

-RESEÑA-

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

*Jorge A. Pino**

Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia, Carretera al Guatao, km 3 1/2, La Habana, C.P. 19 200, Cuba.

E-mail: jpino@iiaa.edu.cu

RESUMEN

Se resumen los avances recientes hechos con los métodos de extracción por sorción: microextracción en fase sólida y la extracción por sorción con barra de agitación, con énfasis en aplicaciones en frutas, así como la determinación de la importancia sensorial de los compuestos volátiles al *flavor*. Debido a la variedad y composición compleja de las matrices encontradas en las frutas y la clase de información que se pretende obtener de un estudio, resulta de vital importancia la selección del método analítico apropiado. Por razones de objetividad, alta reproducibilidad de los resultados, así como la posibilidad de identificar olores y su estimación cuantitativa, el análisis instrumental constituye no solo un excelente suplemento de la evaluación sensorial, sino también se convierte en una herramienta indispensable en el análisis completo de la calidad sensorial. El enfoque actual es la combinación del método instrumental y la evaluación sensorial. El empleo de cromatógrafos de gases como olfatómetros y de sujetos humanos como detectores (GC-O), es una técnica efectiva para el aislamiento y caracterización de los odorantes. **Palabras clave:** compuestos volátiles, frutas, métodos de aislamiento, contribución sensorial.

ABSTRACT

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

The recent advances with the extraction methods by sorption: solid phase microextraction and stir bar sorptive extraction are summarized, with emphasis in applications in fruits, as well as the determination of the sensorial importance of volatile compounds to the *flavor*. Due to the variety and complex composition of the matrix found in the fruits and the class of information that it is sought to obtain of a study, it is of vital importance the selection of the appropriate analytic method. For reasons of objectivity, high reproducibility of the results, as well as the possibility to identify odors and their quantitative evaluation, the instrumental analysis not only constitutes an excellent supplement of the sensory evaluation, but it also becomes an indispensable tool in the complete analysis of the sensorial quality. The current focus is the combination of the instrumental method and the sensory evaluation. The use of gas chromatograph as an olfactometer and of humans as detector (GC-O) is an effective technique for the isolation and characterization of odorants. **Key words:** volatile compounds, fruits, isolation methods, sensorial 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

***Jorge A. Pino Alea:** *Licenciado en Química (U.H., 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.*

una herramienta descriptiva poderosa. El análisis instrumental de las moléculas de aroma ha sido objeto de importantes estudios (1-9). Los compuestos del aroma son principalmente hidrofóbicos y el análisis instrumental de estos compuestos debe tener en consideración, como una primera etapa, un método de aislamiento capaz de separar estas sustancias hidrofóbicas de la matriz que constituye el alimento. Los métodos de aislamiento tradicionales se han basado, principalmente, en la volatilidad o la polaridad de las sustancias del aroma. Sin embargo, esta revisión, que consta de dos partes, se enfocará en el conocimiento de los avances recientes hechos con los métodos de extracción por sorción: microextracción en fase sólida (SPME según sus siglas en inglés) (10) y la extracción por sorción con barra de agitación (SBSE) (11), con especial énfasis en el *flavor* de las frutas.

Debido a que no existe un método de aislamiento simple con el que se obtenga una representación exacta del aroma del alimento (6, 8); el aislamiento y análisis del aroma continúa siendo un reto (12). El aislamiento puede producir compuestos no presentes originalmente en la muestra (artefactos) y el contenido total de volátiles en muchos casos es muy difícil de relacionar con el perfil sensorial determinado por expertos o consumidores del alimento. Por tanto, parece más eficiente concentrar los esfuerzos en la identificación de aquellos compuestos que realmente aportan a las características sensoriales. Como no existe un método de aislamiento universal, algunos investigadores proponen escoger un método que produzca un extracto tan representativo como sea posible de las propiedades sensoriales del alimento (13-17). Con vista a identificar los compuestos importantes que contribuyen significativamente al *flavor* del alimento, la cromatografía de gases acoplada a la olfatometría (GC-O) es la más utilizada (18, 19), por lo que este método será objeto de un análisis más profundo.

Como aún no se conoce bien cómo varios compuestos volátiles se combinan para producir una impresión sensorial general, es particularmente difícil predecir una percepción del aroma sobre la base de datos solo de GC-O. Los experimentos de recombinación son necesarios (20-22) a pesar de los avances significativos recientes en la comprensión de las mezclas de sustancias odoríferas (23, 24). Por otra parte, las interacciones entre el sabor y el aroma (25) y las

interacciones de las sensaciones trigeminales con el sabor y aroma (26) tienen lugar y desempeñan una función importante en la percepción del *flavor* global. Sin embargo, los métodos que permiten el análisis directo de las moléculas del *flavor* liberadas en la boca durante el consumo del alimento, han sido desarrollados solo en los últimos años (27, 28).

Finalmente se han desarrollado técnicas instrumentales específicas para el análisis global del *flavor* de los alimentos, pero los métodos corrientes empleados en el control de calidad del *flavor* de los alimentos son aún basados en la evaluación sensorial por un comité de expertos. Estos son capaces de monitorear la calidad de un producto en particular, detectar defectos y comparar muestras con fines de clasificación. Sin embargo, la obtención de resultados más rápidos con menor costo mediante instrumentos pudiera ser una alternativa interesante. Las comúnmente llamadas "narices electrónicas" basadas en tecnología de sensores de gases, a pesar de algunas desventajas importantes (29), son teóricamente capaces de hacer tareas de clasificación (30) y algunas aplicaciones se han desarrollado para el análisis de frutas (31, 32).

Otros dos métodos de análisis globales basados en la espectrometría de masas (MS) parecen interesantes con fines de clasificación. El primer análisis de espacio de cabeza con el uso de MS sin previa separación cromatográfica se reportó en 1995 (33). Alternativamente, los muestreos del espacio de cabeza pueden ser reemplazados por la SPME para el empleo de esta técnica (34). Ambos métodos de muestreos, seguidos directamente de la MS (35), han encontrado aplicaciones para la caracterización rápida del *flavor* en fresas (36), jugo de toronja (37) y jugo de mandarina (38). El segundo método es la MS con pirólisis (39), en donde una pequeña cantidad del producto es pirolizada a 500 °C. La fracción volátil resultante, característica del *flavor*, pero también de la composición de la matriz, es analizada por MS. En todos estos métodos instrumentales rápidos se obtiene un patrón o "huella dactilar" para cada muestra, que requiere de un tratamiento extensivo de datos, ya sea por la estadística multivariante tradicional o por redes neuronales, que es necesario para la clasificación o control de calidad (35, 39).

Métodos de extracción por sorción

Todos los procedimientos de extracción empleados para aislar la fracción volátil de un producto alimenticio deben ser adaptados para el análisis de trazas de las moléculas hidrofílicas generalmente presentes en un medio polifásico, con un mínimo de pérdidas de las moléculas altamente volátiles y con la prevención de reacciones de los compuestos, y la formación de artefactos.

La SPME, desarrollada originalmente a principios de la década de los noventa, para la extracción de compuestos orgánicos volátiles en agua (10), ha sido empleada en los últimos 10 años para el aislamiento de compuestos del aroma (6, 40-43). Numerosas aplicaciones están relacionadas con el aroma de las frutas, por ejemplo: fresas (44-48), manzana (49, 50), jugo de naranja (51-54), kiwi (55), frutas tropicales (56),

melón (57), grosella (58), pera, melocotón y albaricoque (59), tomate de árbol (60), camu-camu (61), ciruela (62), guayaba ácida (63), cacao maraco (64), guayaba (65), entre otras.

La SPME particiona los analitos entre una fase líquida o gaseosa y una fase adsorbente sólida fina, entre las que existen diferentes tipos en términos de polaridad y grosor de película (41). Los adsorbentes recubren fibras inertes, generalmente ligadas a un dispositivo que sirve como instrumento de inyección directa (40, 41) (Fig. 1).

El método que opera bajo condiciones de equilibrio, puede realizarse en modo directo (inmersión de la fibra en la muestra, generalmente una solución acuosa o suspensión) (DI-SPME) o en modo de espacio de cabeza (HS-SPME), que es más común (Fig. 2).

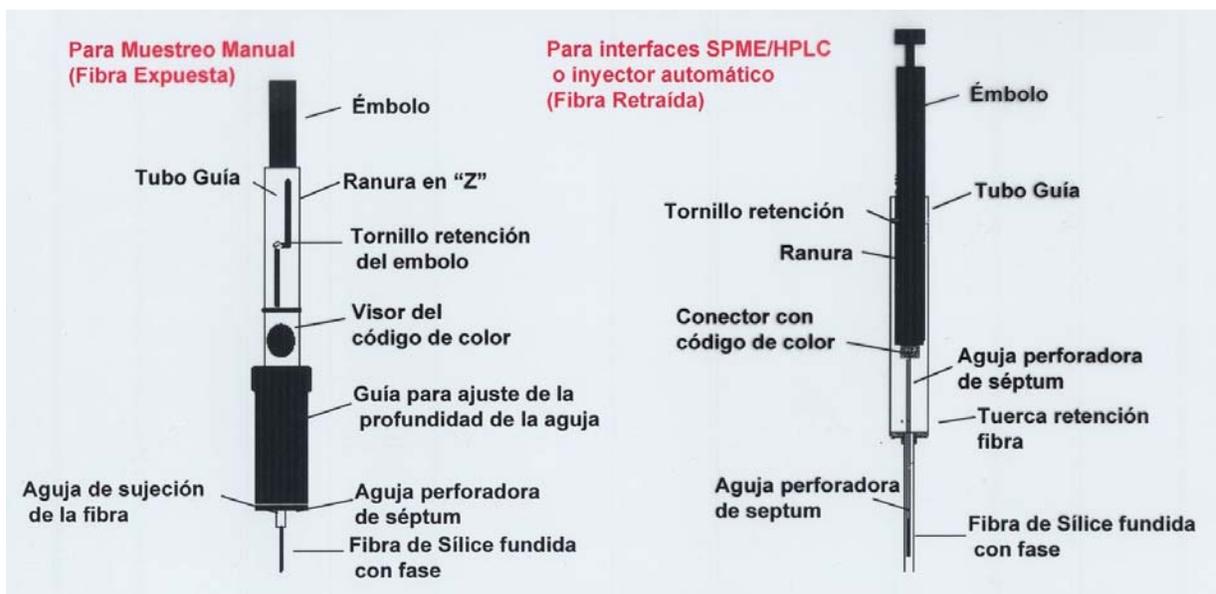


Fig. 1. Soportes con fibras de SPME.

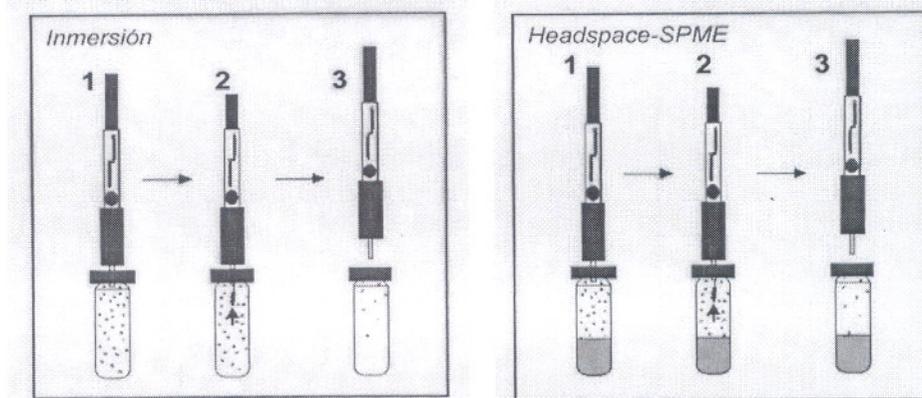


Fig. 2. Extracción directa (DI-SPME) y en el espacio de cabeza (HS-SPME).

Los mecanismos que afectan el análisis de los compuestos volátiles del aroma mediante SPME han sido discutidos en la literatura (66). Por tanto, la técnica presenta un cierto grado de selectividad, pero con la ventaja de la sensibilidad, facilidad de uso, no emplea disolvente y requiere un pequeño tamaño de muestra (6, 40-42). No obstante, cada paso de extracción, es decir, modo de extracción, selección del material de la fibra, parámetros de la extracción (concentración, tiempo, agitación y temperatura) y desorción, se mejoran a través de una cuidadosa optimización para cada aplicación (41, 67-69). La SPME, empleada por primera vez para el análisis de compuestos volátiles de alimentos a mediados de la década del 90 (70, 71), ha sido para aplicaciones importantes en el aroma de los alimentos (41, 42, 72, 73). La SPME ha demostrado múltiples ventajas en términos de rapidez y simplicidad con relación a los métodos de extracción convencionales en varios estudios comparativos en el análisis de fresas (74) y jugos de frutas (75). Aunque la HS-SPME presenta siempre mejores capacidades de retención que el análisis del espacio de cabeza estático (75) y por tanto mayor sensibilidad, la extracción líquida-líquida (74) logra mayor eficiencia. El análisis de compuestos volátiles directamente por inmersión de la fibra en matrices muy complejas puede dañar la fibra y por esto la SPME casi siempre se emplea en modo HS-SPME.

En comparación con otros procedimientos de extracción del espacio de cabeza, es muy común que se concluya que la SPME es más apropiada para análisis de

rutina en el control de calidad, debido a su simplicidad, repetibilidad y bajo costo. Probablemente esta sea la razón por la que este método ha sido ampliamente empleado en trabajos recientes del aroma de los alimentos (72, 73).

La principal limitante de la SPME es el bajo recobrado de extracción, debido a la relativamente poca cantidad de sorbente en la fibra de cuarzo (típicamente cerca de 0,5 μL). La generación de "artefactos" debido a la formación de productos de Maillard, durante la etapa de desorción, ha sido reportada en el estudio del aroma de fresas y manzanas (76). Una reducción importante de la formación de "artefactos" fue obtenida mediante lavado con agua de la fibra antes de la desorción térmica. Sin embargo, la formación de "artefactos" es, a menudo, inevitable y se ha reportado en el análisis de aminas volátiles (77) y compuestos volátiles azufrados (78) en aire. Recientemente se ha descrito el empleo de fibras internamente refrigeradas para el análisis de frutas (79). Por reducción de las temperaturas de adsorción y desorción se ha planteado que la formación de "artefactos" es minimizada con esta variante.

Se ha desarrollado una nueva técnica de extracción que utiliza hasta 200 μL de PDMS (polidimetilsiloxano) para superar la baja sensibilidad de la SPME (11). Esta técnica, llamada extracción por sorción con barra de agitación (*stir bar sorptive extraction*, SBSE) consiste en una barra cilíndrica de agitación magnética, cubierta de PDMS (típicamente de 5 mm de película y

10 mm de longitud), la que se introduce en el medio acuoso por un tiempo determinado (11). Después de completar la etapa de extracción, la barra magnética (*twister*) es transferida a un sistema de desorción térmica y los compuestos atrapados son desorbidos en la cabeza de la columna cromatográfica después de un crío-enfoque del material extraído. Como era de esperar, los recobrados son mayores para la SBSE en comparación con la SPME y los límites de detección son en el rango de ng/L para muchos analitos volátiles y semi-volátiles (11). La SBSE se ha empleado para analizar compuestos volátiles para una amplia variedad de alimentos líquidos (42) que incluyen bebidas de café (80) y de limón (81). A pesar de la optimización del método, algunos problemas de repetibilidad se han encontrado con compuestos muy volátiles o muy solubles (82). Se han reportado "artefactos" debido a la desorción térmica en el análisis de cebollas (83).

Como una extensión de la SBSE, la extracción por sorción del espacio de cabeza (HSSE) se ha desarrollado para superar las limitaciones de la HS-SPME en términos de capacidad de extracción (84). Se han obtenido límites de detección en el rango de ng/L en el análisis de compuestos volátiles (84). La barra de HSSE cubierta con aproximadamente 55 μ L de PDMS se suspende en el espacio de cabeza de la muestra y después de completar el muestreo, los analitos adsorbidos en la barra son térmicamente desorbidos en una unidad térmica conectada al cromatógrafo de gases (80). Al comparar las extracciones de volátiles del café (80), la HSSE mostró una alta capacidad de extracción con respecto a SPME debido a una mayor cantidad de material polimérico. Sin embargo, al igual que la SBSE, la HSSE necesita una unidad de desorción térmica, lo que requiere de una inversión, comparada con la SPME si es empleada en modo manual. No obstante, las barras cubiertas de SBSE y HSSE son menos propensas al deterioro que las fibras de SPME y pueden ser utilizadas en el análisis del espacio de cabeza y en líquidos (80).

Métodos dinámicos de análisis del *flavor*

Partiendo de la suposición de que se han utilizado métodos de extracción e identificación acertados, tratar de correlacionar los compuestos volátiles cuantificados en un alimento con la percepción sensorial experimentada al ingerirlo, en la mayoría de las ocasiones es

fallida. En otras palabras, no es suficiente conocer la composición exacta del alimento en términos de los compuestos del *flavor* para comprender perfectamente la percepción de este, que es un proceso dinámico (85). Durante el consumo del alimento, la concentración de los compuestos volátiles en el epitelio olfativo varía con el tiempo en la medida que ellos son liberados progresivamente durante la masticación del alimento. La cinética de liberación depende de la composición de la matriz del alimento y del comportamiento individual de masticación. Los métodos sensoriales, tales como los de tiempo-intensidad, han sido utilizados para estudiar los aspectos relacionados con el tiempo de la percepción del *flavor* (85).

Liberación de compuestos volátiles *in vivo*

Se han desarrollado métodos que evalúan los compuestos volátiles directamente en la boca o en la nariz para obtener datos que puedan reflejar el patrón de las moléculas de aroma liberados desde el alimento y que están efectivamente presentes en el epitelio olfativo durante el consumo (28). Entre las diferentes aproximaciones para muestrear el aroma de la nariz (espacio de la nariz), la recolección de muestras de aire expiradas mediante trampas de Tenax han dado los resultados más robustos (86, 87). Aplicado a tomate (88) y fresa (89), el método mostró diferencias significativas en comparación con el muestreo del espacio de cabeza, subrayando la importancia de la maceración en la boca.

Por solapamiento de los períodos de tiempo de muestreo, se pueden construir curvas de liberación y determinar los cambios temporales que reflejan las concentraciones relativas de los compuestos volátiles en un tiempo en particular durante el consumo (90). Ha sido reportada la correlación de los datos acumulados con los resultados de tiempo-intensidad sensoriales (91).

El tiempo real *in vivo* de la liberación del *flavor* fue demostrada hace ya algunos años mediante el análisis de una conexión MS-aliento con un separador de membrana acoplado a MS operada en modo de impacto electrónico (92). Los datos de tiempo-intensidad sensoriales medidos en paralelo para la percepción de la 2-pentanona en aceite vegetal, mostraron un efecto de adaptación claro, el estímulo presente en el aire exhalado mucho antes que finalizara la percepción (92). El método también fue empleado en otros trabajos (93,

94); sin embargo, las técnicas de separador de membrana tienen muchas limitantes en términos de selectividad y sensibilidad (95). Recientemente se ha desarrollado la MS por ionización química a presión atmosférica (APCI-MS) para monitorear la liberación del aroma durante la masticación (95). El aire de la nariz (espacio de nariz) es muestreado directamente en la fuente de APCI-MS a través de una interfase que hace posible el análisis de rutina del aliento en tiempo real (27, 28). De esta forma, mediante la combinación de estudios de intensidad sensorial-tiempo con el análisis del espacio de nariz, es posible en la actualidad relacionar parámetros temporales de la liberación del aroma a la percepción (82, 96-99). Las interacciones del aroma con los compuestos del sabor pueden ser estudiada también por este método a través de la liberación controlada de las moléculas del aroma y del sabor a los catadores (99, 100). El método APCI-MS ha sido ampliamente abordado en la literatura especializada (28, 101, 102) y ha sido aplicado recientemente para comparar los compuestos volátiles del aroma emitidos *in vivo* del kiwi en dos estados de madurez (103). Las fuentes de APCI pueden ser conectadas también a un

sistema de MS/MS, tal como una trampa de iones con los beneficios de selectividad y capacidad estructural del MS/MS (104-106).

Otro poderoso método de ionización química es la MS por reacción de transferencia de protón (PTR-MS), desarrollada originalmente para el análisis de gases *online* (107). La especificidad de la PTR-MS comparada con otras formas de ionización química radica en que la generación del ión reactivo y el proceso de ionización química están separados espacial y temporalmente. La optimización individual es posible y la cuantificación es más fácil (108). Desde los primeros trabajos de compuestos volátiles del *flavor* con PTR-MS (108, 109), se han desarrollado muchas aplicaciones (110, 111), estudios del espacio de nariz en plátano fruta (112), fresa (113) y otros alimentos (114-116), así como en sistemas bucales modelo (117, 118).

REFERENCIAS

1. Ho, C. y Manley, C. H. Flavor measurement, New York, Marcel Dekker, 1993, 373 p.
2. Marsili, R. Techniques for Analyzing Food Aroma, New York, Marcel Dekker, 1997, 383 p.
3. Mussinan, C. J. y Morello, M. J. Flavor Analysis. Developments in Isolation and Characterization, Washington D.C., American Chemical Society, 1998, 389 p.
4. Stephan, A.; Bücking, M. y Steinhart, H. Food Res. Int. 33: 199-209, 2000.
5. van Ruth, S.M. En: Physics and Chemistry Basis of Biotechnology, M. De Cuyper y J.W.M. Bulte (Eds.), Amsterdam, Kluwer Academic Publishers, 2001, pp. 305-328.
6. Reineccius, G. 2002. En: Food Flavour Technology, A.J. Taylor (Ed.), Sheffield, Sheffield Academic Press, 2002, pp. 210-251.
7. Deibler, K. D. y Delwiche, J. Handbook of Flavor Characterization. New York, Marcel Dekker, 2004, 493 p.
8. Reineccius, G. En: Flavour in Food, A. Voilley y P. Etiévant (Eds.), Cambridge, Woodhead Publishing Limited, 2006, pp. 81-97.
9. Plutowska, B. y Wardencki, W. Food Chem. 101: 845-872, 2007.
10. Lord, H. y Pawliszyn, J. J. Chromatogr. A 885: 153-193, 2000.
11. Baltussen, E.; Sandra, P.; David, F. y Cramers, C. A. J. Microcolumn Separations 11: 737-747, 1999.
12. Teranishi, R. En: Flavor Analysis. Developments in Isolation and Characterization, C. J. Mussinan y M. J. Morello (Eds.), Washington D.C., American Chemical Society, 1998, pp. 1-6.
13. 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.
14. Abbott, N.; Etiévant, P.; Langlois, D.; Lesschaeve, I. e Issanchou, S. J. Agric. Food Chem. 41: 777-780, 1993.
15. Etiévant, P. X.; Moio, L.; Guichard, E.; Langlois, D.; Lesschaeve, I. y Schlich, P. En: Trends in Flavour Research; Developments in Food Science 35, H. Maarse y D. G. Van der Heij (Eds.), Amsterdam, Elsevier, 1994, pp. 179-191.
16. Etiévant, P.X. y Langlois D. En: 17èmes Journées Internationales Huiles Essentielles, L. Peyron (Ed.), Digne les Bains, APPAM, 1998, pp. 268-278.
17. Mehinagic, E.; Prost, C. y Demaimay, M. J. Food Sci. 68: 2411-2415, 2003.
18. Leland, J.V.; Schieberle, P.; Buettner, A. y Acree, T. E. Gas Chromatography-Olfactometry. The State of the Art, ACS Symp. Series, Washington D.C., American Chemical Society, 2001, 219 p.

19. Lee, S.-J. *Food Sci. Biotechnol.* 12: 597-602, 2003.
20. Buettner, A. y Schieberle, P. J. *Agric. Food Chem.* 49: 2387-2394, 2001.
21. Buettner, A. y Schieberle, P. J. *Agric. Food Chem.* 49: 1358-1363, 2001.
22. Grosch, W. *Chem. Senses* 26: 533-545, 2001.
23. Atanasova, B.; Thomas-Danguin, T.; Langlois, D.; Nicklaus, S. y Etiévant, P. *Flavour Fragr. J.* 19: 476-482, 2004.
24. Atanasova, B.; Thomas-Danguin, T.; Chabanet, C.; Langlois, D.; Nicklaus, S. y Etiévant, P. X. *Chem. Senses* 30: 209-217, 2005.
25. Noble, A.C. *Trends Food Sci. Technol.* 7: 439-444, 1996.
26. Green, B. G. *Trends Food Sci. Technol.* 7: 415-420, 1996.
27. Taylor, A. J. y Linforth, R. S. T. *Trends Food Sci. Technol.* 7: 444-448, 1996.
28. Roberts, D. D. y Taylor, A. J. 2000. *Flavor Release*, ACS Symp. Series, Washington D.C., American Chemical Society, 2000, 484 p.
29. Schaller, E.; Bosset, J. O. y Escher, F. *Analisis* 28: 217-227, 2000.
30. Schaller, E.; Bosset, J. O. y Escher, F. *Lebensm. Wiss. Technol.* 31: 305-316, 1998.
31. 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.
32. Bleibaum, R. N.; Stone, H.; Tan, T.; Labreche, S.; Saint-Martin, E. e Isz, S. *Food Qual. Pref.* 13: 409-422, 2002.
33. Vernat, G. y Berdagué, J. L. En: *Bioflavour 95*, P. Etiévant y P. Schreier (Eds.), Versailles, INRA Ed. 1995, pp. 59-62.
34. Marsili, R. T. *J. Agric. Food Chem.* 47: 648-654, 1999.
35. Pérès, C.; Begnaud, F.; Eveleigh, L. y Berdagué, J. L. 2003. *Trends Anal. Chem.* 22: 858-866, 2003.
36. Berna, A. Z.; Geysen, S.; Li, S.; Verlinden, B. E.; Lammertyn, J. y Nicolai, B. A. *Postharvest Biol. Technol.* 46: 230-236, 2007.
37. Goodner, K. L. y Rouseff R. L. *J. Agric. Food Chem.* 49: 250-253, 2001.
38. van Ruth, S. M.; Frasnelli, J.; Carbonell, L. *Volatile flavour retention in food technology and during consumption: Juice and custard examples.* *Food Chem* 106:1385-1392, 2008.
39. 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.
40. Harmon, A. D. En: *Techniques for Analyzing Food Aroma*, R. Marsili (Ed.), New York, Marcel Dekker, 1997, pp. 81-112.
41. Kataoka, H.; Lord, H. L. y Pawliszyn, J. *J. Chromatogr. A* 880: 35-62, 2000.
42. Pillonel, L.; Bosset, J. O. y Tabacchi, R. *Lebensm. Wiss. Technol.* 35:1-14, 2002.
43. Baltussen, E.; Cramers, C. A. y Sandra P. J. F. *Anal. Bioanal. Chem.* 373: 3-22, 2002.
44. Ulrich, D.; Hoberg, E.; Rapp, A. y Sandke, G. En: *Proc. 5th Wartburg Aroma Symposium*, 1997.
45. Ulrich, D.; Krumbein, A. y Rapp, A. *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.* 93: 311-316, 1997.
46. Ibañez, E.; Lopez-Sebastian, S.; Ramos, E.; Tabera, J. y Reglero, G. *Food Chem.* 63: 281-286, 1998.
47. Song, J.; Fan, L. H. y Beaudry, R. M. *J. Agric. Food Chem.* 46: 3721-3726, 1998.
48. Reid, L. M.; O'Donnell, C. P. y Downey, G. *J. Agric. Food Chem.* 52: 421-427, 2004.
49. Matich, A. J.; Rowan, D. D. y Banks, N. H. *Anal. Chem.* 68: 4114-4148, 1996.
50. Schulz, I.; Ulrich, D. y Fischer, C. *Nahrung-Food* 47: 136-139, 2003.
51. Steffen, A. y Pawliszyn, J. *J. Agric. Food Chem.* 44: 2187-2193, 1996.
52. Jia, M. Y.; Zhang, Q. H. y Min, D. B. *J. Agric. Food Chem.* 46: 2744-2747, 1998.
53. Da Porto, C.; Pizzale, L.; Bravin, M. y Conte, L. S. *Flavour Fragr. J.* 18: 66-72, 2003.
54. Rega, B.; Fournier, N. y Guichard, E. *J. Agric. Food Chem.* 51: 7092-7099, 2003.
55. Wan, X. M.; Stevenson, R. J.; Chen, X. D. y Melton, L. D. *Food Res. Int.* 32: 175-183, 1999.
56. Augusto, F.; Valente, A. L. P.; Tada, E. D. y Rivellino, S. R. *J. Chromatogr. A* 873: 117-127, 2000.
57. Beaulieu, J. C. y Grimm, C. C. *J. Agric. Food Chem.* 49: 1345-1352, 2001.
58. Ruiz del Castillo, M. L. y Dobson, G. J. *Sci. Food Agric.* 82:1510-1515, 2002.
59. Riu-Aumatell, M.; Castellari, M.; Lopez-Tamames, E.; Galassi, S. y Buxaderas, S. *Food Chem.* 87: 627-637, 2004.
60. Quijano, C. y Pino, J. *Cienc. Tecnol. Alim.* 16 (3): 17-22, 2006.
61. Quijano, C. y Pino, J. *J. Essent. Oil Res.* 19: 527-533, 2007.
62. Pino, J. y Quijano, C. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*, 32 (1): 76-83, 2012.
63. Peralta-Bohórquez, A. F.; Parada, F.; Quijano, C. y Pino, J. *J. Essent. Oil Res.* 22: 493-498, 2010.
64. Quijano, C. y Pino, J. *J. Essent. Oil Res.* 21: 211-215, 2009.
65. Quijano, C. y Pino, J. *Rev. Cienc. Quím.* 38 (3): 367-370, 2007.
66. Holt, R. U. *J. Chromatogr. A* 937:107-114, 2001.
67. Bicchi, C.; Drigo, S. y Rubiolo, P. *J. Chromatogr. A* 892: 469-485, 2000.
68. Liu, T. T. y Yang, T. S. *J. Agric. Food Chem.* 50: 653-657, 2002.

69. Doleschall, F.; Recseg, K.; Kemeny, Z. y Kovari, K. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 105:333-338, 2003.
70. Yang, X. y Peppard, T. J. *Agric. Food Chem.* 42: 1925-1930, 1994.
71. Pelusio, F.; Nilsson, T.; Montanarella, L.; Tilio, R.; Larsen, B.; Facchetti, S. y Madsen, J. O. J. *Agric. Food Chem.* 43: 2138-2143, 1995.
72. Le Quéré, J. L. y Etiévant, P. X. *Flavour Research at the Dawn of the Twenty-first Century*, Paris, Lavoisier Tec & Doc, 2003, 780 p.
73. Bredie, W. L. y Petersen, M. A. En: *Developments in Food Science 43*, Amsterdam, Elsevier, 2006, 637 p.
74. Ulrich, D.; Eunert, S.; Hoberg, E. y Rapp, A. *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.* 91: 349-351, 1995.
75. Miller, M. E. y Stuart, J. D. *Anal. Chem.* 71: 23-27, 1999.
76. Verhoeven, H.; Beuerle, T. y Schwab, W. *Chromatographia* 46: 63-66, 1997.
77. Lestremau, F.; Desauziers, V. y Fanlo J. L. *Analyst* 126: 1969-1973, 2001.
78. Lestremau, F.; Andersson, F. A. T. y Desauziers, V. *Chromatographia* 59: 607-613, 2004.
79. Carasek, E. y Pawliszyn, J. J. *Agric. Food Chem.* 54: 8688-8696, 2006.
80. Bicchi, C.; Iori, C.; Rubiolo, P. y Sandra, P. J. *Agric. Food Chem.* 50: 449-459, 2002.
81. Tredoux, A. G. J.; Lauer, H. H.; Heideman, T. y Sandra, P. J. *High Resol. Chromatogr.* 23: 644-646, 2000.
82. Ibañez, C. y Sola, J. En: *Flavour Science: Recent Developments and Trends*, W.L.P. Bredie y M.A. Petersen (Eds.), Amsterdam, Elsevier, 2006, pp. 577-580.
83. Granvogl, M. y Schieberle, P. En: *Flavour Science. Recent Developments and Trends*, W.L.P. Bredie y M.A. Petersen (Eds.), Amsterdam, Elsevier, 2006, pp. 359-362.
84. Tienpont, B.; David, F.; Bicchi, C. y Sandra, P. J. *Microcolumn Sep.* 12: 577-584, 2000.
85. Piggott, J. R. *Food Res. Int.* 33: 191-197, 2000.
86. Linforth, R. S. T. y Taylor, A. J. *Food Chem.* 48: 115-120, 1993.
87. Taylor, A. J. y Linforth, R. S. T. En: *Trends in Flavour Research*, H. Maarse y D.G. Van der Heij (Eds.), Amsterdam, Elsevier, 1994, pp. 3-14.
88. Linforth, R. S. T.; Savary, I.; Pattenden, B. y Taylor A. J. J. *Sci. Food Agric.* 65: 241-247, 1994.
89. Ingham, K. E.; Linforth, R. S. T. y Taylor, A. J. *Food Chem.* 54: 283-288, 1995.
90. Linforth, R. S. T.; Ingham, K. E. y Taylor, A. J. En: *Flavour Science: Recent Developments*, A.J. Taylor y D.S. Mottram (Eds.), Cambridge, The Royal Society of Chemistry, 1996, pp. 361-368.
91. Delahunty, C. M.; Piggott, J. R.; Conner, J. M. y Paterson, A. J. *Sci. Food Agric.* 71: 273-281, 1996.
92. Overbosch, P. En: *Flavour Science and Technology*, M. Martens; G.A. Dalen y H. Russwurm (Eds.), Chichester, John Wiley, 1987, pp. 291-300.
93. Soeting, W. y Heridema, J. *Chem. Senses* 13: 607-617, 1988.
94. Overbosch, P.; Afterof, W. G. M. y Haring, P. G. M. 1991. *Food Rev. Int.* 7:c137-184, 1991.
95. Taylor, A. J.; Linforth, R. S. T.; Harvey, B. A. y Blake, A. *Food Chem.* 71: 327-338, 2000.
96. de Kok, P. M. T. y Smorenburg H. E. En: *Flavor Chemistry. Thirty Years of Progress*, R. Teranishi; E.L. Wick e I. Hornstein (Eds.), New York, Kluwer Academic/Plenum, 1999, pp. 397-407.
97. Linforth, R. S. T.; Hollowood, T. y Taylor, A. J. En: *Frontiers of Flavour Science*, P. Schieberle y K.H. Engels (Eds.), Garching, Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, 2000, pp. 275-278.
98. Salles, C.; Hollowood, T. A.; Linforth, R. S. T. y Taylor A. J. En: *Flavour Research at the Dawn of the Twenty-first Century*, J. L. Le Quéré y P. X. Etiévant (Eds.), Paris, Lavoisier Tec & Doc., 2003, pp. 170-175.
99. Taylor, A. J. y Hort, J. En: *Flavor Perception*, A.J. Taylor y D.D. Roberts (Eds.), Oxford, Blackwell Publishing Ltd., 2004, pp. 1-38.
100. Cook, D. J.; Davidson, J. M.; Linforth, R. S. T. y Taylor, A. J. En: *Handbook of Flavor Characterization*, K.D. Deibler y J. Delwiche (Eds.), New York, Marcel Dekker, 2004, pp. 135-149.
101. Taylor, A. J. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 1: 45-57, 2002.
102. Taylor, A. J. y Linforth, R. S. T. *Int. J. Mass Spectrom.* 223-224: 179-191, 2003.
103. Friel, E. N.; Wang M.; Taylor, A. J. y MacRae, E. A. J. *Agric. Food Chem.* 55: 6664-6673, 2007.
104. Haahr, A. M.; Madsen, H.; Smedsgaard, J.; Bredie, W. L. P.; Stahnke, L. H. y Refsgaard, H. H. F. *Anal. Chem.* 75: 655-662, 2003.
105. Sémon, E.; Gierczynski, I.; Langlois, D. y Le Quéré, J.L. En: *Advances in mass spectrometry*, A.E. Ashcroft; G. Brenton y J. J. Monaghan (Eds.), Amsterdam, Elsevier. CD-ROM Supplement, abstract 324, 2003.
106. Le Quere, J.-L.; Gierczynski, I.; Langlois, D. y Sémon, E. En: *Flavour Science: Recent Advances and Trends*, W. L. P. Bredie y M. A. Petersen (Eds.), Amsterdam, Elsevier, 2006, pp. 589-92.
107. Lindinger, W.; Hirber, J. y Paretzke, H. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 129: 79-88, 1993.

108. Yeretizian, C.; Jordan, A.; Brevard, H. y Lindinger, W. Flavor Release, En: D. D. Roberts y A. J. Taylor (Eds.), Washington D.C., American Chemical Society, 2000, pp. 58-72.
109. Yeretizian, C.; Jordan, A.; Brevard, H. y Lindinger, W. Flavor Release, En: D.D. Roberts y A.J. Taylor (Eds.), Washington D.C., American Chemical Society, 2000, pp. 112-123.
110. Blank, I.; Devaud, S.; Matthey-Doret, W.; Pollien, P.; Robert, F. y Yeretizian, C. En: Flavour Research at the Dawn of the Twenty-first Century, J. L. Le Quéré y P. X. Etiévant (Eds.), Paris, Lavoisier Tec & Doc., 2003, pp. 458-463.
111. Mayr, D.; Hartungen, E., Märk, T.; Margesin, R. y Schinner, F. En: Flavour Research at the Dawn of the Twenty-first Century, J.L. Le Quéré y P.X. Etiévant (Eds.), Paris, Lavoisier Tec & Doc., 2003, pp. 757-760.
112. Mayr, D.; Märk, T.; Lindinger, W.; Brevard, H. y Yeretizian, C. En: Flavour Research at the Dawn of the Twenty-first Century, J.L. Le Quéré y P.X. Etiévant (Eds.), Paris, Lavoisier Tec & Doc., 2003, pp. 256-259.
113. 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.
114. Roberts, D. D.; Pollien, P.; Antille, N.; Lindinger, C. y Yeretizian, C. J. Agric. Food Chem. 51: 3636-3642, 2003.
115. Roberts, D. D.; Pollien, P.; Yeretizian, C. y Lindinger, C. En: Handbook of flavor characterization, K.D. Deibler y J. Delwiche (Eds.), New York, Marcel Dekker, 2004, pp. 151-162.
116. Buettner, A.; Otto, S.; Beer, A.; Mestres, M.; Schieberle, P. y Hummel, T. Food Chem. 108: 1234-1246, 2008.
117. van Ruth, S. M.; Buhr, K.; Geary, M.; Dings, L. y Odake, S. En: Flavour Research at the Dawn of the Twenty-first Century, Le Quéré J L, Etiévant PX (Eds.), Paris, Lavoisier Tec & Doc., 2003, pp. 176-181.
118. van Ruth, S.; Geary, M. D. y Buhr, K. En: Handbook of Flavor Characterization, K.D. Deibler y J. Delwiche (Eds.), New-York, Marcel Dekker, 2004, pp. 335-344.