.

**Figura V.1.-** Típico cromatograma mostrando los PTC-aminoácidos de judías verdes.

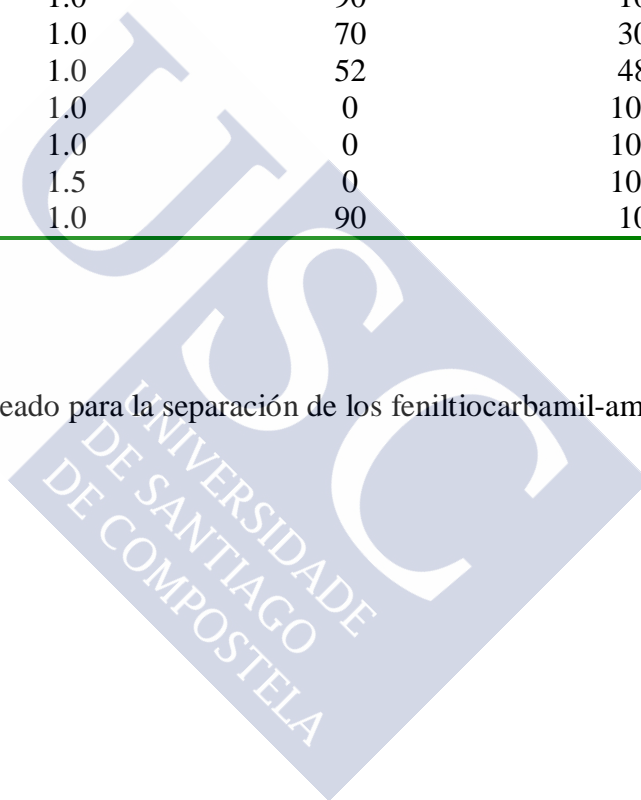
**Figura V.2.-** Representación en 3D de un cromatograma de judías verdes.

**Figura V.3.-** Espectro ultravioleta del PTC-derivado del ácido aspártico, correspondiente a una muestra de judías crudas.



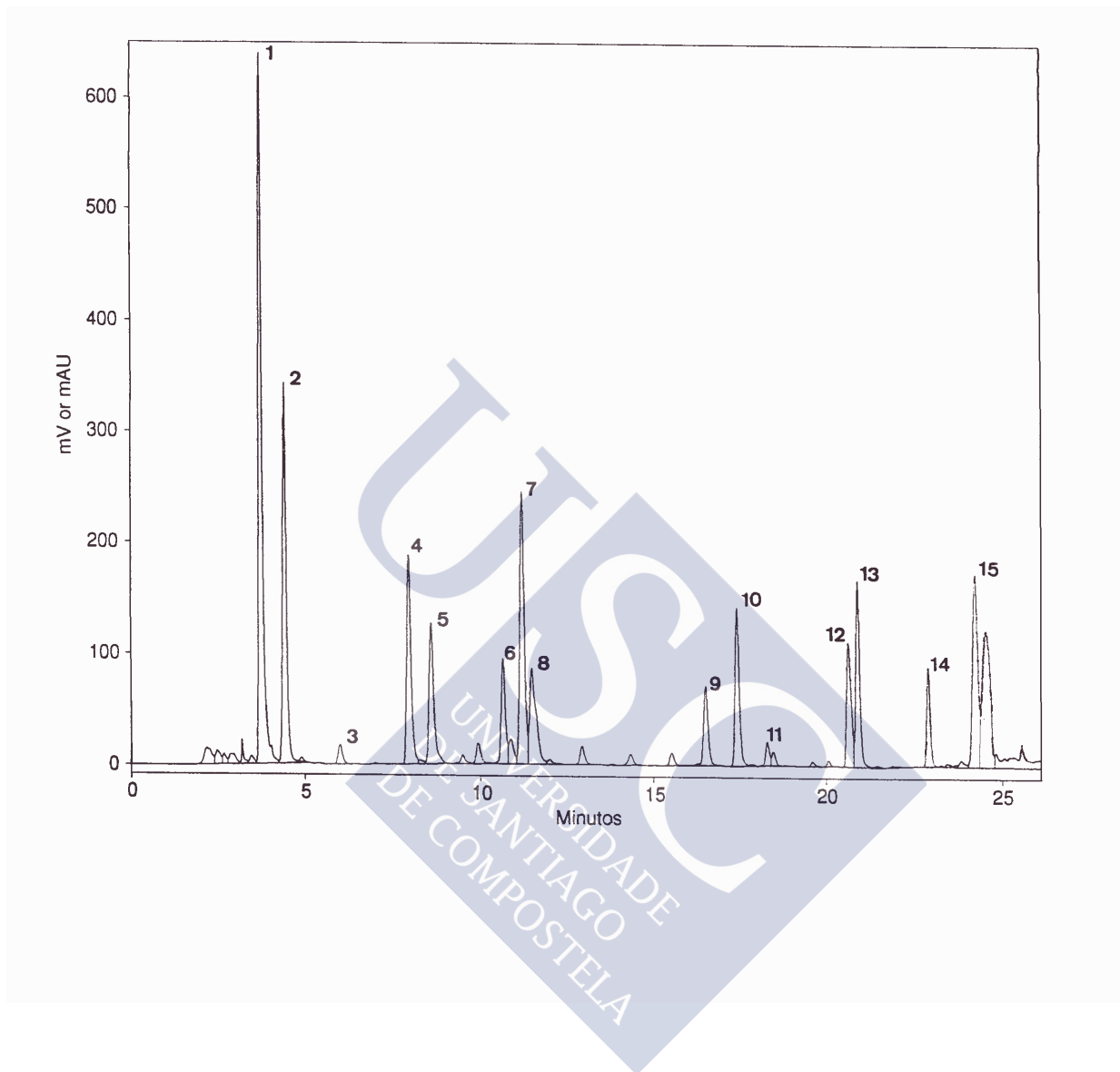
<b>Tiempo (min.)</b>	<b>Flujo (mL/min.)</b>	<b>%A</b>	<b>%B</b>
0	1.0	90	10
12.0	1.0	70	30
20.0	1.0	52	48
22.0	1.0	0	100
24.0	1.0	0	100
30.0	1.5	0	100
37.0	1.0	90	10

**Tabla V.1.** Gradiente empleado para la separación de los feniltiocarbamil-aminoácidos.

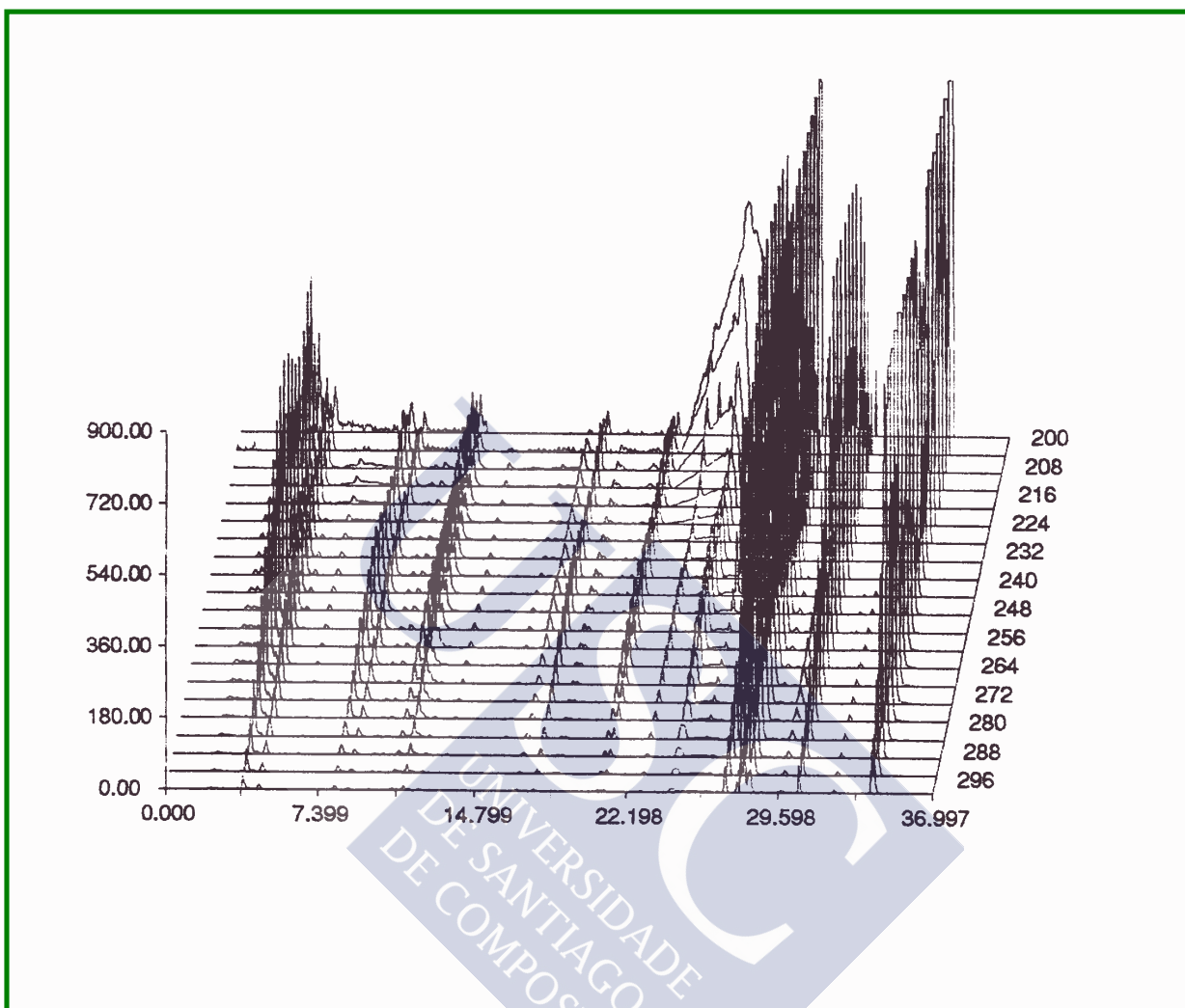


<b>Aminoácido</b>	<b>Crudo</b>	<b>Vapor</b>	<b>Microondas</b>	<b>Olla tapada</b>	<b>Presión</b>
<b>Asp</b>	364.8	326.1	340.3	249.8	294.8
<b>Glu</b>	197.9	217.0	206.4	156.3	141.9
<b>H-Pro</b>	8.7	8.5	10.3	7.0	7.8
<b>Ser</b>	110.8	104.2	99.0	82.6	85.8
<b>Gly</b>	70.2	71.8	74.1	64.5	60.8
<b>His</b>	12.3	12.0	11.9	10.7	10.2
<b>Arg</b>	24.7	27.9	24.8	19.8	19.7
<b>Thr+Ala+Pro</b>	209.2	221.8	241.5	211.4	208.1
<b>Tyr</b>	42.9	45.7	41.4	36.8	35.2
<b>Val</b>	65.8	71.4	71.7	51.6	57.5
<b>Met</b>	7.0	9.4	7.6	4.0	4.7
<b>Ile</b>	69.1	65.9	65.8	58.2	53.2
<b>Leu</b>	84.7	89.6	86.8	77.5	70.6
<b>Phe</b>	52.6	59.5	54.8	48.9	45.7
<b>Lys</b>	126.2	101.8	125.0	121.8	108.4
<b>Total</b>	1446	1433	1461	1204	1201

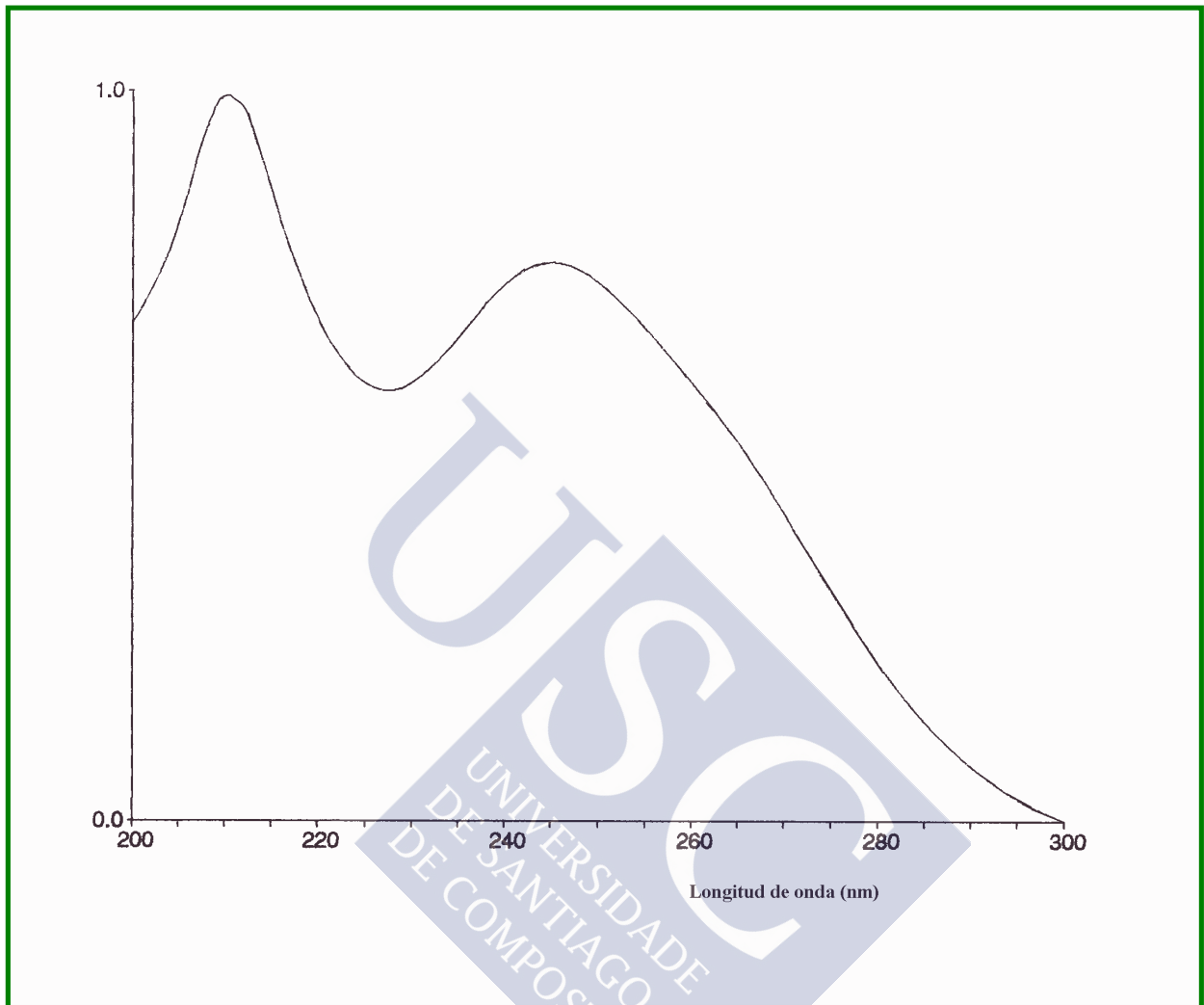
**Tabla V.2.-** Cambios en el contenido de aminoácidos (mg/100g muestra fresca) de las judías verdes durante diferentes tratamientos térmicos.



**Figura V.1.-** Típico cromatograma mostrando los PTC-aminoácidos de la judía verde. Picos: 1 Asp. 2 Glu, 3 H-Pro, 4 Ser, 5 Gly, 6 His, 7 Arg, 8 Thr+Ala+Pro, 9 Tyr, 10 Val, 11 Met, 12 Ile, 13 Leu, 14 Phe, 15 Lys.



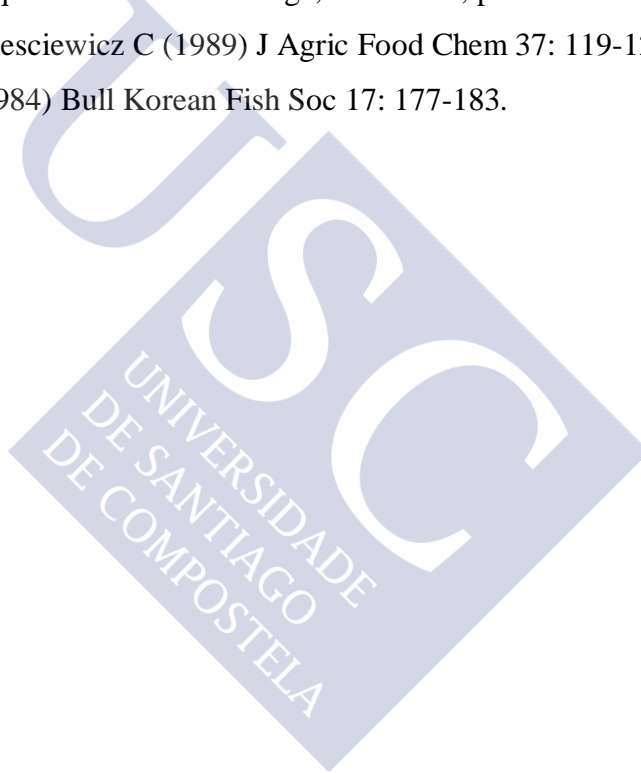
**Figura V.2.-** Representación en 3D de un cromatograma de judía verde.



**Figura V.3.-** Espectro ultravioleta del PTC-derivado del ácido aspártico, correspondiente a una muestra de judías crudas.

## V.6.- Referencias bibliográficas

1. Badui Dergal S. (1981) Química de los Alimentos. 1ª edn, Alhambra Mexicana, Mexico, pp 111-112.
2. Baltes W (1986) Food Chem 20: 213-214.
3. Belitz HD and Grosch W (1988) Lehrbuch der Lebensmittelchemied. 2nd. Acribia, Zaragoza, p 7.
4. Coleman WM, White JL and Perfetti TA (1994) J Agric Food Chem 42: 190-194.
5. González-Castro MJ, López-Hernández J, Simal-Lozano J and Oruña-Concha MJ (1997) J Chromatogr Sci 35: 181-185.
6. Kawashima K and Yamanaka H (1996) Fisheries Science 62(2): 293-296.
7. Lehninger A (1981) Bioquímica. 4th edn. Omega, Barcelona, p 103.
8. Sherr B, Lee CM and Jelesciewicz C (1989) J Agric Food Chem 37: 119-122.
9. Yang ST and Lee EH (1984) Bull Korean Fish Soc 17: 177-183.



VI

**EFFECTOS DE VARIOS TRATAMIENTOS CULINARIOS EN EL  
CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS EN JUDIAS VERDES  
(*Phaseolus vulgaris*, L.)**

**“Effects of various culinary treatments on the carbohydrates content of green  
beans (*Phaseolus vulgaris*, L.)”, en prensa**

## **VI.1.- Resumen**

Se determinaron los azúcares solubles, almidón, pectinas (SDF) y la fibra neutro detergente (NDF), en judías verdes (*Phaseolus vulgaris*, L.) antes y después de su cocinado a vapor, hervido, cocinado a presión, o en horno a microondas. Los azúcares solubles, almidón, y pectinas se determinaron por HPLC con detector de índice de refracción. NDF se determinó por gravimetría. Las concentraciones de cada componente se expresaron como porcentajes de muestra fresca. Todos los tratamientos culinarios usados causaron reducciones en la concentración de azúcares solubles, almidón, y pectinas, y un incremento en la concentración de NDF. El perfil de los carbohidratos del producto final está marcadamente afectado por el método de cocinado usado. La reducción en el contenido de carbohidratos solubles y el incremento del contenido de NDF fue menos marcada en el cocinado a vapor.

## **VI.2.- Introducción**

El consumo de judías suele ir precedido de algún tratamiento térmico. Procesos tan simples como ponerlas a remojo o el escaldado tienden a modificar tanto la composición como la disponibilidad de los nutrientes (Vidal-Valverde y col., 1992). Por lo tanto es de considerar que procesos más profundos como el cocinado a microondas o a presión altere en mayor medida estas características. Son numerosas las referencias de cómo distintos procesos comerciales como enlatado (Penner y col., 1991), pelado (Camire y col., 1997), esterilizado (Chang y col., 1990; López y col., 1997), por microondas (Chang y col., 1990; Svanberg y col., 1997), calor seco (Tovar y col., 1996) entre otros, modifican de alguna manera el contenido en carbohidratos. Las referencias sobre el cocinado a nivel del consumidor son más escasas, y en general se reducen a uno o dos tratamientos.

En este trabajo se investigan los efectos de cuatro procesos de cocinado domésticos en los contenidos de azúcares, almidón, pectinas (fibra soluble), y fibra neutro detergente (NDF, fibra insoluble) de las judías verdes. Los cuatro componentes son de importancia nutricional y se presentan a niveles relativamente altos en judías verdes. Los azúcares solubles, almidón, y pectina se determinaron por HPLC con detector de índice de

refracción. La fibra insoluble se determinó mediante un método gravimétrico (Oruña-Concha y col., 1996).

### **VI.3.- Materiales y Métodos**

#### VI.3.1.- Muestras

Las judías verdes frescas (*Phaseolus vulgaris*, L.) se adquirieron en un único establecimiento a primera hora de la mañana de cada día de análisis, y pueden ser consideradas de poseer similares características de frescura a cualquier otra disponible al consumidor.

#### VI.3.2.- Procesado

En cada día de compra se obtuvieron 15 lotes representativos de judías troceadas de 30 g. Cada uno de los lotes fue sujeto entonces a uno de los siguientes tratamientos (3 lotes por tratamiento):

- 1) hervido con tapa con 350 mL de agua durante 30 min.
- 2) cocido al vapor durante 40 min.
- 3) cocido a presión en 200 mL de agua durante 5 min.
- 4) cocido en horno de microondas en 150 mL de agua durante 5 min.
- 5) Sin tratamiento.

Todos los tratamientos usaron agua corriente de la traída, de mineralización débil, y en todos los casos el volumen de agua usada fue el mínimo necesario. Los tiempos de cocción se seleccionaron para obtener un grado de ternura y cocinado similar, con palatabilidad y gusto aceptables para los consumidores de nuestra región.

Estos lotes se analizaron para obtener el contenido en azúcares solubles, almidón y pectinas. Para investigar los efectos del proceso de cocinado en el contenido de NDF, otros 15 lotes adicionales de judías troceadas de 10 g se trataron de igual modo que las anteriores (3 lotes por tratamiento), siendo liofilizadas previo análisis, dado que el agua es causa de interferencia en la determinación de la NDF.

### VI.3.3.- Reactivos

Los patrones de fructosa, glucosa, sacarosa y almidón usados se obtuvieron de Merck (La Coruña, España) y el ácido galacturónico de Sigma (Madrid, España). El ácido cítrico, fosfato disódico, y el acetato de sodio de grado analítico obtenidos también de Merck, el etanol y ácido acético de grado analítico se obtuvieron de Scharlau (Barcelona, España), e hidróxido sódico de grado analítico de Panreac (Barcelona, España). El acetonitrilo, solvente de grado para HPLC se obtuvo de Scharlau. La pectinasa (EC 3.2.1.15, de *Aspergillus niger*) y celulasa (EC 3.2.1.4, de *Penicillium funiculosum*) se obtuvieron de Sigma, y la amiloglucosidasa (EC 3.2.1.3, de *Aspergillus niger*) se obtuvo de Boehringer-Mannheim (Barcelona, España). La solución neutro detergente para la determinación de la NDF se hizo con 1 litro de agua destilada conteniendo 18.61 g de EDTA (Scharlau), 10 mL de 2-etoxietanol (Scharlau) 30 g de lauril sulfato sódico (Merck), 4.56 g de fosfato disódico (Merck), y 6.81 g de borato sódico (Sigma).

### VI.3.4.- Procedimiento

Para el análisis de azúcares, almidón y pectinas, 30 g de muestra se extraen durante 45 min. con 160 mL de etanol al 80 %. El extracto se filtra a vacío (Whatman nº 541). El residuo (sólidos insolubles en alcohol, MIA) se seca a 37°C durante 24 h y se reserva para la determinación de almidón y pectina. El filtrado se enrasa entonces a 200 mL con etanol. Para la determinación de azúcares solubles, se pasa a través de una columna Waters Sep-Pak C18, 5 mL de alícuota de la solución anterior, se filtra (membrana de 0.45 µm de poro), y se inyecta en el cromatógrafo. Para la determinación de almidón, se mantienen a reflujo durante 2 horas 700 mg de MIA y 40 mL de agua para la gelatinización del almidón. La mezcla se enfría a 40°C para entonces añadirle 50 mL de tampón citrato/fosfato (pH 4.6) y 20 mg (120 unidades) de amiloglucosidasa, se mezcla y se incuba toda la noche a 55-58°C para hidrolizar el almidón a glucosa. Para la determinación de la pectina, se llevan a pH 9.5 con hidróxido sódico 0.1 N 30 mL de agua conteniendo 300 mg de MIA. La mezcla se agita, se deja 20 horas a 4°C, y entonces se lleva a pH 4.5 con ácido acético antes de la adición de celulasa (60 mg, 400 unidades) y pectinasa (0.18 mg, 66 unidades), y se incuba a 55-58°C durante 20 horas para hidrolizar la pectina a ácido galacturónico. Estas mezclas se enfrían, se filtran a

vacío (Whatman nº 541) y se enrasan a 100 mL con agua. Las soluciones resultantes se filtran de nuevo (0.45 µm de poro) y entonces se inyectan al cromatógrafo.

El equipo de HPLC consiste en una bomba Jasco PU-1580 un inyector Rheodyne con bucle de 20µL, un calentador de columnas Spectra Physics 8792, y un integrador SP 4290 unido via Labnet a un ordenador 286 Tandy TL, con “software” SP WINner Work Station Integrator versión 4.00 de Spectra Physics sobre un sistema operativo Double-Dos Top Memory Section MS DOS versión 3.20 (sistema pionero en el trabajo multitárea). Mediante el SST incorporado a este “software” se pudo también chequear la eficacia de la columna. El detector usado, un índice de refracción Shodex RI-71. La columna utilizada Spherisorb-NH<sub>2</sub> de 5µm, de dimensiones 250 x 4.6 (i.d.) mm (Sugelabor, Madrid, España). Para los azúcares y el almidón se utiliza una fase móvil de acetonitrilo:agua 80:20 (v/v) a 1.0 mL/min, con la columna termostatizada a 28°C. Para las pectinas acetato de sodio 0.1 M como fase móvil, que debe filtrarse (0.45 µm de poro) y ajustarse a pH 4.6 con ácido acético a un flujo de 0.8 mL/min.

La NDF se determina usando un sistema Fibertec System, Dosi Fiber mediante reflujos de un gramo de muestra seca una hora en la solución neutro detergente, tras lo que se filtra para obtener el residuo sólido. Este residuo se seca a 100°C durante 8 horas, se pesa (NDF + cenizas insolubles), e incinera para obtener por diferencia con las cenizas el valor de la NDF.

#### **VI.4.- Resultados y Discusión**

Los azúcares solubles encontrados en la judía fueron fructosa (1.26 % p/p de muestra fresca), glucosa (0.58 % p/p de muestra fresca) y sacarosa (0.28 % p/p de muestra fresca). Todos los tratamientos disminuyen los contenidos en estos azúcares siendo la pérdida más notable cuanto mayor era el volumen de agua utilizado. Estos valores aparecen reflejados en la Tabla VI.1. El cocinado a vapor muestra las pérdidas más pequeñas mientras que el hervido en olla (que necesita del mayor volumen de agua) muestra la mayor pérdida. Esta disminución es debida a la disolución de los azúcares en el agua de cocción y ha sido también observada por Oruña-Concha y col. (1996) en el

escaldado de judías. La Figura VI.2 muestra un cromatograma típico del contenido de azúcares solubles de una muestra de judía cocida en olla a presión.

Al igual que los azúcares solubles, el contenido en almidón de las judías decrece alrededor del 20% con los distintos tratamientos térmicos con excepción del cocinado con microondas, que presenta una disminución entorno al 47%, atribuible a las especiales características de calentamiento (Tabla VI.2). El cocinado produce una gelatinización parcial de las moléculas de almidón, que facilita así su degradación. Esto fue observado por Oruña-Concha y col. (1996) al escaldar judías, y por Camire y col. (1997) en el pelado de la patata.

El contenido en pectinas también disminuye en las judías cocidas (Tabla VI.2). Las cocinadas a vapor mostraron una disminución del 19%, microondas y olla sobre un 25%, y presión un 33% respecto al crudo. Disminuciones debidas a la solubilización de la fracción soluble de las pectinas durante el cocinado han sido también observadas por Rojas Hidalgo (1994) en verduras y hortalizas; por Varo y col. (1984) en tomates y por López y col. (1997) en alcachofa. La Figura VI.3 muestra un cromatograma típico del contenido de azúcares solubles de una muestra de judía cocida a vapor.

Por lo contrario, el contenido en fibra dietética (NDF) aumenta al someter la judía a los distintos tratamientos térmicos (Tabla VI.2). El cocinado a vapor incrementó la NDF sobre un 10% y el hervido en olla alrededor de un 37%. Este incremento de la NDF con los tratamientos térmicos ha sido observado por numerosos autores y puede ser atribuida:

- a) a una concentración debida a la anteriormente citada pérdida de componentes solubles durante el cocinado (Penner y col., 1991; Oruña-Concha y col., 1996).
- b) a que el calentamiento produce reacciones (Maillard) aflorando productos insolubles que son cuantificados como NDF (Chang y col., 1990; Vidal-Valverde y col., 1991; Oruña-Concha y col., 1996).

De forma global se aprecia una disminución entorno al 15% en el contenido de carbohidratos en el cocinado con la excepción de la cocción al vapor donde ésta es de algo más de un 6% (Figura VI.1). La progresiva disminución de carbohidratos mostrada en la altura (eje y) parece ir acompañada de un aumento de la NDF en el perfil. Esto confirmaría la idea de una concentración de compuestos insolubles (NDF) por la pérdida de compuestos solubles (azúcares principalmente).

## VI.5.- Tablas y Figuras

**Tabla VI.1.-** Contenido en azúcares solubles (% mf) en judías verdes crudas y cocinadas.

**Tabla VI.2.-** Contenido en almidón, pectinas y NDF (% mf) de judías verdes crudas y cocinadas.

**Figura VI.1.-** Representación de la modificación en el contenido total de carbohidratos, g/100 g mf (eje y), y en su perfil (área de los respectivos segmentos).

**Figura VI.2.-** Cromatograma que muestra el contenido en azúcares de una muestra de judías cocidas a presión.

**Figura VI.3.-** Cromatograma que muestra el contenido en pectinas (ácido galacturónico) de una muestra de judías cocidas a vapor.



	<b>Fructosa (%)</b>		<b>Glucosa (%)</b>		<b>Sacarosa (%)</b>	
<b>Cruda</b>	1.264	± 0.027	0.577	± 0.005	0.279	± 0.008
<b>Vapor</b>	1.126	± 0.042	0.436	± 0.012	0.221	± 0.011
<b>Presión</b>	0.923	± 0.003	0.367	± 0.023	0.183	± 0.028
<b>Microondas</b>	0.831	± 0.053	0.315	± 0.025	0.137	± 0.010
<b>Olla tapada</b>	0.698	± 0.041	0.280	± 0.027	0.127	± 0.012

\* Media ± S.D. de 3 determinaciones; base en muestra fresca.

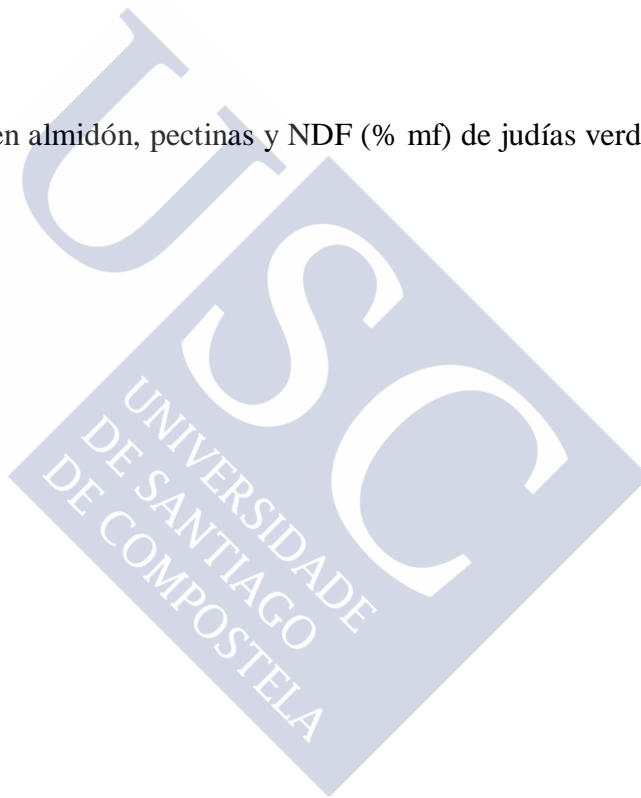
**Tabla VI.1** – Contenido\* en azúcares solubles (% mf) en judías verdes crudas y cocinadas.

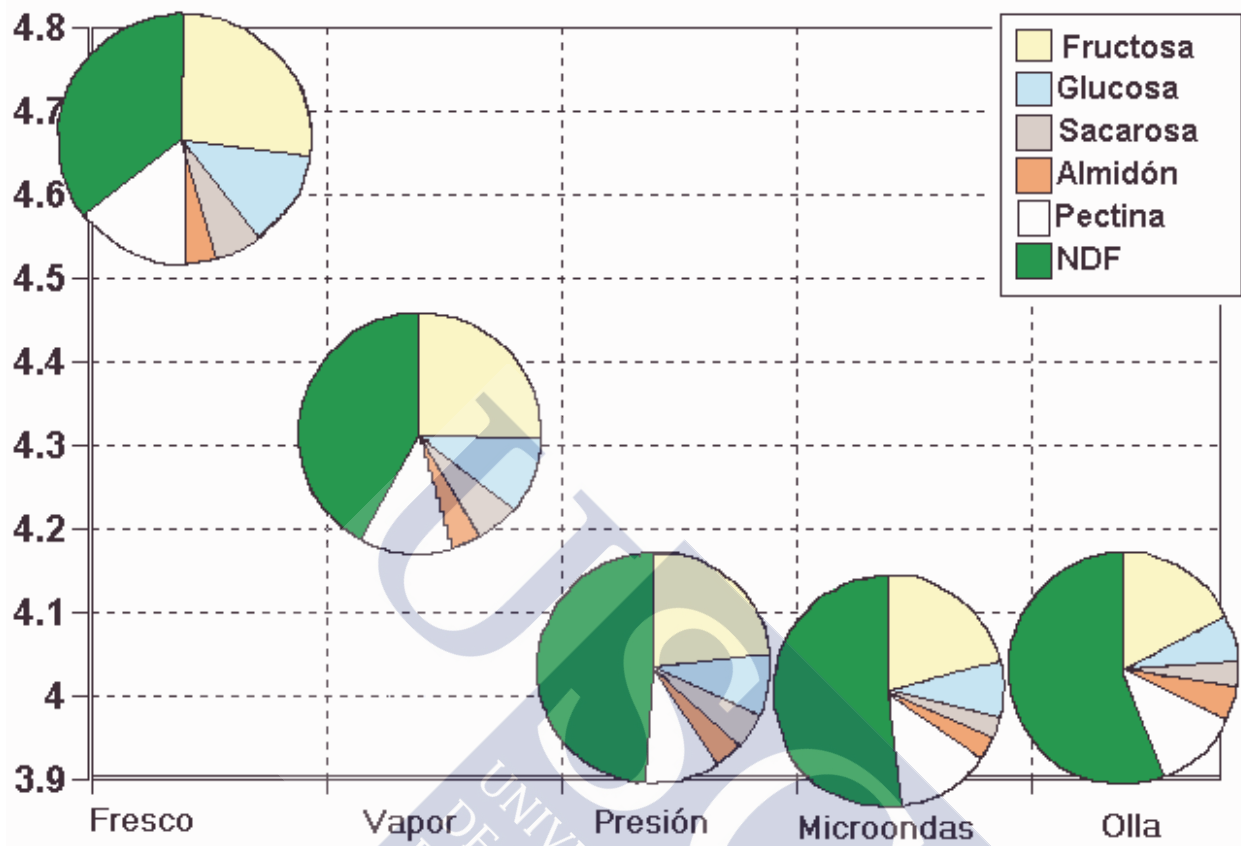


	Almidón		Pectinas (SDF)		NDF	
<b>Cruda</b>	0.228	± 0.022	0.674	± 0.021	1.628	± 0.050
<b>Vapor</b>	0.191	± 0.027	0.543	± 0.023	1.797	± 0.011
<b>Presión</b>	0.192	± 0.060	0.448	± 0.017	1.920	± 0.025
<b>Microondas</b>	0.128	± 0.061	0.514	± 0.023	2.081	± 0.248
<b>Olla tapada</b>	0.198	± 0.041	0.493	± 0.110	2.236	± 0.043

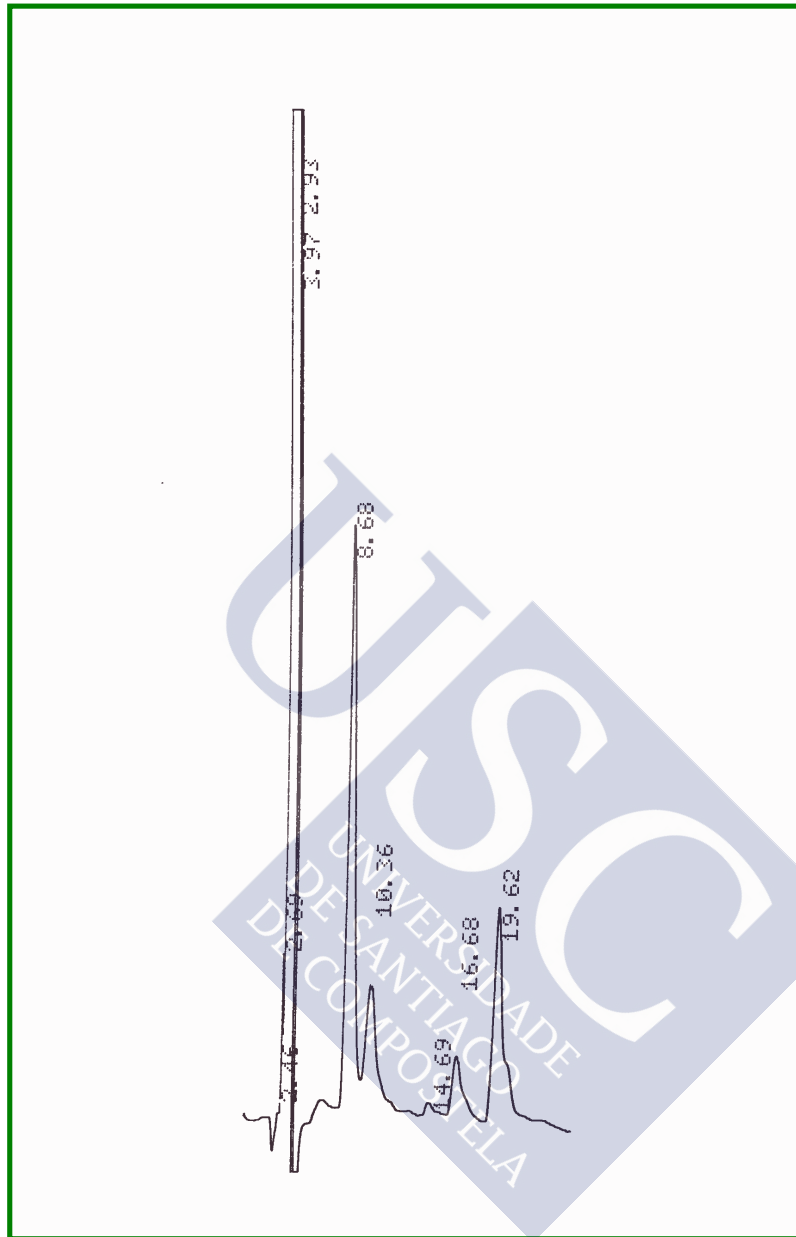
\* Media ± S.D. de 3 determinaciones; base en muestra fresca.

**Tabla VI.2** – Contenido\* en almidón, pectinas y NDF (% mf) de judías verdes crudas y cocinadas.

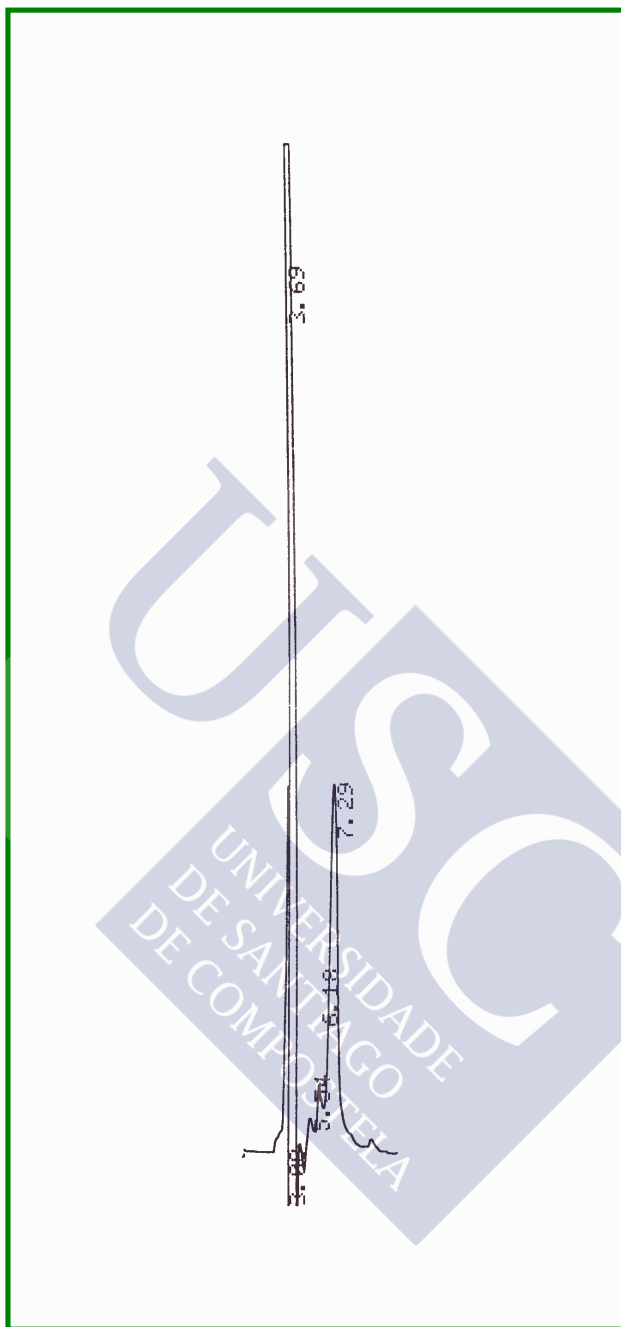




**Figura VI.1.-** Representación de la modificación en el contenido total de carbohidratos, g/100 g mf (eje y), y en su perfil (área de los respectivos segmentos).



**Figura VI.2.-** Cromatograma que muestra el contenido en azúcares solubles (8.7 min- fructosa; 10.4- glucosa; 16.7- sacarosa) de una muestra de judías cocidas a presión.



**Figura VI.3.-** Cromatograma que muestra el contenido en pectinas (7.3 minutos, ácido galacturónico) de una muestra de judías cocidas a vapor.

## VI.6.- Referencias bibliográficas

1. Camire, M.E.; Violette, D.; Dougherty, M.P. and McLaughlin, M.A. (1997) Potato Peel Dietary Fiber Composition: Effects of Peeling and Extrusion Cooking Processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45:1404-1408.
2. Chang, M.-C. and Morris, W.C. (1990) Effect of Heat Treatments on Chemical Analysis of Dietary Fiber. *Journal of Food Science* 55(6):1647-1650.
3. López, G.; Ros, G.; Rincón, F.; Periago, M.J.; Martínez, C. and Ortuño, J. (1997) Modificaciones del Valor Nutritivo de la Alcachofa Durante su Procesado Industrial. *Alimentaria Ene-Feb1997*, 279:129-134.
4. Oruña-Concha, M.J.; González-Castro, M.J.; López-Hernández, J. and Simal-Lozano, J. (1996) Evolution of Sugar, Starch, Pectin and Fibre Contents in Frozen Green Beans and Padrón Peppers. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 92(9): 278-281.
5. Penner, M.H. and Kim, S. (1991). Nonstarch polysaccharide fractions of raw, processed and cooked carrots. *J. Food Sci.*, 56(6): 1593-1599.
6. Svanberg, S.J.; Tapani Suortti and Margareta G-L. Nyman, E. (1997) Physicochemical Changes in Dietary Fiber of Green Beans after Repeated Microwave Treatments. *Journal of Food Science* 62(5):1006-1010.
7. Tovar, J. and Melito, M. (1996) Steam-Cooking and Dry Heating Produce Resistant Starch in Legumes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 44:2642-2645.
8. Vidal-Valverde, C. and Frías, J. (1991) Legume Processing Effects on Dietary Fiber Components. *Journal of Food Science* 56(5):1350-1352.
9. Vidal-Valverde, C.; Frías, J. and Esteban, R. (1992). Dietary Fiber in Processed Lentils. *Journal of Food Science* 57(5):1161-1163.
10. Anderson, L.; Dibble, M.V.; Turkki, P.R.; Mitchell, H.S. and Rynbergen, H.J. (1987). *Nutrition in Health and Disease*. Interamericana, Mexico.
11. Belitz, H.D. and Grosch, W. 1988. *Química de los Alimentos*. Chapter 17. Acirbia Ed., Zaragoza, Spain
12. Rojas Hidalgo. 1994.: *Los Carbohidratos en Nutrición Humana*. Grupo Aula Médica S.A., C.I. Venecia 2. Isabel Colbrand, s/n. Madrid

13. Moreiras, O.; Carbajal, A. And Perea del Pino, I.M. (1988). *Evolución de los Hábitos Alimentarios en España 1987*, Chapter 3. Secretaría General Técnica, Madrid, Spain.
14. Primo Yúfera, E. (1979). *Química Agrícola III. Alimentos*. Alhambra Ed., Madrid.



**VII**

**DETERMINACION POR CROMATOGRAFIA GASEOSA DEL  
CONTENIDO DE ACIDOS GRASOS  
EN JUDIAS VERDES (*Phaseolus vulgaris*, L.)  
DURANTE DIFERENTES TRATAMIENTOS TERMICOS**

**“Gas chromatographic determination of the fatty acid content of heat-treated green beans”, aceptada el 24-Mayo-2000, Journal of Chromatography**

## VII.1.- Resumen

Se ha usado un método de cromatografía gaseosa (GC) que emplea un detector de ionización de llama, una columna capilar DB-Wax con helio como gas portador, y un inyector “Split-splitless” (1:15) para determinar los efectos de diferentes tratamientos térmicos en el contenido de ácidos grasos de judías verdes enteras (*Phaseolus vulgaris*, L.). Se ha usado un método de extracción-metilación para obtener los ésteres metílicos de los ácidos grasos de las judías crudas y cocidas a vapor, olla tapada, a presión, y con microondas. El perfil de los ácidos grasos apenas varía pero los tratamientos térmicos producen un incremento del contenido en ácidos grasos.

## VII.2.- Introducción

El contenido lipídico de los vegetales es relativamente bajo pero su estudio resulta de interés debido a la tendencia a aumentar la rancidez de estos componentes, reduciendo el valor nutricional de los alimentos y produciendo olores y sabores desagradables durante el proceso (Badui Dergal, 1981). Por otro lado, esta pequeña cantidad de lípidos tiene una relevancia considerable en la dieta ya que incluyen dos ácidos grasos poli-insaturados, el ácido linoleico y linolénico, que no pueden ser biosintetizados por el hombre y que son importantes para la salud (González y col., 1996). La elaboración y el cocinado de los alimentos altera inevitablemente su composición, afectando de este modo las propiedades nutritivas y organolépticas (Cruz y col., 1999). Algunos vegetales suelen ser comidos crudos, pero existen muchos, entre ellos la judía verde, que necesitan de un tratamiento para alcanzar una aceptación adecuada por el consumidor. En este trabajo examinamos los efectos de cuatro tratamientos térmicos (hervido a vapor, en olla tapada, a presión y con horno microondas) en el contenido de ácidos grasos (FA) de las judías verdes (*Phaseolus vulgaris*, L.). Se han desarrollado muchos métodos para su determinación en los alimentos. Entre ellos espectroscopía de infrarrojos de transformada de Fourier (Lanser y col. 1991) y métodos cromatográficos como cromatografía líquida de alta resolución (Senatore, F., 1990) y cromatografía gaseosa (Park and Washington 1993; López y col., 1996; Minka y col., 1999) siendo estos los métodos más populares, en particular GC. En este trabajo los ácidos grasos se

han extraído y metilado en sólo un paso y se ha desarrollado un método de GC para determinarlos.

### VII.3.- Materiales y Métodos

#### VIII.3.1.- Muestras

Las judías verdes se adquirieron en un supermercado local. Se obtuvieron cinco lotes representativos de judías troceadas, de 40 g. Un lote fue analizado crudo y cada uno de los restantes sometido a uno de los siguientes tratamientos térmicos:

- 1.- hervido en una olla cubierta con 1 L de agua durante 30 minutos.
- 2.- hervido a vapor en una olla cubierta durante 40 minutos.
- 3.- hervido a presión con 200 mL de agua durante 5 minutos tras la primera salida de vapor.
- 4.- hervido en horno a microondas con 150 mL de agua durante 5 minutos.

Todos los tratamientos usaron el menor volumen de agua y el menor tiempo de cocción para alcanzar un grado similar de ternura con una palatabilidad adecuada, siendo el obtenido con microondas el producto menos tierno dadas las características térmicas de las microondas. Tras los tratamientos térmicos los lotes cocinados y el crudo fueron individualmente homogeneizados y liofilizados.

#### VIII.3.2.- Procesado: Método de extracción y metilación en un paso

Después de secadas, los lotes fueron cuidadosamente machacados en un mortero de vidrio y divididos en tres muestras de 0,7 g (5x3 muestras). Entonces las muestras fueron procesadas como describe Sukija y Palmquist. Se pesan 0,7 g de cada muestra en un tubo Pirex 16x160 mm con tapón de politetrafluoruro de etileno y rosca. Entonces se añaden 2 mL de tolueno (Carlos Erba, Milano, Italia) y 3 mL de ácido clorhídrico metanólico al 5% recién preparado (Metanol de grado cromatográfico y HCl, Scharlau, Barcelona, España). Tras un cuidadoso mezclado del contenido y soplar el espacio de cabeza del vial con nitrógeno, los tubos se calientan durante 2 horas a 70 °C en un baño de agua. Enfriados los tubos se añaden 5 mL de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 6% (Scharlau, Barcelona, España); 1 mL de tolueno y 1 mL de una solución de tolueno conteniendo el éster metílico del ácido nonadecanoico (Sigma, MO, EEUU) como patrón interno, se agitan

con ayuda Vortex. La separación de las fases se realiza mediante 5 minutos de centrifugación a 1100 r.p.m. en una centrífuga Ettich EBA 12. La capa orgánica se seca con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (Scharlau, Barcelona, España) y se inyectó 1  $\mu\text{L}$ .

### VIII.3.3.- Procedimiento: Análisis de los Esteres Metílicos de Acidos Grasos (FAMEs)

Para la separación y cuantificación individual de los FAMEs se usa un cromatógrafo Fisons GC-8000 series (Manchester, Reino Unido) equipado con inyector "split-splitless" y un detector de ionización de llama Fisons EL-980. Los FAMEs se separan individualmente con una columna capilar DB-Wax (60 m x 0,32 mm id x 0,25  $\mu\text{m}$  de película de polietilenglicol) de J&W (Folsom, CA). Las áreas de los picos se procesan mediante el "software" Chrom-Card versión 1.18 (CE Instrument, Milano, Italia) para Windows, instalado en un ordenador Pentium. Con él también se chequea la eficacia de la columna (al incorporar la integración el SST). Las muestras se inyectan (1  $\mu\text{L}$ ) en "split" 1:15 con la columna a 110  $^{\circ}\text{C}$  y el inyector a 250  $^{\circ}\text{C}$ . Como gas portador se usa helio a un flujo de 1,37 mL/min., velocidad lineal media 22,76 cm/sg y una presión en cabeza de columna de 15 psi. Pasados 5 min. de la inyección la temperatura aumenta a 5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . hasta 220  $^{\circ}\text{C}$ , manteniéndose así durante 10 min. (39 min. en total). La temperatura del detector es de 260  $^{\circ}\text{C}$ . Los FAMEs se identifican por comparación de sus tiempos de retención con los correspondientes a sus patrones (todos de Sigma, MO, EEUU). Esto se confirma por comparación de sus espectros de masas con los de la librería Willey versión 1.4 (New York, EEUU). Para el análisis de los espectros de masas se usa un detector de masas Fisons MD-800 (Manchester, Reino Unido) y el "software" MassLab de Finnigan GC/MD (Versión 1.4).

#### VII.4.- Resultados y Discusión

La precisión del método se calcula como el %RSD de las cantidades de cada FAME en cada una de las 8 porciones obtenidas independientemente de una muestra de judía liofilizada. La precisión de la medida se calcula en base al %RSD de 9 determinaciones por GC de la cantidad de cada FAME en una misma solución. El porcentaje de recuperación del método se calculó usando 10 partes de la misma muestra liofilizada y sobrecargando con distintas cantidades de cada ácido graso. El límite de detección de cada ácido graso se calculó siguiendo las guías ACS (American Chemical Society 1980). Los resultados se reflejan en la Tabla VII.1.

El contenido en ácidos grasos aumenta en todos los tratamientos térmicos (ver Tabla VII.2). Las judías verdes cocidas a presión muestran un incremento entorno al 15% respecto a las crudas. Las cocinadas a vapor, olla tapada, y las cocidas con microondas muestran aumentos entre el 42 y el 57% respectivamente. A pesar de estos cambios en el contenido de los ácidos grasos, tras los tratamientos térmicos apenas varía el perfil de los ácidos grasos (ver Figura VII.1). Esto coincide con Samuel R. Minka quien afirma que los tratamientos térmicos no inducen cambios en los niveles de judías negras cocidas (*Phaseolus vulgaris*, L.) y R.S. Attia quien observó sólo ligeros cambios en la composición de ácidos grasos y el tipo de lípidos presentes tras cocinar y secar garbanzos (*Cicer arietinum*, L.).

Los tratamientos térmicos inhiben la lipasa y producen un marcado descenso en la lipoxigenasa (Attia y col., 1996). Esto puede explicar por qué sólo las judías crudas mostraron un menor contenido de ácido linolénico, porque este ácido graso es un substrato idóneo para la lipoxigenasa y puede degradarse fácilmente. La inhibición térmica de la lipoxigenasa puede producir un aumento de sus substratos, los ácidos linoleico y linolénico, pero no puede explicar el incremento por igual de cada ácido graso. Tampoco explica el perfil tan similar en todos los tratamientos. Este incremento regular de estos compuestos debe producirse por una concentración de los ácidos grasos en la muestra debido a pérdidas de compuestos solubles en agua como azúcares libres, almidón, pectinas, pigmentos o ácidos orgánicos durante los tratamientos térmicos. Los tratamientos que producen menores pérdidas de esos componentes, como es la cocción a presión, mostraron también el menor incremento en ácidos grasos.

## VII.5.- Tablas y Figuras

**Tabla VII.1.-** Precisión, recuperación y límite de detección de los ácidos grasos analizados.

**Tabla VII.2.-** Composición de ácidos grasos de judías verdes y tratadas térmicamente (mg/100g mf; n=3).

**Tabla VII.3.-** Perfil de ácidos grasos (%) de judías verdes crudas y tratadas térmicamente.

**Figura VII.1.-** Representación gráfica de los datos de la tabla 3.

**Figura VII.2.-** Cromatograma que muestra el contenido en ácidos grasos (FAMEs) de una muestra de judías cocidas en olla tapada.



<b>Acido Graso</b>	<b>Precisión de la medida RSD (%)</b>	<b>Precisión del Método Analítico RSD (%)</b>	<b>Recuperación (%)</b>	<b>Limite de detección (µg/m L)</b>
<b>C<sub>16:0</sub></b>	1.429	5.07	100.4	1.19
<b>C<sub>18:0</sub></b>	1.097	2.55	100.9	1.98
<b>C<sub>18:1</sub></b>	0.850	3.65	101.8	2.97
<b>C<sub>18:2</sub></b>	0.743	2.48	104.5	1.98
<b>C<sub>18:3</sub></b>	0.665	3.25	99.87	0.99
<b>Media</b>	0.957	3.40	101.5	1.82

**Tabla VII.1.** Precisión, recuperación y límite de detección de los ácidos grasos analizados.

<b>Acido Graso</b>	<b>Cruda</b>	<b>Presión</b>	<b>Vapor</b>	<b>Olla</b>	<b>Microondas</b>
<b>C<sub>16:0</sub></b>	18.01	17.93	20.99	21.70	23.79
<b>C<sub>18:0</sub></b>	4.06	3.52	4.36	4.98	4.93
<b>C<sub>18:1</sub></b>	3.19	1.98	3.12	4.41	4.25
<b>C<sub>18:2</sub></b>	17.65	20.30	25.82	27.68	27.85
<b>C<sub>18:3</sub></b>	24.21	33.40	41.28	41.50	44.30
<b>Total</b>	67.12	77.13	95.57	100.27	105.11

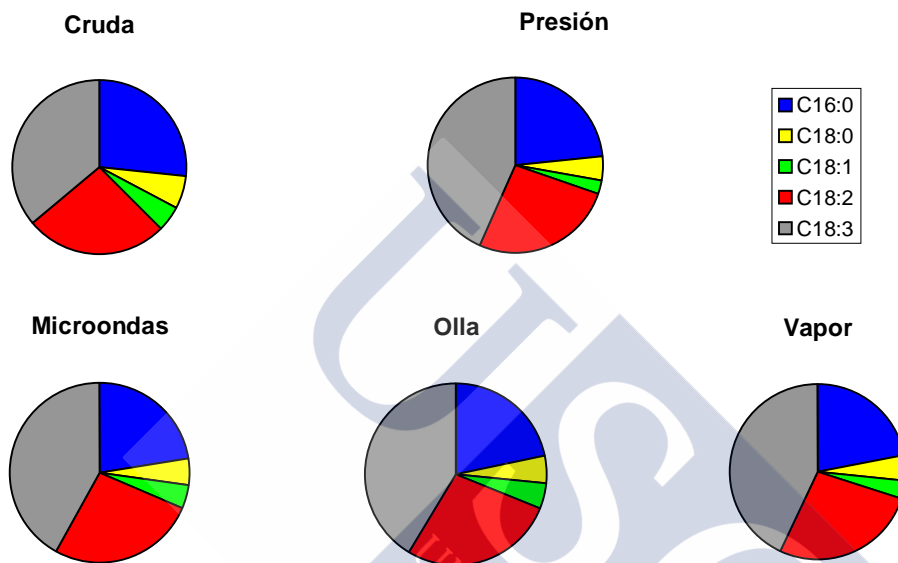
**Tabla VII.2.** Composición de ácidos grasos de judías verdes crudas y tratadas térmicamente (mg/100g mf; n = 3).



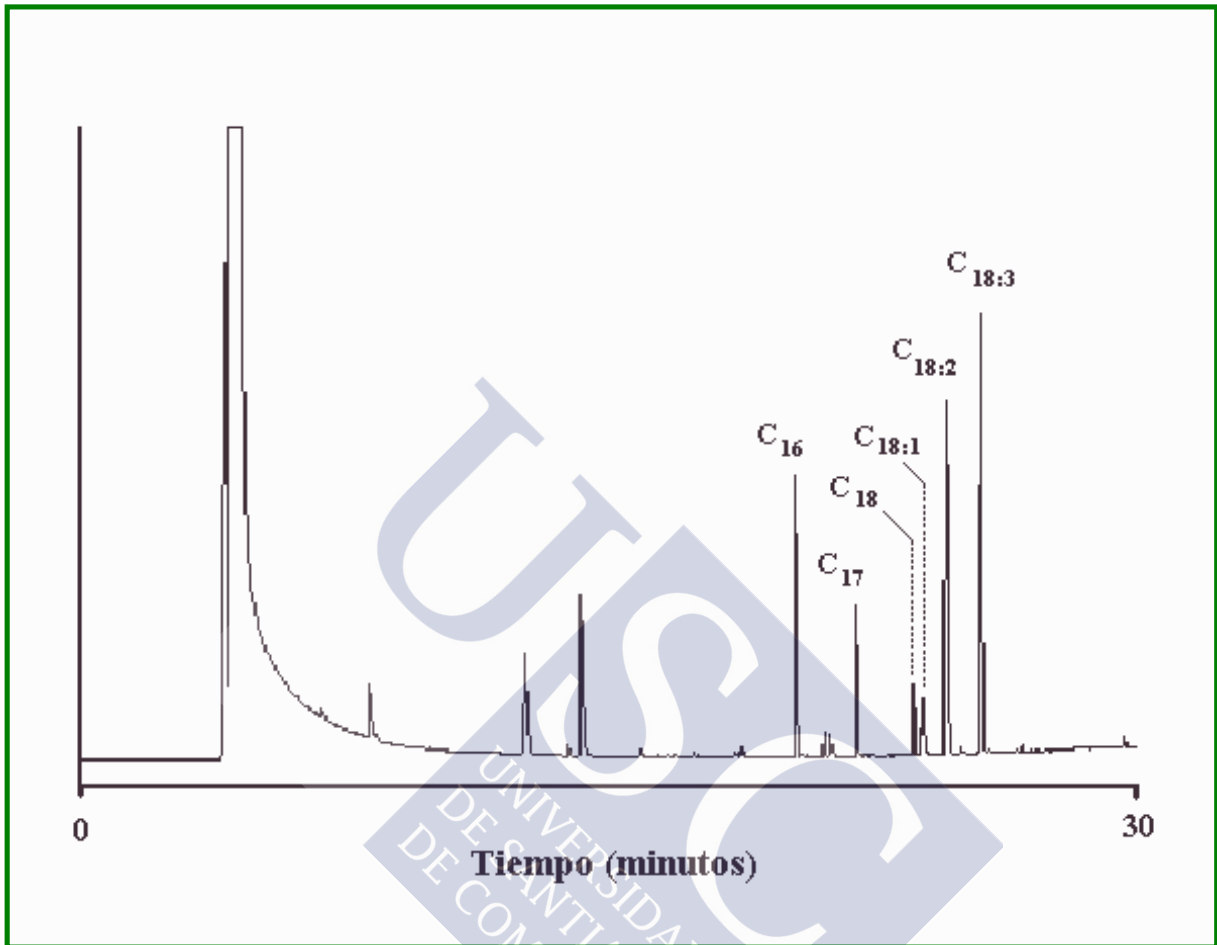
Acido Graso	Cruda	Presión	Vapor	Olla	Microondas
C <sub>16:0</sub>	26.8	23.2	22.0	21.6	22.6
C <sub>18:0</sub>	6.1	4.6	4.6	5.0	4.7
C <sub>18:1</sub>	4.7	2.6	3.3	4.4	4.0
C <sub>18:2</sub>	26.3	26.3	27.0	27.6	26.5
C <sub>18:3</sub>	36.1	43.3	43.2	41.4	42.1

**Tabla VII.3.** Perfil de ácidos grasos (%) de judías verdes crudas y tratadas térmicamente.





**Figura VII.1.-** Representación gráfica de los datos de la Tabla 3.



**Figura VII.2.-** Cromatograma que muestra el contenido en ácidos grasos (FAMES) de una muestra de judías cocidas en olla tapada.

## VII.6.- Referencias bibliográficas

1. American Chemical Society, *Anal. Chem.* 52 (1980) 2242.
2. Attia, R.S; Aman, M.E; El-Tabey, A.M and Hamza, M.A., *Food Chem.* 56 (1996) 123.
3. Badui Dergal, S. *Química de los Alimentos*, 1ª edn., Alhambra Mexicana, 1981, p. 185.
4. Cruz, C; González, M.J; Oruña, M.J; López, J; Simal, J.A. and Simal, J., *Food Res. Int.* 30 (1997) 787.
5. Cruz, C; González, M.J; Oruña, M.J; López, J; Simal, J.A. and Simal, J., *Deut. Lebensm-Rundsch.* 95 (1999) 323.
6. González, M.J; Oruña, M.J; López, J; Simal, J and Ganza, A., *Z Lebensm. Unters Forsch* 203 (1996) 370.
7. Lanser, A.C; List, G.R; Holloway, R.K. and Mounts, T.L., *J. Am. Oil Chem.* 68 (1991) 448.
8. López, J; González, M.J; Simal, J; Vázquez, M.E. and Vázquez, M.L., *Grasas Aceites*, 47 (1996) 182.
9. Senatore, F., *Biochem. Systematics and ecology.* 18 (1990) 103.
10. Minka, S.R.; Mbofung, C.M.F; Gandon, C. and Bruneteau, M., *Food Chem.* 64 (1999) 145.
11. Park, Y.W. and Washington, A.C., *J. Food Sci.* 58 (1993) 245.
12. Sukhija, P.S. and Palmquist, D.L., *J. Agric. Food Chem.* 36 (1988) 1202.

**VIII**

**CONCLUSIONES GENERALES**



## VIII.- Conclusiones

### Métodos:

1. Se propone un método de cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas para la determinación de los compuestos volátiles responsables del aroma en la judía verde. Después de su extracción mediante corriente de nitrógeno, los compuestos volátiles quedan atrapados en un cartucho de adsorción de carbón grafitado del que se liberan mediante una desorción térmica por microondas guiadas. La separación de los distintos volátiles se lleva a cabo utilizando una columna DB-5 como fase estacionaria y helio como gas portador.
2. Se ha aplicado un método de HPLC para la identificación de los pigmentos en las muestras de judías verdes. Como fase estacionaria se usó una columna C18 y como fase móvil un gradiente de acetonitrilo, metanol, diclorometano y hexano. La detección se realiza en la región visible, realizando simultáneamente lecturas a 410 nm para la feofitina *a*, 430 nm para la clorofila *a* y la feofitina *b*, 450 nm para la luteína y 460 nm para la clorofila *b*.
3. Se ha utilizado un método de HPLC para la determinación conjunta de Vit. C y ácidos orgánicos (málico, oxálico y fumárico). La separación se realiza mediante una columna C18 como fase estacionaria, y agua acidificada a pH 2.2 con ácido metafosfórico como fase móvil. La determinación se realiza en la región ultravioleta, efectuando simultáneamente lecturas a 215 nm para la Vit. C y el ácido oxálico, y 245 nm para los ácidos málico y fumárico.
4. Para la determinación de aminoácidos proteínogénicos se propone un método de HPLC que requiere de la derivatización de los aminoácidos con feniltiocianato. Los feniltiocarbamil derivados se separan en una columna C18 utilizando como fase móvil un gradiente tampón acetato sódico:agua. La detección se realiza con un detector ultravioleta a 250 nm.

5. Para la determinación de azúcares solubles, almidón y pectinas se propone una técnica de HPLC que utiliza como fase estacionaria una columna de grupos amino y un detector de índice de refracción. La fase móvil utilizada para la separación de azúcares solubles y del almidón (transformado en glucosa) es acetonitrilo:agua. Para el análisis de pectinas se mide la presencia de ácido galacturónico, procedente de su hidrólisis alcalina y enzimática. Se utilizó como fase móvil un tampón de acetato sódico. Los azúcares solubles se extraen previamente con alcohol, y el almidón se analiza por el contenido en glucosa tras su hidrólisis enzimática. La determinación de NDF se efectúa gravimétricamente utilizando la unidad de extracción Dosi-Fiber obteniéndose también un resultado satisfactorio.
6. Se propone un método de cromatografía de gases para el análisis de ácidos grasos. La determinación de los ácidos grasos pasa por la extracción-metilación previa de la muestra. Para la detección de los ésteres metílicos se emplea un detector de ionización de llama, una columna capilar DB-Wax de 60 m y helio como gas portador. La precisión analítica del método es de 3.4 %, la recuperación de un 101.5 % y el límite de detección medio de 1.82 µg/mL.

### **Tratamientos:**

1. Tratamiento en olla tapada: se caracteriza un tiempo de cocción alto (30 minutos) y por usar un volumen de agua mayor que el resto, superando el doble del empleado en otros tratamientos. Produce el mayor número de compuestos volátiles y también es el tratamiento que obtiene un mayor contenido en carotenoides (el  $\beta$ -caroteno es precursor de la vitamina A) con un valor de 7.7 mg/100g mf. Respecto a la vitamina C (3.6 mg/100g mf) este tratamiento la pierde en mayor medida que el resto. Algo parecido ocurre con los aminoácidos, donde las pérdidas son de las más altas ~1200 mg/100g (junto al tratamiento a presión). La pérdida de carbohidratos solubles es también la más alta, descendiendo el contenido un 48 %. Por otra parte permite obtener los mayores valores de fibra dietética, con un aumento del 19 % respecto al crudo. El

contenido en ácidos grasos está en un nivel intermedio respecto al resto de tratamientos situándose en 100 mg/100g de mf.

2. La cocción a vapor se caracteriza por un tiempo de cocción alto (40 minutos) y por la ausencia de contacto directo con el agua de cocción. Pese a modificar el perfil de compuestos volátiles, no supone una producción comparable con la del tratamiento en olla. Las clorofilas se ven muy afectadas con este tratamiento (disminución del 50 %) pero en lo correspondiente a los carotenoides es un buen tratamiento para su conservación (7.6 mg/100g mf). Conserva mejor que el resto de los tratamientos el contenido de vitamina C (7.4 mg/100g mf). Los ácidos orgánicos alcanzan con esta modalidad su nivel más alto (179 mg/100g mf) debido a la ausencia de contacto directo con el agua de cocción; al igual que con los aminoácidos (1433 mg/100g mf) y los azúcares solubles (con pérdidas del 16 %). Sin embargo el contenido en fibra dietética y ácidos grasos es el más bajo, con un aumento de 1.6 % y un valor de 95 mg/100g de mf respectivamente.
3. La olla a presión se caracteriza por una temperatura de cocción próxima a los 120°C, lograda al aumentar la presión de vapor en el interior de la olla. El tiempo empleado es junto al horno de microondas, el más corto (5 minutos). El perfil de volátiles es, al igual que en el resto de los tratamientos, distinto del crudo. Los pigmentos alcanzan los valores más altos, con 12 mg/100g de mf, a pesar de que los carotenoides están a niveles bajos (6.4 mg/100g de mf; por debajo de los valores obtenidos en cocción a vapor y en olla). Los ácidos orgánicos se encuentran a niveles altos (190 mg/100g de mf), al contrario que con los aminoácidos, que junto al tratamiento en olla poseen los niveles más bajos (~1200 mg/100g de mf). Respecto a los carbohidratos solubles las pérdidas (30.5 %) son menores que con microondas y con el tratamiento en olla. Sin embargo el contenido en fibra dietética, con un incremento del 3 %, es uno de los más bajos. En cuanto al contenido en ácidos grasos, las judías cocidas a presión, con 77 mg/100g de mf, poseen el menor valor de los cuatro tratamientos.
4. El uso del horno de microondas reduce el tiempo de cocción a 5 minutos (al igual que con olla a presión). La característica principal está en que el calentamiento se produce con mayor intensidad en las zonas del alimento con más contenido en

agua. Las microondas agitan las moléculas de agua haciéndolas chocar entre sí, produciendo un gran desprendimiento de calor. El perfil de compuestos volátiles se asemeja al obtenido con la cocción a vapor. El contenido en carotenoides es el más bajo de todos los tratamientos (5 mg/100g de mf) y, aunque conserva bien la vitamina C con valores entorno a los 5 mg/100g de mf, el contenido en ácidos orgánicos es muy bajo (146 mg/100g de mf). El análisis de aminoácidos deparó los valores más altos con 1461 mg/100g de mf, así como en el análisis de carbohidratos, donde el contenido en fibra dietética, con un aumento del 13 %, fue de los más altos. Y esto pese a pérdidas en azúcares solubles cercanas al 40 %. Los niveles de ácidos grasos fueron los más altos, alcanzando 105 mg/100 g de mf.

