

AVANCES EN EL AISLAMIENTO DE VOLÁTILES EN FRUTAS Y DETERMINACIÓN DE SU CONTRIBUCIÓN SENSORIAL. PARTE II

*Jorge A. Pino**

*Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia,
Carretera al Guatao, km 3½, La Habana, Cuba, C.P. 19 200
E-mail: jpino@iiaa.edu.cu*

RESUMEN

Se abordan las mediciones *in vitro* con sistemas bucales modelo, el análisis global y rápido del *flavor* con el uso de "narices electrónicas", así como las metodologías seguidas para la determinación de la contribución sensorial de los compuestos volátiles en frutas. La potencia de los odorantes en extractos de frutas puede ser determinada por la GC-O en conjunto con la determinación del valor de actividad de olor. A pesar del desarrollo en el equipamiento instrumental, las técnicas sensoriales y el procesamiento de los datos, así como el análisis cualitativo y cuantitativo del *flavor* continúan siendo un desafío.

Palabras clave: compuestos volátiles, frutas, contribución sensorial.

ABSTRACT

Advances in isolation techniques for fruit volatiles and evaluation of their sensory contribution. Part II

The measures *in vitro* with model buccal systems, the global and rapid flavor analysis with the aid of "electronic noses", as well as the methodologies for determination of the sensory contribution of the volatiles in fruits are discussed. The strength of odorants in fruit extracts can be determined by the GC-O together with the determination of the odor activity value. In spite of the development in the instrumental equipment, the sensory techniques and data processing, as well as the qualitative and quantitative analyses of the flavor continues being a challenge.

Key words: volatile compounds, fruits, sensory contribution.

INTRODUCCIÓN

La caracterización y medición del aroma implica el análisis de los compuestos volátiles odoríferos que son detectados en el epitelio olfatorio de la nariz ya sea por las rutas orthonasal (olor) o retronasal (aroma) cuando es ingerido un alimento. El análisis sensorial es el medio más válido para describir las características del *flavor* (sensación conjunta del aroma y sabor). Aplicado al *flavor* de las frutas, la evaluación sensorial es una herramienta descriptiva poderosa.

En la primera parte de este revisión (I) se abordaron los aspectos relacionados con el avance de los métodos instrumentales en el análisis del *flavor* de los alimentos y en esta última parte se abordarán aquellos aspectos relacionados con las mediciones *in vitro* con sistemas bicales modelo, el análisis global y rápido del

**Jorge A. Pino Alea: Licenciado en Química (UH, 1975). Investigador Titular. Doctor en Ciencias Técnicas (CNIC, 1980) y Doctor en Ciencias (IFAL, 2011). Desarrolla su quehacer investigativo en el campo de la Química Analítica de Aromas de Alimentos y Aceites Esenciales.*

flavor con el uso de "narices electrónicas", así como las metodologías seguidas para la determinación de la contribución sensorial de los compuestos volátiles en frutas.

Mediciones *in vitro*: Sistemas bucales modelo

Se han desarrollado dispositivos mecánicos que ayudan a mimetizar el proceso que ocurre en la boca al comer (2). Estos son las "bocas modelo" o sistemas bucales modelo, que comúnmente son variantes del análisis del espacio de cabeza dinámico, pero su función es obtener datos temporales similares a los obtenidos durante los estudios *in vivo*. Los diferentes parámetros, como temperatura, flujo de aire, velocidad de masticación y adición de saliva artificial pueden ser variados para estudiar su efecto en la liberación de los volátiles (3-5). Las ventajas principales son que pueden manipularse grandes cantidades del producto, lo que supera los problemas de sensibilidad encontrados al monitorear concentraciones muy bajas de los compuestos (6) y la supresión de las variaciones inter-individuos, encontradas siempre *in vivo*, que pueden afectar la interpretación de los resultados. La liberación de los compuestos volátiles del simulador de aroma retronasal (RAS) (7), ha sido comparado con la liberación del *flavor in vivo* mediante el uso de detección APCI-MS en ambos casos (8). La entrega de altas concentraciones de volátiles que las presentes en el aliento humano, hacen que el RAS logre una buena aproximación de la liberación del *flavor* en el tiempo en la boca. El dispositivo de sistema bucal modelo desarrollado para estudiar la rehidratación del pimiento (9), así como frijoles y ajo puerro (3) ha sido usado para investigar cambios en la composición del *flavor* en tiempo real durante la masticación de plátanos maduros y verdes (10) o fresa (11). En un estudio reciente, este sistema bucal modelo se ha comparado con el RAS en términos de los efectos de las características fisiológicas orales en la liberación del aroma como una función de las propiedades físico-químicas de emulsiones modelo (12). Ambos fueron capaces para el estudio de los parámetros orales en la liberación del aroma (12) con límites de confirmación de la dimensión temporal de la liberación (12, 13). Datos de tiempo real, comparables a los obtenidos *in vivo*, han sido obtenidos también con un aparato computarizado que sigue la dimensión temporal de la liberación del *flavor* en alimentos líquidos (5). Más recientemente, la liberación de volátiles de manzana ha sido relacionada a la

masticación mediante un sistema bucal modelo diseñado especialmente (14). Un nuevo simulador de masticación que mejora la mimetización de la boca humana también ha sido descrito recientemente (15).

La liberación del *flavor* y su percepción son procesos dinámicos y deben ser estudiados mediante métodos dinámicos (2). Se han desarrollado técnicas dinámicas para estudiar los parámetros de la liberación del *flavor* en los alimentos. Sin embargo, se requiere de más trabajos para comprender las interacciones a diferentes niveles que tiene lugar en el proceso del consumo de un alimento, como: las interacciones entre los ingredientes (16), las interacciones a niveles perceptuales tales como las interacciones aroma-sabor (17, 18) e interferencias trigeminales (18, 19), pues ellas son muy importantes en la percepción global del *flavor*.

Análisis global y rápido del flavor

Los métodos comúnmente usados para evaluar y controlar la calidad del *flavor* de las frutas son aún esencialmente basados en la evaluación sensorial por comisiones de expertos. Estas comisiones entrenadas son capaces de manipular tareas difíciles como monitoreo de la calidad a través del análisis descriptivo, detección de olores ajenos al producto (*off-flavors*) y la comparación de muestras con fines de clasificación. Resulta de interés para tales fines, la sustitución de personas por instrumentos que aporten respuestas rápidas con costos más bajos.

"Nariz electrónica"

La evaluación de la liberación del aroma de los alimentos mediante el uso de sensores de gases, conocidos como "narices electrónicas" (e-noses) es teóricamente factible (20-22). Las "narices electrónicas" están compuestas generalmente por un arreglo de sensores de gases no específicos, basados en diferentes principios físicos (20-22).

Los sensores más comunes son óxidos de metales semiconductores y polímeros orgánicos conductores, los que dan respuestas no específicas a patrones particulares. Por tal razón, es necesario el empleo de programas de reconocimiento de patrones, ya sea mediante análisis multivariante o redes neuronales artificiales,

para el tratamiento de los datos y presentación final de los resultados (20, 22). La "nariz electrónica" es particularmente atractiva para el control de calidad donde se espera una respuesta de conformidad o no conformidad (21). Se han realizado estudios discriminativos en muchos tipos de alimentos con resultados alentadores (20), por ejemplo, en jugos de frutas (23, 24). Si embargo, se han presentado algunos problemas con la repetibilidad del sistema que pueden estar relacionados con el producto evaluado en cuestión, como la técnica de muestreo o el contenido de humedad del aire usado en el muestreo, que limitan su uso en ensayos de rutina (20). La tecnología de semiconductores de óxidos metálicos, a pesar de algunos problemas de envenenamiento que afectan a estos sensores, parece ser más fiable que los sensores de polímeros orgánicos conductores, que muestran una sensibilidad pobre para los compuestos volátiles y son además inestables (25). El peligro de crear clasificaciones falsas debido al "ruido" con el uso de "narices electrónicas" ha sido señalado (26). No obstante, a pesar de algunos éxitos en tareas de clasificación para monitorear maduración de frutas (27-29) y calidad durante la conservación (29-31), estas no han cumplido los requerimientos de la industria alimentaria en términos de precisión, reproducibilidad, sensibilidad y estabilidad (32). Además, es conocido que los sensores se deterioran o envenenan y como consecuencia, cambian sus respuestas. Debido a que la respuesta es global, estos instru-

mentos no pueden identificar odorantes simples o diferenciar muestras con diferencias sutiles en los atributos sensoriales. Por esta razón, es estudios de olores ajenos al producto en donde la identificación del compuesto que causa el daño es un pre-requisito y en el control de calidad, estos instrumentos solo puede usarse exitosamente después de reconocer sus debilidades inherentes (32, 33).

Sistemas basados en espectrometría de masas

Para propósitos de clasificación, se han desarrollado otros dos métodos analíticos globales, basados en la espectrometría de masas (MS) y parecen ser más poderosos y seguros que las "narices electrónicas". El primero consiste en un análisis global de una muestra del espacio de cabeza mediante un espectrómetro de masas operado en modo de ionización electrónica, sin ninguna separación cromatográfica. La posibilidad de este método fue demostrada originalmente para una clasificación rápida de cuatro tipos de quesos franceses (34). Este método es comúnmente llamado como "nariz electrónica basada en espectrometría de masas" (MS e-nose). El patrón de masas obtenido es considerado como una "huella dactilar" del producto analizado, que requiere de un tratamiento de datos, ya sea por análisis multivariante o redes neuronales artificiales (Fig. 1). Numerosas aplicaciones en alimentos han sido reportadas con este método (35-39).

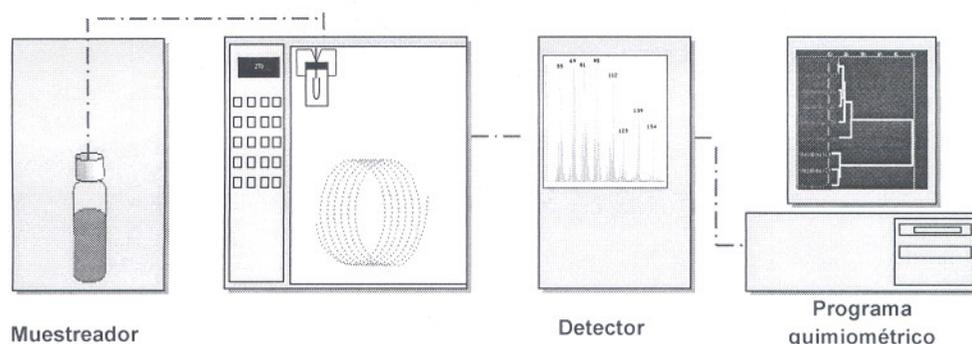


Fig. 1. Diseño de una "nariz electrónica" basada en espectrometría de masas.

La SPME puede ser usada como técnica de preconcentración en lugar del muestro del espacio de cabeza (40, 41). Su aplicación para una valoración rápida de la calidad de manzanas durante su conservación mostró claramente su eficacia, lo que no se logró con el empleo de sensores electrónicos convencionales (30). Durante el estudio de conservación y efecto del cultivar de tomate, el perfil con la MS e-nose indicó un cambio claro en el perfil del aroma con la conservación, cambios que no pudieron ser demostrados con una "nariz electrónica" basada en microbalance de cuarzos (31). Por otra parte, se obtuvo una clara distinción entre los cultivares mediante la MS e-nose, mientras que por la "nariz electrónica" convencional fue muy difícil lograr esta discriminación (31). No obstante, algunos resultados han demostrado el potencial de las "narices electrónicas" convencional y la basada en espectrometría de masas para complementar análisis sensoriales de rutina en tomates (42). Recientemente, se reportó el uso del espacio de cabeza directamente conectado a un espectrómetro de masas con reacción de transferencia de protón (PTR-MS) para estudiar la influencia de la deshidratación sobre la posterior reconstitución del jugo de mandarina (11). La espectrometría de masas del espacio de cabeza también fue reportada para la clasificación de vinos tintos (43).

Desarrollado en la década del 80 para aplicaciones en alimentos, la espectrometría de masas con pirólisis directa es otro método que produce "huellas dactilares" que pueden ser usadas con fines de clasificación y autenticación (44). Con este método, una muestra del producto es pirolizada rápidamente a temperaturas de hasta 530 °C y la fracción volátil resultante es analizada inmediatamente por MS operado en modo de ionización electrónica a baja energía. Aquí nuevamente se obtiene un patrón de masas complejo para cada muestra y generalmente se requiere de sucesivas etapas de pre-procesamiento para seleccionar un número reducido de fragmentos de masas que permitan una clasificación satisfactoria. La MS con pirólisis por punto de Curie asociado a técnicas de análisis multivariante es considerada una herramienta de clasificación poderosa en microbiología para el reconocimiento de microorganismos (45) y en ciencia de los alimentos (41, 44). Una clara ventaja del método es que provee de una "huella dactilar" de la matriz del alimento que puede ser potencialmente relacionada con parámetros de textura (41).

Determinación de la contribución sensorial de los compuestos volátiles

La determinación de la importancia sensorial de un compuesto volátil al *flavor* de un alimento, requiere necesariamente del uso de alguna técnica de evaluación sensorial. Son dos las metodologías desarrolladas para tal fin: una basada en el cálculo de los valores de actividad de olor y otra basada en la olfatometría del efluente de la columna del cromatógrafo de gases (GC-O).

Cálculo de los valores de actividad de olor

La primera etapa en la estimación de la importancia de un compuesto volátil en un alimento en particular es el cálculo de la relación entre su concentración y su concentración umbral del *flavor* (cuando el olor es percibido nasalmente y retronasalmente) o de su concentración umbral de olor (cuando el olor es evaluado solo nasalmente). El resultado se denota como: valor de aroma, unidad de *flavor*, unidad de olor, valor de olor o valor de actividad de olor (VAO). El VAO de los compuestos debe ser calculado sobre la base de sus concentraciones umbrales en un medio semejante al del alimento. Diferentes métodos de aislamiento y cuantificación se han usado, pero sin dudas, el ensayo por dilución isotópica es el más exacto para la cuantificación (46). Según esta técnica, a la muestra del alimento se le adiciona una cantidad conocida del odorante con un isótopo "marcado" y se procede al aislamiento de los compuestos volátiles. Los compuestos aislados son analizados por GC-MS para diferenciar al compuesto original en la muestra y el compuesto "marcado" de acuerdo a algún ión particular del espectro de masas. La cantidad relativa del analito se calcula a partir del área de los dos picos registrados y la cantidad adicionada del analito marcado".

La última etapa del procedimiento analítico es el cálculo del VAO. Si un compuesto tiene un VAO > 1, entonces deberá contribuir significativamente al *flavor* global del alimento. Si se mira a la concentración umbral de un compuesto como una cantidad separada, el VAO de ese compuesto da el número de concentraciones umbrales de tales compuestos presentes en el alimento. La probabilidad de que el olor de un compuesto sea detectada será mayor en la medida que su VAO lo sea. Este valor da una indicación de la importancia de un compuesto al *flavor*. Sin embargo, al menos dos

simplificaciones de este concepto deben ser mencionadas: asumir que la intensidad percibida es proporcional al VAO y el uso frecuente de concentraciones umbrales determinados en medios modelo diferentes al del propio alimento. A pesar de estas limitaciones, el concepto de VAO es aún muy usado como una herramienta poderosa en las investigaciones del flavor de los alimentos (47). Numerosas aplicaciones del concepto VAO se han reportado en frutas (48-52).

Olfatometría del efluente de la columna del cromatógrafo de gases

En las últimas décadas, numerosas técnicas de detección se han combinado con la cromatografía de gases. GC-O es una de ellas, en la que sujetos humanos actúan como detectores y el cromatógrafo de gases como un olfatómetro que entrega dosis pura de odorantes (Fig. 2).

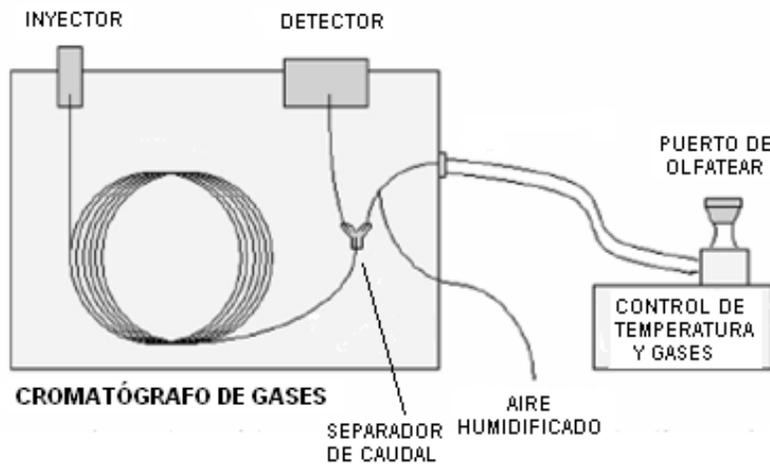


Fig. 2. Esquema de un cromatógrafo de gases equipado con detector olfatométrico.

La nariz humana es en muchas ocasiones más sensible que los detectores físicos por lo que la GC-O posee poderosas capacidades que pueden ser aplicadas en las investigaciones del *flavor*. Las técnicas de olfatometría (*sniffing*) permiten la determinación de los compuestos de impacto de los alimentos. Pueden ser clasificadas en dos categorías: métodos de dilución, que están basados en diluciones sucesivas del extracto de aroma hasta que no se percibe olor en el efluente gaseoso y métodos de intensidad, en los cuales el extracto de aroma solo es inyectado una vez, pero los sujetos deben registrar la intensidad como una función del tiempo.

Los métodos de dilución son los más citados en la literatura (46, 53). Dos variantes son las más comunes: análisis CHARM (54) y análisis de dilución del extracto de aroma (AEDA) (55). Ambas han demostrado

tener eficiencia para determinar los contribuyentes de impacto del aroma de alimentos (46, 49, 50, 53, 55). Sin embargo, para lograr buenos resultados, es necesario conocer: (a) ¿Cuál es el método de muestreo más reproducible por el que se obtenga un extracto representativo del aroma percibido en la nariz?, (b) ¿Cómo deben ser tratados los datos olfatométricos para sobreponerse a la falta de reproducibilidad de las técnicas sensoriales?

Todos los procedimientos de olfatometría están basados en la inyección de un extracto. Su preparación generalmente requiere de una destilación con vapor (por ejemplo: destilación-extracción simultáneas) o una extracción con algún disolvente. Si se asumen recobrados cuantitativos, estas dos alternativas brindan una solución que es más representativa de la composición del *flavor* en la matriz que en la fase vapor que rodea al producto. Dado que solamente los compuestos volátiles

tiles del espacio de cabeza son los que se perciben por la nariz, un aromagrama basado en un extracto no representará cuantitativamente el perfil del olor del producto (56). Adicionalmente, si el extracto debe ser concentrado antes del análisis, ocurrirán pérdidas de los compuestos más volátiles. Además, el disolvente usado para las diluciones sucesivas puede enmascarar los primeros picos cromatográficos que eluyen.

Entre los métodos de dilución, el AEDA no requiere de ningún sofisticado equipamiento. Esta simplicidad también limita su aplicabilidad, debido a que no se registra ninguna señal durante la elución. Por tanto, los datos no pueden ser computarizados en una función continua del tiempo, tal como sucede con el análisis CHARM. La aproximación cuantitativa de Grosch, basada en los VAO (concentración/umbral), ha sido criticada (57). Esta asume que la intensidad percibida es proporcional a la concentración de aroma, en lugar de ajustarse a las leyes de Stevens o Fechner (58, 59), las que son corrientemente aceptadas como las mejores representaciones de las percepciones sensoriales:

Ley de Stevens: $I = k(C - Ct)^n$

Ley de Fechner: $I = k' \ln(C/Ct)$

donde:

I es la intensidad del aroma, C es la concentración de aroma, Ct es el umbral de percepción y k', k, y n, son constantes relativas a un determinado compuesto.

La ley de Stevens parece haber sido verificada para experimentos de olfacción en GC con el registro directo de la intensidad percibida (60).

En el procedimiento CHARM se genera y registra una señal durante la corrida del cromatograma y una computadora hace los cálculos. Una evaluación crítica de estos dos procedimientos de dilución reveló problemas de reproducibilidad (57). Además, un compuesto puede ser no detectado a determinada dilución, aunque se pueda oler nuevamente a una mayor dilución. En otros términos, la anosmia específica, desatención o simplemente el proceso continuo de la respiración del individuo (no hay percepción del olor mientras se exhala el aire) alteran la percepción. El análisis de CHARM ha probado su fiabilidad para determinar odorantes de impacto. Su empleo cuantitativo requiere de réplicas

en las corridas olfativas de al menos tres personas entrenadas. Después que se han hecho las diluciones, esto representa más de 30 inyecciones, lo que implica un tiempo prolongado.

La aplicación de diluciones a las técnicas de umbrales de olor, tales como el AEDA, no aporta información inmediata con relación a la contribución de un odorante al aroma global. Esto se debe a que cada compuesto volátil es completamente vaporizado durante el procedimiento, por lo que este método está basado en umbrales de olor en aire.

El método OSME fue propuesto para obtener información de intensidad en una sola corrida (61). Se ha planteado que hay una buena reproducibilidad de las intensidades de los picos (60), mientras que se reportaron variaciones de la sensibilidad en diferentes días (59).

CONCLUSIONES

En términos de evolución técnica, el uso de métodos de ionización "suaves" (ionización a presión atmosférica, ionización química) en asociación con analizadores de masas de alta resolución (por ejemplo: tiempo-de-vuelo) debe permitir obtener información concerniente al origen molecular de los iones y deducir la identidad de ciertos compuestos presentes en el espacio de cabeza. Tales "huellas dactilares" deberán permitir no solo la caracterización de un producto determinado, sino también la identificación de moléculas directamente responsables de un aroma. Estos avances abren nuevas perspectivas para la caracterización rápida de productos mediante la espectrometría de masas en una amplia gama de aplicaciones.

El desarrollo de métodos de extracción basados en la adsorción de las moléculas del aroma sobre polímeros ha simplificado considerablemente las mediciones de rutina del *flavor*. Estos métodos de extracción por sorción son fáciles de usar y completamente automatizables. La evaluación sensorial permanece obligatoria para estudiar la percepción del *flavor*. Las relaciones entre el aroma presente en un alimento y su percepción sensorial no son fáciles de establecer. Aún no está bien comprendido cómo los componentes activos del *flavor* se combinan para producir una percepción sensorial en particular.

La autenticación de los alimentos y los análisis de rutina rápidos con fines de trazabilidad son otros desafíos. Las herramientas desarrolladas recientemente que combinan métodos instrumentales para una evaluación global del *flavor* con análisis multivariante de datos, han demostrado su utilidad para la clasificación.

La evaluación sensorial es una técnica ampliamente usada para la identificación y medida del olor. Corrientemente, el enfoque actual es la combinación del método instrumental y la evaluación sensorial. La GC-O,

que usa a los cromatógrafos de gases como olfatómetros y a los sujetos humanos como detectores, es una técnica efectiva para el aislamiento y caracterización de los odorantes de productos naturales complejos. La potencia de los odorantes en extractos de frutas puede ser determinada por AEDA en conjunto con la determinación del valor de actividad de olor. A pesar del desarrollo en el equipamiento instrumental, las técnicas sensoriales y el procesamiento de los datos, así como el análisis cualitativo y cuantitativo del *flavor* continúan siendo un desafío.

REFERENCIAS

1. Pino, J. *Cienc. Tecnol. Alim.* (aceptado) 2012.
2. Piggott, J.R. *Food Res. Int.* 33: 191-197, 2000.
3. van Ruth, S.M.; Roozen, J.P. y Cozijnsen, J.L. *Food Chem.* 53: 15-22, 1995.
4. van Ruth, S.M. y Roozen, J.P. *Food Chem.* 71: 339-345, 2000.
5. Rabe, S.; Krings, U.; Banavara, D.S. y Berger, R.G. *J. Agric. Food Chem.* 50: 6440-6447, 2002.
6. Taylor, A.J. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 1: 45-57, 2002.
7. Roberts, D.D. y Acree, T.E. *J. Agric. Food Chem.* 43: 2179-2186, 1995.
8. Deibler, K.D.; Lavin, E.H.; Linforth, R.S.T; Taylor, A.J. y Acree T.E. 2001. *J. Agric. Food Chem.* 49: 1388-1393, 2001.
9. van Ruth, S.M.; Roozen, J.P. y Cozijnsen, J.L. En: *Trends in Flavour Research*, H. Maarse y D.G. Van der Heij (Eds.), Amsterdam, Elsevier, 1994, pp. 59-64.
10. Mayr, D.; van Ruth, S.M. y Mark, T.D. *Eur. Food Res. Technol.* 217: 291-295, 2003.
11. van Ruth, S.M.; Buhr, K. y Delahunty, C.M. En: *2nd International Conference on Proton Transfer Reaction Mass Spectrometry and Its Applications*, A. Hansel y T.D. Märk (Eds.), Innsbruck, Innsbruck University Press, 2005, pp. 81-84.
12. Geary, M.D.; van Ruth, S.M.; Delahunty, C.M.; Lavin, E.H. y Acree, T.E. En: *Handbook of Flavor Characterization*, K.D. Deibler y J. Delwiche (Eds.), New-York, Marcel Dekker, 2004, p. 345-361.
13. Deibler, K.D.; Lavin, E.H.; Linforth, R.S.T; Taylor, A.J. y Acree T.E. 2001. *J. Agric. Food Chem.* 49: 1388-1393, 2001.
14. Arvisenet, G.; Billy, L.; Royer, G. y Prost, C. En: *Flavour Science: Recent Developments and Trends*, W.L.P. Bredie y M.A. Petersen (Eds.), Amsterdam, Elsevier, 2006, pp. 465-468.
15. Salles, C.; Tarrega, A.; Mielle, P.; Maratray, J.; Gorria, P.; Liaboeuf, J. y Liodenot, J.J. *J. Food Eng.* 82: 189-198, 2007.
16. Taylor, A.J. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 1: 45-57, 2002.
17. Noble, A.C. *Trends Food Sci. Technol.* 7: 439-444, 1996.
18. Given, P. y Paredes, D. *Chemistry of taste. Mechanisms, behaviors, and mimics*, ACS Symp. Series 825, Washington D.C., American Chemical Society, 2002, 362 p.
19. Green, B.G. *Trends Food Sci. Technol.* 7: 415-420, 1996.
20. Schaller, E.; Bosset, J.O. y Escher, F. *Lebensm. Wiss. Technol.* 31: 305-316, 1998.
21. Mielle, P. *Trends Food Sci. Technol.* 7: 432-438, 1996.
22. Hodgins, D. En: *Techniques for Analyzing Food Aroma*, R. Marsili (Ed.), New York, Marcel Dekker, 1997, pp. 331-371.
23. Shaw, P.E.; Rouseff, R.L.; Goodner, K.L.; Bazemore, R.; Nordby, H.E. y Widmer W.W. *Lebensm. Wiss. Technol.* 33: 331-334, 2000.
24. Bleibaum, R.N.; Stone, H.; Tan, T.; Labreche, S.; Saint-Martin, E. e Isz, S. *Food Qual. Pref.* 13: 409-422, 2002.
25. Schaller, E.; Bosset, J.O. y Escher, F. *Analisis* 28: 217-227, 2000.
26. Goodner, K.L.; Dreher, J.G. y Rouseff, R.L. *Sens. Actuators B* 80: 261-266, 2006.
27. Pathange, L.P.; Mallikarjunan, P.; Marini, R.P.; O'Keefe, S. y Vaughan, D. *J. Food Eng.* 77: 1018-1023, 2006.
28. Gomez, A.H.; Wang, J.; Hu, G. y Pereira A.G. *Sens. Actuators B* 113: 347-353, 2006.
29. Benedetti, S.; Buratti, S.; Spinardi, A.; Mannino, S. y Mignani, I. *Postharvest Biol. Technol.* 47: 181-188, 2008.
30. Saevels, S.; Lammertyn, J.; Berna, A.Z.; Veraverbeke, E.A.; Di Natale, C. y Nicolai, B.M. *Postharvest Biol. Technol.* 31: 9-19, 2004.
31. Berna, A.Z.; Lammertyn, J.; Saevels, S.; Natale, C.D. y Nicolai, B.M. *Sens. Actuators B* 97: 324-333, 2004.

32. Mielle, P.; Marquis, F. y Latrasse, C. *Sens. Actuators B* 69:287-294, 2000.
33. Reineccius, G. 2002. En: *Food Flavour Technology*, A.J. Taylor (Ed.), Sheffield, Sheffield Academic Press, 2002, pp. 210-251.
34. Vernat, G. y Berdagué, J.L. En: *Bioflavour 95*, P. Etiévant y P. Schreier (Eds.), Versailles, INRA Editions, 1995, pp. 59-62.
35. Fallik, E.; Alkali-Tuvia, S.; Horev, B.; Copel, A.; Rodov, V.; Aharoni, Y.; Ulrich, D. y Schulz, H. *Postharvest Biol. Technol.* 22: 85-91, 2001.
36. Pino J, Pérez J, Martí MP, Busto O, Guasch J. 2002. En: 8a Conf. Intern. Cienc. Tecnol. Alim., La Habana, 23-26 Abril 2002.
37. Dirinck, I.; Van Leuven, I. y Dirinck, P. En: *State-of-the-Art in Flavour Chemistry and Biology. Proc. 7th Wartburg Aroma Symposium*, T. Hofmann; M. Rothe y P. Schieberle (Eds.), 2004, pp. 98-106.
38. Martí, M.P.; Boqué, R.; Pino, J.; Busto, O. y Guasch, J. En: 8a Jornadas Científicas de los Grupos de Investigación Enológica, Valladolid, Valencia, 2005.
39. Sikorska, E.; Chmielewski, J.; Górecki, T.; Khmelinskii, I.; Sikorski, M. y de Keukeleire, D. *J. Inst. Brew.* 113 (1): 110-116, 2007.
40. Marsili, R. *Techniques for Analyzing Food Aroma*, New York, Marcel Dekker, 1997, 383 p.
41. Pérès, C.; Viallon, C. y Berdagué, J.L. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 65:161-171, 2002.
42. Berna, A.Z.; Buysens, S.; Natale, C.D.; Grun, I.U.; Lammertyn, J. y Nicolai, B.M. *Postharvest Biol. Technol.* 36: 143-155, 2005.
43. Dirinck, I.; Van Leuven, I. y Dirinck, P. En: *Flavour Science: Recent Developments and Trends*, W.L.P. Bredie y M.A. Petersen (Eds.), Amsterdam, Elsevier, 2006, pp. 521-524.
44. Aries, R.E. y Gutteridge, C.S. En: *Applications of Mass spectrometry in Food Science*, J. Gilbert (Ed.), London, Elsevier Applied Science, 1987, pp. 377-431.
45. Talon, R.; Walter D.; Viallon, C. y Berdagué, J.L. *J. Microb. Meth.* 48: 271-279, 2002.
46. Dattatreya, B.S.; Kamath, A. y Bhat, K.K. *Food Rev. Intern.* 18(2 & 3): 223-242, 2002.
47. Guth, H. y Grosch, W. En: *Flavor Chemistry: Thirty Years of Progress*, R. Teranishi; E.L. Wick e I. Hornstein (Eds.), New York, Kluwer Academic/Plenum, 1999, pp 377-386.
48. Pino, J. y Quijano, C. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 32 (1): 76-83, 2012.
49. Pino, J.; Marbot, R.; Rosado, A. y Vázquez, C. *Flavour Fragr. J.* 19(1): 32-35, 2004.
50. Pino, J. y Mesa, J. *Flavour Fragr. J.* 21(1): 214-221, 2006.
51. Greger, V. y Schieberle, P. *J. Agric. Food Chem.* 55: 5221-5228, 2007.
52. Steinhaus, M.; Sinuco, D.; Polster, J.; Osorio, C. y Schieberle, P. 2008. *J. Agric. Food Chem.* 56: 4120-4127, 2008.
53. Plutowska, B. y Wardencki, W. *Food Chem.* 101: 845-872, 2007.
54. Acree, T.E. En: *Flavor Science*, T.E. Acree y R. Teranishi (Eds.), Washington, D.C., American Chemical Society, 1993.
55. Ullrich, F. y Grosch, W. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 184: 277-282, 1987.
56. Abbott, N.; Etiévant, P.; Langlois, D.; Lesschaeve, I. e Issanchou, S. *J. Agric. Food Chem.* 41: 777-780, 1993.
57. Abbott, N.; Bayonove, C.; Etiévant, P. e Issanchou, S. En: *Connaissance Aromatique des Cépages et Qualité des Vins*, C. Bayonove, C. Flanzy y J.C. Sapis (Eds.), Montpellier, *Revue Française d'Oenologie* 1993, pp 419-426.
58. Stevens, S.S. *Science* 133: 80-86, 1961.
59. Baird, J. y Noma, E. 1978. En: *Fundamentals of Scaling and Psychophysics*, K. McCorquodale (Ed.), New York, Wiley, 1978, p. 23.
60. Da Silva, A.A.P.; Lundhal, D.S. y McDaniel, M.R. En: *Trends in Flavour Research*, H. Maarse y D.G. van der Heij (Eds.), Amsterdam, Elsevier Science, 1994.
61. McDaniel, M.R.; Miranda-Lopez, R.; Watson, B.T.; Micheals, N.J. y Libbey, L.M. En: *Flavours and Off-flavours*, G. Charalambous (Ed.). Amsterdam, Elsevier Science, 1990, pp. 23-25.