

DESARROLLO DE UN MÉTODO POR HS-SPME PARA EL ANÁLISIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN EXTRACTOS DE CAFÉ

Jorge A. Pino^{1*} y Clara E. Quijano-Celis²

¹Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria

Carretera al Guatao, km 3 1/2, La Habana, Cuba, C.P. 19200.

²Departamento de Química. Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia.

E-mail: jpino@iiaa.edu.cu

RESUMEN

Se desarrolló y optimizó un método analítico, basado en la microextracción en fase sólida del espacio de cabeza, para los compuestos volátiles de extractos hidroalcohólicos de café. Las condiciones óptimas fueron las siguientes: fibra de PDMS/DVB (65 m), 2 mL de extracto a 40 % etanol y 6 mL de agua Milli-Q, 0,80 g de cloruro de sodio, agitación a 100 rev/min, 15 min de pre-extracción, 25 min de extracción a 50 °C y 2 min de desorción. La validación parcial del método indicó que es lineal en el rango hasta 2 mL de extracto, posee buena repetibilidad y reproducibilidad (coeficiente de variación menor a 1 % para el área total) y es robusto para las condiciones analíticas evaluadas.

Palabras clave: extracto de café, compuestos volátiles, SPME, GC.

ABSTRACT

Development of a HS-SPME method for the analysis of volatile compounds in coffee extracts

An analytical method for volatile compounds in coffee hydroalcoholic extracts, based on headspace-solid phase microextracción, was developed and optimized. The optimized conditions were: PDMS/DVB (65 m) fiber, 2 mL extract at 40% ethanol and 6 mL Milli-Q water, 0.80 g sodium chloride, agitation at 100 rpm, 15 min pre-extraction, 25 min extraction at 50°C and 2 min desorption. The partial validation of the method indicated that it is lineal in the range up to 2 mL of extract, it possesses good repeatability and reproducibility (relative standard deviation lower than 1% for the total area) and it is robust for the evaluated analytical conditions.

Keywords: coffee extract, volatile compounds, SPME, GC.

INTRODUCCIÓN

El aroma de café debido a su originalidad, fuerza y carácter ha motivado durante años a los investigadores al descubrimiento de la identidad de los principales constituyentes. Este, de forma similar al de otros productos alimenticios, se debe a la presencia de compuestos volátiles. Las clases de compuestos volátiles reportadas en el café incluyen ácidos, aldehídos, alcanos, alquenos, ésteres, furanos, cetonas, lactonas, oxasoles, fenoles, piridinas, pirazinas, pirroles y compuestos azufrados. En la actualidad se conoce que solamente un pequeño número de compuestos volátiles son los responsables del aroma del café y estos se agrupan fundamentalmente dentro de los compuestos azufrados y bases (1-4).

**Jorge A. Pino Alca: Licenciado en Química (UH, 1975). Investigador Titular. Doctor en Ciencias Técnicas (CINC, 1980). Jefe del Laboratorio del Departamento de Aromas, perteneciente a la Vicedirección de Bebidas. Desarrolla su quehacer investigativo en el campo de la Química Analítica de Aromas de Alimentos y Aceites Esenciales.*

En los estudios del perfil aromático del café y sus bebidas se han utilizado diferentes métodos de aislamiento. La mayoría de estos métodos requieren de etapas de concentración o de equipos complejos. Un método alternativo es la microextracción en fase sólida del espacio de cabeza (HS-SPME), que es relativamente rápido, económico y no requiere de equipamiento complejo. Esta técnica se ha empleado satisfactoriamente en el café y sus bebidas (5-8). En la comparación de diferentes fibras, la fibra de PDMS tuvo una baja sensibilidad pues es de baja polaridad; la fibra de Carboxen/PDMS tuvo mayor sensibilidad hacia moléculas más pequeñas. Sin embargo, con esta fibra se apreciaron colas en los picos cromatográficos de compuestos altamente polares; mientras que con la fibra de PDMS/DVB se logró la mejor sensibilidad (6). No obstante, la fibra de DVB/CAR/PDMS comparada contra PDMS/DVB fue mejor para bebidas de café pues dos importantes componentes de impacto: 2,3-pentanodiona y 2-furfural, fueron menos extraídos por esta última (9). El estudio de volátiles *in situ* en el HS para café molido con tres fibras, indicó que con PDMS/DVB los porcentajes de recuperación de áreas para compuestos de impacto fueron mayores (10). Sin embargo, se observó que para diferenciar *C. arabica* y *C. robusta* se emplearon fibras de PDMS (11-13). El análisis estático del espacio de cabeza por cromatografía de gases requiere una optimización cuidadosa de parámetros instrumentales como tiempo de equilibrio y temperatura. Se ha reportado que a mayor temperatura de equilibrio ocurre una mejor extracción de los compuestos volátiles y no se aprecian diferencias cualitativas. Cuando el tiempo de equilibrio aumenta, la cantidad de compuestos volátiles también se incrementa (14). Los trabajos publicados sobre aroma de café mediante la técnica de HS-SPME reportan la optimización de la temperatura y tiempo de extracción, pero ninguno considera la interacción de las variables que les proporcione una respuesta máxima mediante un diseño de superficie de respuesta.

Recientemente se definió en el país un proceso tecnológico con el objetivo de obtener extractos hidroalcohólicos de café para su empleo como saborizante (15). Esta tecnología requiere de un método analítico para caracterizar la composición de volátiles y que sirva además para poderlo establecer como un posible método de control de calidad del proceso.

El objetivo del presente trabajo fue establecer un método para el análisis de los componentes volátiles presentes en extractos hidroalcohólicos de café.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para realizar la optimización del método de HS-SPME se empleó una muestra representativa (1 L) de extracto de café según la tecnología desarrollada (15). El extracto tuvo un contenido de etanol de 40 % (v/v). Esta muestra fue el resultado de una mezcla de cinco extracciones a escala piloto. Como materia prima para las extracciones se empleó el café comercial cubano en grano con grado de tostado medio (Turquino®), molido hasta un tamaño de partícula de 0,420 a 0,500 mm y guardado en bolsas multicapas en un lugar fresco hasta realizar las extracciones.

Para las experiencias de HS-SPME se pesaron 2 mL de cada uno de los extractos en un vial de 15,0 mL con tapa rosca y membrana de silicona (protegida con capa de teflón), se adicionaron 0,800 g de NaCl P.A. y 6 mL de agua Milli-Q. Se seleccionó la fibra de PDMS/DVB (65 m) de acuerdo a la literatura (6,10). Se optimizaron la temperatura (40 a 60 °C) y el tiempo de extracción (5 a 25 min). Según las condiciones óptimas: la muestra se calentó a 50 °C, y se mantuvo con agitación constante (100 rev/min) durante 15 min, luego la fibra fue expuesta al HS sobre la muestra por 25 min. El análisis por GC se realizó en un equipo Hewlett-Packard 6890 acoplado a un detector selectivo de masas HP 5973 (EE.UU.). La inyección se realizó a modo *splitless/split* con un tiempo de 4 min a 250 °C. Se utilizó una columna HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) y helio como gas portador a un flujo de 0,9 mL/min. El programa de temperatura fue de 4 min a 50 °C, rampa hasta 250 °C, con velocidad de 4 °C/min e isotérmico final por 10 min. Los espectros de masas fueron adquiridos en modo de impacto electrónico a 70 eV en un rango m/z de 35 a 400 uma. La identificación de los compuestos se realizó por comparación de los espectros de masas con los de sustancias patrones y con librerías comerciales (NIST 05, Wiley y Adams 2001).

La Tabla 1 muestra que la optimización para la HS-SPME (tiempo y temperatura de extracción) se realizó por la técnica de superficie de respuesta, los factores y rangos de extracción. En cada caso se definió un modelo cuadrático con tres niveles para cada una de las

variables (modelo 32) que llevó 13 experimentos en total (con cinco réplicas en el centro del modelo). Se definieron como variables de respuesta el logaritmo en base 10 del área total del cromatograma y el número de picos cromatográficos detectados.

Tabla 1. Variables empleadas en el diseño de superficie de respuesta

Símbolo	Factor	Niveles codificados		
		-1	0	+1
X ₁	Temperatura (°C)	40	50	60
X ₂	Tiempo (min)	5	15	25

Se realizó una validación parcial del método optimizado mediante la determinación de los procedimientos siguientes: linealidad, precisión (expresada como repetibilidad y reproducibilidad) y robustez según la NC-TS 368:2004 (16). Para el estudio de linealidad se prepararon cuatro diluciones a partir de una muestra inicial por adición de etanol a 40 %, que fueron analizadas por el método optimizado. La repetibilidad se determinó a partir de 10 análisis efectuados a la misma muestra en un mismo día de trabajo, mientras que la reproducibilidad interna se determinó a partir de 10 análisis hechos a la misma muestra anterior, pero pasados 15 días del primer grupo de análisis. La robustez se evaluó para siete factores: tiempo de extracción (25 y 26 min), temperatura (50 y 55 °C), cantidad de cloruro de sodio (0,80 y 0,82 g), cantidad de muestra (2,0 y 2,1 mL), agitación (100 y 80 rev/min) y dos fibras de la misma fase.

Para el procesamiento estadístico se utilizaron los programas Design-Expert ver. 5.0.7 (STAT-EASE Inc., 1996, Minneapolis, EE.UU.) y Statistica ver. 6 (StatSoft Inc., 1998, Tulsa, EE.UU.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el presente trabajo se seleccionó una fibra PDMS/DVB pues estudios previos en el aroma de café han reportado que tiene mejor sensibilidad (6) y mejores porcentajes de recuperación de áreas para compuestos impactos (10, 17). Esta es una fibra que se emplea para extraer compuestos medianamente polares

y de bajo peso molecular, característicos del aroma de café tostado. Además, se adicionó cloruro de sodio para incrementar la concentración de los analitos en el espacio de cabeza. De esta manera aumenta la cantidad de analitos sorbidos sobre la fibra en menor tiempo de extracción. La proporción muestra:agua de 2:6 que se fijó para minimizar el espacio de cabeza del vial y lograr así una mayor concentración de los analitos en la fase vapor, así como para lograr un grado alcohólico final de 10 %, que minimice la competencia del etanol por la fibra con relación al resto de los analitos presentes en menor concentración (18).

La reproducibilidad y sensibilidad de los compuestos volátiles en el espacio de cabeza determinado por SPME, son influenciadas considerablemente por la presión de vapor de los compuestos. A su vez, el tiempo y la temperatura de extracción, son dos de los factores que más afectan la presión de vapor y el equilibrio del sistema. El rango de temperatura seleccionado para el diseño de superficie de respuesta fue de 40 a 60 °C. Se fijó de acuerdo a los resultados de la literatura (8, 19) donde se encontró un valor óptimo de 40 °C para café tostado; otros estudios (20-22) reportaron un óptimo a 60 °C. Sin embargo, se reportó que a 60 °C disminuyó el área de los picos cromatográficos (19). El rango de tiempo se seleccionó por dos razones fundamentales: (I) se ha reportado una extracción óptima a 15 min y 60 °C (22); (II) se ha encontrado que después de 5 min de extracción a 60 °C, el área de los picos cromatográficos disminuyó considerablemente (19). El tiempo de equilibrio seleccionado se fijó en 15 min, considerado suficiente para que el sistema equilibre su temperatura.

La Tabla 2 presenta el programa de los experimentos evaluados y las respuestas. La Fig. 1 muestra que la gráfica de los valores predichos y observados en función del número de experimentos permite establecer a simple vista que existió una correlación entre las respuestas.

La Fig. 2 indica la superficie de respuesta para el diseño evaluado. Se encontró una respuesta máxima del log del área total y el número de picos a temperaturas cercanas a 50 °C y tiempos alrededor de 25 min. Al aumentar la temperatura y tiempo de extracción se observa que la respuesta aumentó, debido a que la presión de vapor de los analitos aumentó y por lo tanto su concentración en el espacio de cabeza. Sin embargo, aumentar demasiado la temperatura desfavorece la ex-

extracción debido a que la adsorción sobre la fibra es un proceso exotérmico. No se estudió un tiempo de extracción mayor a 25 min, pues es práctico que el tiempo total (45 min) para efectuar la SPME sea menor que el tiempo total de la corrida cromatográfica (60 min).

Tabla 2. Optimización de la HS-SPME

Experimento No.	X ₁	X ₂	Area total (log ₁₀)	No. picos
1	-1	-1	8,78	135
2	-1	0	8,80	169
3	0	0	8,87	168
4	0	+1	8,94	180
5	0	-1	8,80	153
6	0	0	8,86	168
7	-1	+1	8,86	170
8	0	0	8,87	171
9	+1	0	8,89	170
10	0	0	8,87	171
11	+1	-1	8,78	152
12	+1	+1	8,85	170
13	0	0	8,86	169

El análisis de varianza para los modelos de regresión cuadrática demostró que el valor F de los modelos fue mayor que el valor F de la tabla, por lo tanto se rechazó la hipótesis nula y se concluyó que los modelos y las diferencias fueron significativas. La probabilidad de que los modelos cuadráticos no expliquen satisfactoriamente las interacciones de las variables fue muy baja.

La Tabla 3 refleja los resultados del diseño de superficie de respuesta con las variables codificadas.

A partir de las respuestas para el diseño de superficie de respuesta (Tabla 2) se obtuvo un modelo polinomial de segundo orden que fue empleado para expresar la respuesta como una función de las variables independientes:

$$Y = B_0 + B_1 \cdot X_1 + B_2 \cdot X_2 + B_{11} \cdot X_1^2 + B_{22} \cdot X_2^2 + B_{12} \cdot X_1 \cdot X_2$$

donde: Y representa la respuesta de los modelos (log área y número de picos cromatográficos), B₀, B₁, B₂, B₁₁, B₂₂ y B₁₂ son constantes y coeficientes de la regresión del modelo, mientras que X₁ y X₂ son los factores codificados (Tabla 1).

Tabla 3. Diseño de superficie de respuesta (variables codificadas)

Factor	Coeficiente estimado		Desviación estándar		t		p	
	log área	No. picos	log área	No. picos	log área	No. picos	log área	No. picos
Intercepto	8,868	170,759	0,006	1,5	-	-	-	-
X ₁ - temperatura	0,016	3,000	0,006	1,5	2,494	1,995	0,04	0,086
X ₂ - tiempo	0,054	13,333	0,006	1,5	8,519	8,868	<0,0001	<0,0001
X ₁ ²	-0,039	-4,655	0,009	2,2	-4,264	-2,100	0,003	0,073
X ₂ ²	0,0009	-7,655	0,009	2,2	0,102	-3,454	0,921	0,010
X ₁ X ₂	0,007	-4,250	0,007	1,8	0,930	-2,307	0,383	0,054

Para el modelo obtenido con el logaritmo del área total resultaron significativos la temperatura (X₁) y el tiempo de extracción (X₂), correspondiéndole a este último factor el mayor peso en el modelo. El coeficiente del término cuadrático de la temperatura (X₁²) resultó con signo negativo y más alto que el del término lineal (X₁), por lo que puede afirmarse que un incremento de la temperatura no favoreció el aumento de la variable de respuesta. El factor de interacción entre la temperatura y tiempo de extracción (X₁X₂) resultó no ser significativo.

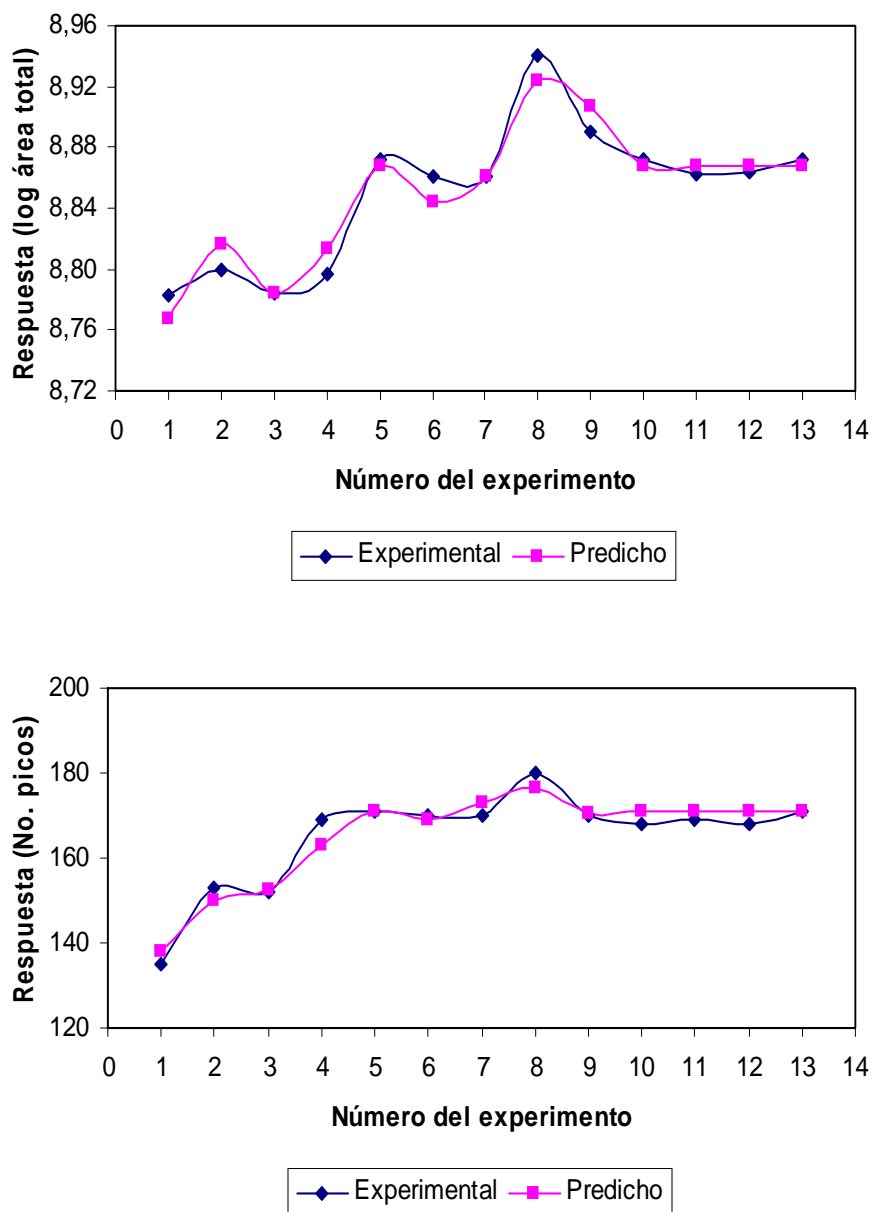


Fig 1. Valores de respuesta predichos y observados en función del número de experimento.

Para el modelo obtenido con el número de picos cromatográficos resultaron significativos tanto la temperatura como el tiempo de extracción, en sus términos lineales y cuadráticos, así como la interacción de ambos factores. El análisis de cada coeficiente indica, de forma similar al modelo anterior, que el tiempo (X_2 y X_2^2) tuvo el mayor peso en el modelo. También aquí el término cuadrático de la temperatura (X_1^2) tuvo un coeficiente negativo y mayor que el lineal (X_1), por lo que el resultado neto de un aumento de temperatura fue una disminución en el número de picos cromatográficos.

El hecho de que en los dos modelos el factor temperatura haya tenido una relación inversa con las variables de respuesta puede ser explicado porque si bien un incremento en la temperatura de la muestra causa un aumento de la concentración de volátiles en el espacio de cabeza, el proceso de absorción en la fibra de SPME involucra un proceso exotérmico, por lo que esta extracción de los analitos decrece con el aumento de la temperatura. Por tanto, los resultados indican que el efecto que primó en los experimentos fue la absorción y no la vaporización de los analitos volátiles.

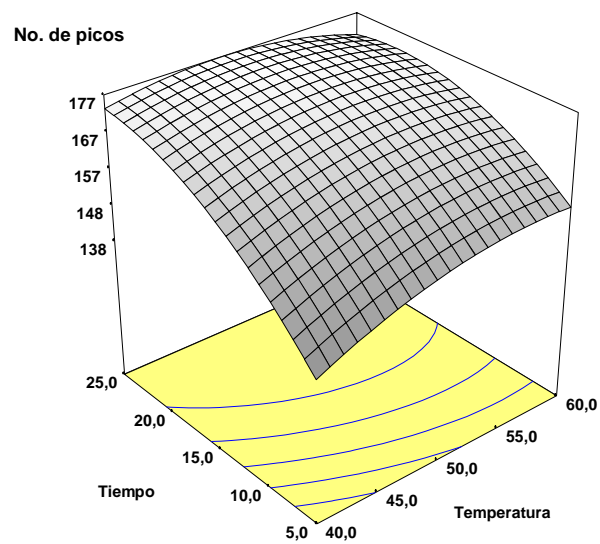
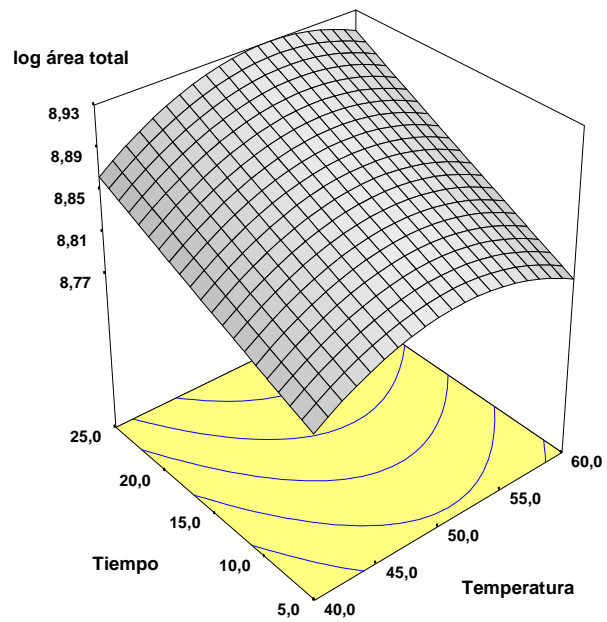


Fig. 2. Superficie de respuesta para el efecto de temperatura y tiempo de extracción.

Asumiendo los coeficientes significativos del modelo de regresión múltiple, se obtuvieron las siguientes ecuaciones descodificadas:

$$Y_1 = 7,772 + 0,040 \cdot T + 0,001 \cdot t - 0,0004 \cdot T^2 \quad R^2 = 0,935$$

$$Y_2 = -29,719 + 5,593 \cdot T + 5,745 \cdot t - 0,046 \cdot T^2 - 0,076 \cdot t^2 - 0,042 \cdot T \cdot t \quad R^2 = 0,942$$

donde: Y_1 representan el logaritmo del área total y Y_2 el número de picos cromatográficos, mientras que T y t son la temperatura y el tiempo de extracción.

El coeficiente de determinación de las ecuaciones (R^2) fue 0,935 y 0,942 para las dos variables de respuesta (logaritmo del área total y número de picos), lo que significa que los modelos explican 94 % de la variabilidad de los experimentos. Estos valores resultan aceptables para considerar adecuados los modelos.

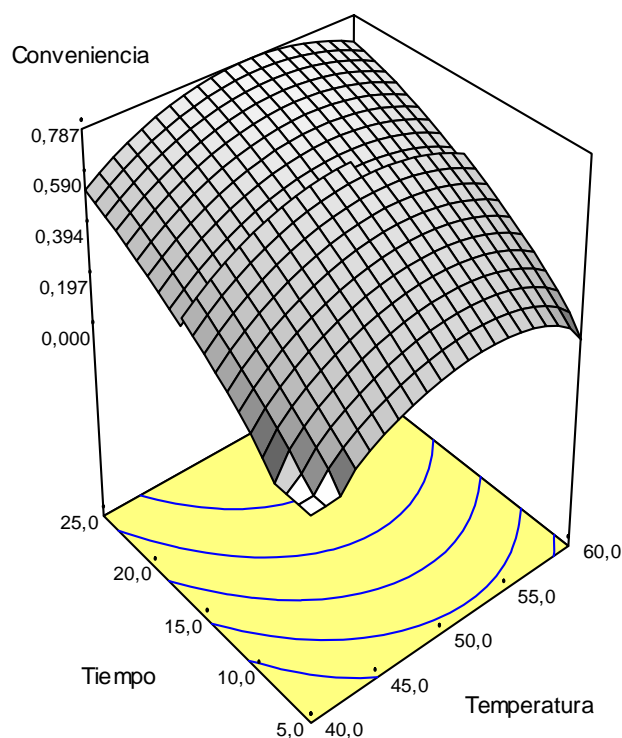
Los residuos se deben a dos causas fundamentales: el efecto de todas las fluctuaciones debido al proceso en condiciones estacionarias (llamado efecto de error puro) y por la utilización de un modelo inadecuado (llamado efecto de inadecuación del modelo o error explicado). El gráfico de los residuos y los valores predichos por el modelo es una de las formas de saber si el modelo es adecuado o no. Para ambos modelos, los residuos oscilaron entre valores positivos y negativos con los valores predichos y por tanto no existieron factores no considerados.

Una vez comprobados el buen ajuste y adecuación de los dos modelos se procedió a la optimización de ambas variables de respuesta mediante su maximización, bajo el criterio de que una mayor área total conduce a una mayor sensibilidad de la técnica analítica y de que un mayor número de picos cromatográficos conduce a una mejor apreciación del perfil de volátiles (asumiendo que no son originados como "artefactos" por la propia técnica analítica).

La Fig. 3 refleja la superficie de respuesta obtenida para la optimización de las dos variables de respuesta. Del gráfico de contorno, la zona definida por los rangos de temperatura de 50 a 55 °C y tiempo de 25 min, fue sugerida como la más adecuada para el análisis de los compuestos volátiles de los extractos hidroalcohólicos de

café. En esta zona se obtuvieron valores superiores a 0,79 (de un máximo de uno) para la función de conveniencia (*desirability function*).

Por tanto, se definieron para el análisis por HS-SPME de los compuestos volátiles de extractos hidroalcohólicos de café, las condiciones óptimas siguientes: fibra de PDMS/DVB (65 m), 2 mL de extracto a 40 % etanol y 6 mL de agua Milli-Q, 0,8 g de cloruro de sodio, agitación de 100 rev/min, 15 min de tiempo de pre-extracción, 25 min de extracción a 50 °C y desorción por 2 min.



La selección y desarrollo de métodos analíticos siempre ha sido un tema importante para los laboratorios de ensayo que trabajan en el sector alimentario. En el camino hacia la adopción oficial de un método se prevé la necesidad de demostrar que el método puede aplicarse con buenos resultados. También se va concediendo a los analistas mayor libertad en la elección de los métodos de ensayo, siempre y cuando el método elegido satisfaga determinadas condiciones. Con el fin de crear confianza en los resultados analíticos, obtenidos a través de un método de ensayo, reportados por un laboratorio, el método utilizado debe cumplir ciertos requisitos de calidad.

Se entiende por validación en este contexto las mediciones realizadas para comprobar y describir que un método opera en todo momento de acuerdo con las expectativas y los requisitos impuestos respecto a su exactitud, uso, implantación y fuentes de error. Dado que el método desarrollado pretende determinar cuali-y cuantitativamente (porcentaje de área del cromatograma) el perfil de volátiles se consideraron los siguientes procedimientos de una validación: linealidad, precisión (expresada como repetibilidad y reproducibilidad) y robustez. Otros procedimientos como la veracidad, límite de detección y cuantificación, sensibilidad y especificidad no se tuvieron en cuenta porque no se trata de la determinación de concentraciones absolutas.

La linealidad es la capacidad de un método analítico de obtener resultados linealmente proporcionales a la concentración de analito en la muestra, dentro de un intervalo determinado. Se considera como un criterio inicial de validación.

La Fig. 4 muestra los resultados del estudio de la linealidad del método, donde se aprecia que existió un buen ajuste entre la variable de respuesta área total y las diluciones que se le hicieron a los 2 mL originales. Esto indica que el método responde a diluciones proporcionales de la muestra.

La Tabla 4 presenta los resultados de 10 réplicas de una muestra con diferencia de 15 días, donde se aprecia que tanto la repetibilidad como la reproducibilidad, determinadas por los coeficientes de variación, fueron muy buenas (RSD_r y $RSD_R < 1\%$).

La robustez se define como la influencia en la sensibilidad de un método analítico ante desviaciones menores en las condiciones experimentales del método. Se dice que un método es robusto si no es apreciablemente influido por tales condiciones. La Tabla 5 muestra las diferencias promedio para las condiciones analíticas variadas, donde se aprecia que ninguna fue mayor que la desviación típica, por lo que puede afirmarse que el efecto de los cambios realizados fue menor que el error analítico.

El principal objetivo de una prueba de robustez es identificar las condiciones que deben ser cuidadosamente controladas y descubrir aquellas circunstancias bajo las cuales se necesita un cuidado especial. Los resultados presentes fueron muy adecuados para este propósito, aunque debe controlarse bien el tiempo de extracción.

Tabla 4. Estudio de repetibilidad y reproducibilidad del método

Parámetro	Mediciones 1ra semana	Mediciones 2da semana
	880014000	881024000
	878001510	879101300
	883021000	880012100
	881030000	881030000
	882020100	880320100
	875983000	878983000
	881140000	882140000
	884501200	883201200
	876984000	877784000
	880016320	883015220
Promedio	880271113	880661092
RSD_r (%)	0,3	0,2
RSD_R (%)	-	0,03

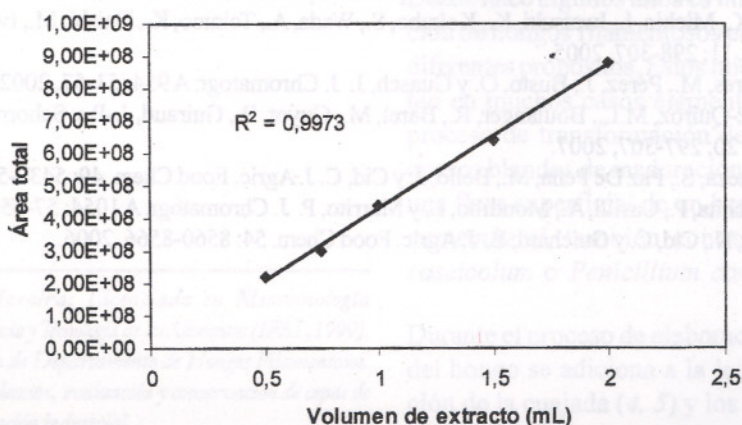


Fig. 4. Estudio de linealidad del método.

Tabla 5. Estudio de robustez

Condición analítica	Diferencias
Tiempo de extracción	3753560
Temperatura de extracción	-3233450
Cantidad de NaCl	3143460
Cantidad de muestra	3223120
Agitación	2668700
Fibra diferente	2564340
Desviación típica ¹	3780666

¹ calculado como $2^{1/2} \cdot S_r$

CONCLUSIONES

Se desarrolló y optimizó un método analítico por HS-SPME para los compuestos volátiles de extractos hidroalcohólicos de café, con las condiciones siguientes: fibra de PDMS/DVB (65 m), 2 mL de extracto a 40 % etanol y 6 mL de agua Milli-Q; 0,80 g de cloruro de sodio, agitación a 100 rev/min, 15 min de pre-extracción, 25 min de extracción a 50 °C y 2 min de desorción en el equipo.

La validación parcial del método indicó que es lineal en el rango hasta 2 mL de extracto, posee buena repetibilidad y reproducibilidad (coeficiente de variación menor a 1 % para el área total) y es robusto para las condiciones analíticas evaluadas.

REFERENCIAS

1. Semmelroch, P. y Grosch, W. J. *Agric. Food Chem.* 44: 537-543, 1996.
2. Grosch, W. *Nahrung* 42: 344-350, 1998.
3. Czerny, M., Mayer, F. y Grosch, W. J. *Agric. Food Chem.* 47: 695-699, 1999.
4. Czerny, M. y Grosch, W. J. *Agric. Food Chem.* 48: 868-872, 2000.
5. Bicchi, C.P., Panero, O.M., Pellegrino, G. M. y Vanni, A.C. *J. Agric. Food Chem.* 45: 4680-4686, 1997.
6. Roberts, D.D., Pollien, P. y Milo, C. *J. Agric. Food Chem.* 48: 2430-2437, 2000.
7. Bicchi, C., Iori, C., Rubiolo, P. y Sandra, P. *J. Agric. Food Chem.* 50: 449-459, 2002.
8. Baggenstoss, J.G., Poisson, L., Luethi, R., Perring, R. y Escher, F. *J. Agric. Food Chem.* 55: 6685-6691, 2007.
9. Akiyama, M., Murakami, K., Ikeda, M., Iwatsuki, K., Wada, A., Tokuno, K., Onishi, M. y Iwabuchi, H. *J. Food Sci.* 72: 388-396, 2007.
10. Akiyama, M., Murakami, K., Ohtani, N., Iwatsuki, K., Sotoyama, K., Wada, A., Tokuno, K., Iwabuchi, H. y Tanaka, K. *J. Agric. Food Chem.* 51: 1961-1969, 2003.
11. Costa Freitas, A.M., Parreira, C. y Vilas-Boas, L. *J. Food Composition and Analysis* 14: 513-522, 2001.
12. Costa Freitas, A.M., Parreira, C. y Vilas-Boas, L. *Chromatographia* 54: 647-652, 2001.
13. Zambonin, C.G., Balest, L., De Benedetto, G.E. y Palmisano, F. *Talanta* 66: 261-265, 2005.
14. Sanz, C., Ansorena, D., Bello, J. y Cid, C. *J. Agric. Food Chem.* 49: 1364-1369, 2001.
15. Ortega, A., Rodríguez, I., Chang, L., Nuñez, M. y González, I. *Alimentaria* (367): 84-93, 2005.
16. NC-TS 368. Guía para la validación de métodos de ensayo químicos para alimentos. Cuba, 2004.
17. Akiyama, M., Murakami, K., Michio, I., Iwatsuki, K., Kokubo, S., Wada, A., Tokuno, K., Onishi, M., Iwabuchi, S. y Tanaka, K. *Food Sci. Technol. Res.* 11: 298-307, 2005.
18. Pino, J., Martí, M.P., Mestres, M., Pérez, J., Busto, O. y Guasch, J. *J. Chromatogr. A* 954: 51-57, 2002.
19. González-Ríos, O., Suarez-Quiroz, M.L., Boulanger, R., Barel, M., Guyot, B., Guiraud, J.-P. y Schorr-Galindo, S. *J. Food Composition and Analysis* 20: 297-307, 2007.
20. Maeztu, L., Sanz, C., Andueza, S., Paz De Peña, M., Bello, J. y Cid, C. *J. Agric. Food Chem.* 49: 5437-5444, 2001.
21. Ryan, D., Shellie, R., Tranchita, P., Casilli, A., Mondillo, L. y Marrito, P. *J. Chromatogr. A* 1054: 57-65, 2004.
22. López-Galilea, I., Fournier, N., Cid, C. y Guichard, E. *J. Agric. Food Chem.* 54: 8560-8566, 2006.