

ARTÍCULOS

Aproximaciones analíticas *–in vitro* e *–in vivo* para evaluar la liberación del aroma en condiciones de consumo de vino.

Esteban-Fernández, A., Muñoz-González, C., Moreno-Arribas, M.V., Pozo-Bayón, M.A.*

Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL) (CSIC-UAM)

Cl/Nicolás Cabrera, 9, 28049, Madrid. m.delpozo@csic.es; teléfono: 910017961

RESUMEN

Por su importancia en el aroma de los vinos, una gran mayoría de trabajos científicos se ha centrado primero en identificar los compuestos que integran la fracción volátil del vino empleando técnicas basadas en la cromatografía de gases (GC-FID, GC-MS), y en segundo lugar, en conocer su significado sensorial mediante el empleo de técnicas olfatómicas (GC-O). Sin embargo, durante el consumo de alimentos, los compuestos del aroma se liberan en el interior de la cavidad oral y faríngea, pudiendo estar expuestos a diferentes transformaciones químicas y bioquímicas debidas a factores relacionados con la fisiología oral (enzimas de la saliva, temperatura, cambios de pH, adsorción a las mucosas orales, etc). Todos estos factores pueden modificar la composición del aroma original del vino y condicionar la cantidad y tipo de compuestos que finalmente interaccionarán con los órganos olfativos. Entender cómo influyen todos estos procesos requiere de una metodología analítica específicamente diseñada para monitorizar el aroma liberado en el propio individuo durante el consumo (métodos *in vivo*), o bien el desarrollo de dispositivos que mimeticen los procesos fisiológicos que tienen lugar durante la ingestión del vino (métodos *in vitro*). Todas estas aproximaciones analíticas y algunas de las aplicaciones en las que se han empleado en el caso del vino serán revisadas en este artículo.

1. INTRODUCCIÓN

El aroma del vino es uno de sus principales atributos de calidad y está entre los más decisivos a la hora de explicar las preferencias de los consumidores. Es por ello, que son muchos los trabajos científicos que se han encaminado a conocer e identificar la compleja fracción volátil del vino. Así que ya a finales de los años ochenta se habían identificado más de 800 compuestos volátiles (Maarse y Vischer, 1989). Desde el punto de vista químico, los compuestos del aroma se caracterizan por presentar bajos pesos moleculares (< 300 Da) y altas presiones de vapor (compuestos de alta volatilidad), lo que facilita su liberación de la matriz en la que se encuentran. Otras características de este tipo de compuestos son su gran

heterogeneidad en cuanto a estructura química (ésteres, aldehídos, cetonas, lactonas, terpenos, ácidos, compuestos azufrados), características físico-químicas (volatilidad, polaridad), y el amplio rango de concentraciones en las que pueden aparecer en los vinos (desde mg/L a ng/L). Muchos de los trabajos encaminados a la caracterización de este tipo de compuestos se han recogido en distintas revisiones bibliográficas (Rapp y Mandery, 1986; Polásková y col., 2008; Ebeler y Thorngate, 2009; Styger y col., 2011, Muñoz-González y col., 2011, Villamor y Ross, 2013).

Al tratarse de moléculas volátiles, la cromatografía de gases (GC) se ha convertido en la técnica de elección para la separación y posterior análisis de estos compuestos. En este sentido, el uso de la clásica cromatografía unidimensional se ha combinado en los últimos años con el empleo de la cromatografía bidimensional completa (GC×GC), que proporciona un mayor poder de resolución, mejorando la separación de muestras complejas, como es el caso del vino (Muñoz-González y col., 2011). La rapidez en la elución y la elevada resolución de los picos cromatográficos derivada del empleo de estas técnicas también ha requerido el desarrollo de detectores diferentes a los tradicionales (detector de ionización de llama (FID)), como los espectrómetros de masas (MS) de doble o triple cuadrupolo o con analizadores de tiempo de vuelo (ToF-MS), que permiten escanear de manera más rápida y sensible los analitos eluidos. Pero sin duda alguna, la evolución en las técnicas de preparación de muestra ha sido el gran hito que ha permitido profundizar en el conocimiento de la fracción volátil del vino. El empleo de técnicas como la extracción líquido-líquido (LLE, Liquid-Liquid Extraction) (Ferreira y col., 1993; Ferreira y col., 1998; Ortega-Heras y col., 2002; Andújar-Ortiz y col., 2009), la extracción en fase sólida (SPE, Solid Phase Extraction) (López y col., 2002; Hernanz y col., 2008), la microextracción en fase sólida (SPME, Solid Phase Microextraction) (Mestres y col., 1998; Pozo-Bayón y col., 2001; Ezquerro y col., 2003; Ezquerro y col., 2004; Perestrelo y col., 2009) o la extracción por sorción sobre barra agitadora (SBSE, Stir Bar Sorptive Extraction) (Coelho y col., 2009), entre otras, ha permitido el aislamiento y concentración de los compuestos volátiles que

se encuentran en el vino en pequeñas cantidades (incluso a niveles traza), permitiendo la identificación tanto de compuestos que contribuyen al aroma positivo del vino, como a defectos aromáticos (*off flavors*). Además, en los últimos años, muchas de estas técnicas han evolucionado y mejorado para intentar alcanzar una mayor exactitud, precisión, sensibilidad, rapidez y una reducción en el coste y en la cantidad de disolventes orgánicos empleados (Muñoz-González y col., 2011).

Sin embargo, como apuntó el científico francés Étievant a principios de los años noventa, el conocimiento analítico dirigido a descifrar el aroma del vino todavía no había sido capaz de interpretar el papel que ejercía cada componente individual en el mismo (Ferreira, 2002). Y es que a pesar de que en la actualidad se conoce la existencia de más de mil compuestos volátiles presentes en el vino (Polásková y col., 2008), sólo un número limitado de los mismos puede ser considerado olfativamente activo, lo que depende de su concentración y de su umbral de percepción (concentración mínima de un compuesto necesaria para ser detectados por el olfato humano).

En este sentido, las investigaciones desarrolladas en los últimos veinte años se han dirigido a estudiar el significado sensorial de las moléculas aromáticamente activas, es decir, aquellas que desempeñan un papel relevante en la percepción final del aroma de un vino. Para ello, se han aplicado técnicas analíticas en combinación con el olfato humano como la cromatografía de gases con detección olfatométrica (GC-O) (**Figura 1**) y experimentos de omisión-reconstitución que han permitido comprobar que tan sólo unos pocos compuestos (entre 40 ó 50) tienen un verdadero impacto en el aroma del vino (Ferreira, 2002).

En el análisis por GC-O, los compuestos separados que eluyen de la columna cromatográfica son sensorialmente evaluados por una persona (*sniffer*), empleando la nariz como un detector mucho más sensible que cualquier detector analítico conocido. A partir del análisis por GC-O se puede obtener el denominado valor de actividad de aroma (OAV), que es la relación entre la concentración de un compuesto en el vino y su umbral de detección. Generalmente se considera que compuestos con $OAV > 1$ tienen impacto sensorial, tanto mayor cuanto mayor sea este valor. Para trabajar con esta técnica, se han propuesto diferentes metodologías, como la técnica AEDA (Aroma Extract Dilution Analysis) (Ullrich y Grosch, 1987), el método Charm® (Acree y col., 1984), la técnica OSME (Odor Specific Magnitude Estimation) (McDaniel y col., 1990) o, más recientemente, el método de Frecuencia de Detección (Pollien y col., 1997).

Sin embargo, a pesar de la indudable utilidad de este tipo de metodologías para jerarquizar la importancia odorífica de los compuestos volátiles que integran el aroma de un vino, la técnica GC-O presenta algunas limitaciones. La más importante se debe a que en GC-O los compuestos son primero separados y la calidad odorífica de cada uno de ellos es evaluada independientemente y no de forma integrada como ocurre cuando se percibe el aroma de un vino. De este modo, no se tienen en cuenta los fenómenos de interacción con los componentes no volátiles de la matriz vínica y de actividad, sinergismo o antagonismo con otros compuestos volátiles presentes en la mezcla (Ferreira, 2002; Pozo-Bayón y Reineccius, 2009; Lytra y col., 2013). La segunda limitación se refiere a la representatividad del extracto obtenido y que es posteriormente evaluado por GC-O. Recientemente d'Acampora y col. (2008) y Ferreira y col. (2009) han descrito las ventajas e inconvenientes del empleo de las diferentes técnicas preparativas para obtener un extracto representativo que refleje la composición aromática de partida.

El empleo de los ensayos de omisión-reconstitución puede solventar estos problemas. En este tipo de análisis, se realiza un primer screening mediante GC-O en el que se detectan los compuestos odoríficamente activos y, posteriormente, se prepara una solución sintética con todos ellos (experimento de reconstitución) (Grosch, 1993). A continuación, en los ensayos de omisión los distintos componentes de la mezcla se van eliminando uno a uno con el objetivo de medir y verificar cuál es el efecto sensorial que la eliminación del componente tiene sobre el aroma global. Pese a que este método ha funcionado muy bien en el caso de vinos con un fuerte aroma varietal (Guth, 1997; Ferreira y col., 2002; Escudero y col., 2004), es más problemático en ensayos dirigidos a interpretar el análisis de vinos más complejos (Ferreira, 2002).

De forma paralela al desarrollo de las técnicas analíticas, las técnicas de análisis sensorial han evolucionado para proporcionar datos sensibles, precisos y exactos sobre las características sensoriales de los vinos (Ebeler, 2005). Sin embargo, los avances en ambas técnicas están lejos de poder relacionar la composición global de un vino con sus propiedades sensoriales (Styger y col., 2011). Esto puede ser debido a la existencia de compuestos aromáticos aún por identificar en el vino debido a las limitaciones de las actuales técnicas analíticas, o también a otros fenómenos como la interacción de las moléculas del aroma con los componentes no volátiles del vino (matriz vínica), o a la transformación de los mismos durante el proceso de consumo debido a diferentes mecanismos físico-químicos y fisiológicos que tienen lugar

durante este proceso. Además, los compuestos del aroma pueden interactuar a nivel cognitivo, provocando fenómenos de aditividad, sinergismo o antagonismo (Atanasova y col., 2005; Roudnitzky y col., 2011), que influyen en la percepción sensorial del aroma del vino.

2. ANÁLISIS DEL AROMA LIBERADO DURANTE EL CONSUMO DE VINO

A pesar de la gran cantidad de trabajos encaminados a elucidar la composición química del vino, y el impacto que estos compuestos tienen en la percepción del olor de un vino, los mecanismos químicos y bioquímicos que tienen lugar durante el proceso de consumo, y que son los responsables de los compuestos finales del aroma que interactuarán con nuestros órganos olfativos, son mucho más desconocidos.

En este sentido, es importante señalar que la liberación del aroma durante el consumo de un alimento es un proceso secuencial, que puede comenzar antes incluso de la ingestión del mismo. En el caso del vino, comienza al abrir la botella o al servirlo en la copa, o simplemente al acercarnos y olerlo. En esta situación, las moléculas volátiles que se desprenden de la matriz vínica debido a su elevada presión de vapor son arrastradas por el flujo respiratorio y entran directamente a través de las fosas nasales desde donde se dirigen a los receptores olfativos situados en el epitelio olfativo. Dependiendo de su estereoquímica y concentración pueden interactuar con los receptores y desencadenar una cascada de señales neuronales que serán procesadas en el cerebro y que se traducen en la sensación percibida (Pozo-Bayón, 2009). A esta primera vía de paso de moléculas odorantes durante el consumo se la denomina ortonasal y este tipo de aroma se conoce generalmente como olor.

Sin embargo, el aroma que se libera durante el consumo de los alimentos, sigue una vía diferente hasta llegar a los receptores olfativos. Una vez introducido el alimento, y en el caso de alimentos líquidos, se produce la deglución del mismo. Durante la exhalación inmediatamente posterior a la deglución se crea un gradiente de concentración de aroma entre la capa que recubre la superficie de la faringe y el aire exhalado que pasa a su través. Ese aire exhalado entra dentro de la cavidad nasal y alcanza el epitelio olfativo donde los compuestos del aroma son percibidos vía retronasal, en un pulso de aroma conocido como *swallow breath* (Land, 1996; Buettner y Schieberle, 2000; Linforth y Taylor, 2000; Linforth y col., 2002; Linforth y Taylor, 2006). Este tipo de aroma que tiene lugar exclusivamente durante la ingestión de

alimentos se conoce como aroma retronasal (Buettner y col., 2008). Trabajos recientes han comprobado que la percepción del aroma vía ortonasal y retronasal puede ser diferente (Small y col., 2005). A pesar del hecho de que el aroma retronasal está directamente relacionado con la percepción del aroma y es un factor decisivo en las preferencias de los consumidores, apenas hay estudios científicos encaminados a comprender el proceso de liberación del aroma durante el consumo de vino y su relación con la composición del aroma retronasal. Una de las principales dificultades está en el hecho de encontrar las metodologías analíticas adecuadas que permitan monitorizar directamente el aroma liberado durante el consumo en la cavidad oral o nasal del individuo. Otras estrategias analíticas se basan en el diseño de dispositivos que simulen las condiciones dinámicas y fisiológicas del proceso de ingestión (bocas y gargantas artificiales). Algunas de estas aproximaciones analíticas y ejemplos de su aplicación se revisan a continuación.

2.1. Análisis del aroma retronasal empleando métodos *in vitro*

En general, las aproximaciones analíticas empleadas para simular la liberación de aroma durante el consumo de alimentos se han centrado en el empleo de diferentes dispositivos *in vitro*. Estas aproximaciones analíticas se basan principalmente en el empleo de técnicas de espacio de cabeza (HS), tanto en condiciones estáticas como dinámicas, que permiten cuantificar los compuestos que se liberan al espacio de cabeza desde el alimento. En muchos casos, se ha tratado de mimetizar en la medida de lo posible los procesos fisiológicos que acontecen durante el consumo de alimentos para simular el proceso de liberación del aroma que ocurre en una situación *in vivo*. Para ello, se han empleado distintos dispositivos (bocas artificiales, gargantas artificiales, etc.), más o menos sofisticados, que permiten monitorizar la liberación de los compuestos del aroma del alimento y que pueden ser posteriormente recogidos en diferentes trampas (polímeros adsorbentes, trampas criogénicas, etc.) para su posterior análisis por cromatografía de gases o directamente por espectrometría de masas (Piggott y Schaschke, 2001). Estos sistemas son muy útiles, ya que permiten entender mejor la contribución de cada factor que afecta al proceso de consumo de manera individual, lo que sería muy difícil de evaluar en estudios *in vivo*. Además, proporcionan un estricto control de las variables de estudio y permiten llevar a cabo un gran número de experimentos evitando las posibles diferencias inter-individuales. Sobre este tema, existen varias revisiones bibliográficas (Stephan y col., 2000; Piggott y Schaschke, 2001; Salles y col., 2011; Morell y col., 2014).

La aproximación más sencilla para monitorizar el aroma liberado de un alimento durante el consumo consiste en utilizar una técnica tradicional de espacio de cabeza en estático en la que se pueden prefiar unas condiciones de temperatura, normalmente cercanas a la temperatura corporal (37°C), y evaluar el efecto de un determinado parámetro orofisiológico. En este sentido, Mitropoulou y col. (2011) utilizaron SPME-GC/FID para evaluar el efecto de la saliva artificial en la liberación de aroma en vinos modelo dopados con diferentes concentraciones de polisacáridos y polifenoles. En este trabajo observaron que la presencia de estos macrocomponentes producía, en general, un aumento de la volatilidad de los compuestos más hidrofóbicos, mientras que los hidrofílicos se retenían más en la matriz.

En los últimos años se han desarrollado numerosos prototipos más complejos que el anteriormente descrito. Estos dispositivos, reciben el nombre de bocas artificiales y han ido perfeccionándose e incorporando nuevas variables, como la presencia de dientes e incluso la posibilidad de control informático para simular al máximo el proceso de masticación, que es un aspecto crítico en el caso de alimentos sólidos (van Ruth y col., 1994; van Ruth y Roozen, 2000; Deibler y col., 2001; Salles y col., 2007; Arvisenet y col., 2008; Poinot y col., 2009; Charles y col., 2013). Sin embargo, el empleo de estos dispositivos ha proporcionado en general mejores resultados cuando se ha aplicado al estudio de la liberación de aroma en alimentos líquidos, tales como aceite de girasol o zumo de naranja (Poinot y col., 2009), ya que en este caso no es necesario considerar el complejo proceso mecánico de la masticación. Algunos de estos ejemplos han sido las bocas artificiales diseñadas por Margomenou y col. (2000), Rabe y col. (2002), Rabe y col. (2004a), etc.

En el caso del vino, la bibliografía relacionada con el uso de bocas artificiales es prácticamente inexistente. Sin embargo, Genovese y col. (2009) investigaron el efecto de la saliva (humana y artificial) en la liberación de volátiles de un vino blanco y otro tinto empleando un dispositivo que simula una boca artificial conectado *off line* con HS-SPME-GC/FID y HS-SPME-GC/MS empleando condiciones dinámicas. Más recientemente, Muñoz-González y col. (2014) realizaron un estudio más sistemático en el que emplearon HS-SPME-GC/MS en condiciones estáticas y dinámicas para evaluar el impacto de la adición de la saliva en vinos con distinta composición. Las condiciones dinámicas se basaron en el empleo de un dispositivo (biorreactor de saliva), con control de temperatura y agitación, y que permitía la incorporación de un flujo de gas (N₂) para simular las condiciones dinámicas de la boca, así como la incorporación de saliva. La moni-

torización de los volátiles liberados del vino se realizó empleando una fibra de SPME (DVB/CAR/PDMS) a distintos tiempos: t=0, en el que la temperatura de la mezcla de saliva/vino era inferior a la temperatura fisiológica (25°C), y que podría corresponder con la fase oral, y t=10 minutos, momento en el que la temperatura era similar a la temperatura fisiológica oral (36°C), y que correspondería a una fase post-oral. Tanto la aplicación de las condiciones estáticas como dinámicas reveló una influencia significativa tanto del tipo de vino como de la adición de saliva. Sin embargo, las condiciones estáticas fueron más sensibles para detectar diferencias en la cantidad de aroma liberado asociadas a variaciones en la composición del vino.

Por otro lado, en los últimos años se ha comprobado que, sobre todo en alimentos líquidos, la deglución juega un importante papel en la percepción del aroma (De Roos y Wolswinkel, 1994). Como se comentó anteriormente, tras la deglución de un alimento se forma una fina capa de líquido (o material sólido) que recubre la faringe y se ha observado que la mayor parte del aroma depositado en esa capa se libera casi instantáneamente durante la primera exhalación tras el consumo (*swallow breath*) (Buettner y col., 2001; Weel y col., 2003). Por ello, para monitorizar el aroma liberado durante el consumo se han desarrollado también sistemas basados en gargantas artificiales, priorizando los procesos que tienen lugar tras la deglución, y que pueden ser adecuados para mimetizar la liberación de aroma durante el consumo de alimentos líquidos (Weel y col., 2004; King y col., 2006; Pozo-Bayón y col., 2009).

El empleo de técnicas como la espectrometría de masas con ionización química a presión atmosférica (APCI-MS) (Weel y col., 2004; King y col., 2006; Pozo-Bayón y col., 2010) o la espectrometría de masas con transferencia de protón (PTR-MS) (Buettner y col., 2008; Pozo-Bayón y col., 2009), acopladas a bocas o gargantas artificiales permite monitorizar de manera continua la liberación del aroma en tiempo real (Yven y col., 2010) y, por tanto, captar la dimensión temporal de la liberación del aroma de los alimentos, proporcionando una mejor correlación entre la sensación percibida durante el consumo y la concentración y el tipo de molécula responsable. Recientemente, y por primera vez en el caso del vino, Muñoz-González y col. (2015) desarrollaron un sistema de boca artificial acoplado *on line* a PTR-ToF-MS, que permitió obtener el perfil de liberación de aroma en tiempo real de vinos aromatizados con los mismos compuestos volátiles y a la misma concentración, pero que presentaban diferencias en la composición no volátil. El análisis de los parámetros de las curvas de liberación: *I_{max}*

(máxima intensidad) y *AUC* (área bajo la curva), que están relacionados con el valor máximo de intensidad y el aroma total liberado, respectivamente, reveló un importante efecto de la matriz no volátil del vino y, principalmente, del contenido en polifenoles totales, sobre el perfil de aroma liberado.

Todos los dispositivos descritos anteriormente son una herramienta de gran utilidad a la hora de estudiar los efectos de parámetros orofisiológicos de manera independiente, pero no siempre permiten controlar los complejos procesos que se producen en condiciones reales de consumo y, por lo tanto, muchas veces resulta complicado establecer una relación directa entre estos datos y los proporcionados mediante análisis sensorial (Piggott y Schaschke, 2001; Taylor, 2002; Rabe y col., 2004b). Para simular de manera conjunta todos los procesos que ocurren durante el consumo de alimentos, sería deseable que el dispositivo integrara numerosas funciones fisiológicas (dentición, deglución, peristalsis, salivación, etc) y, en consecuencia, que fueran mucho más complejos que los descritos hasta la fecha.

2.2 Análisis del aroma retronasal empleando métodos *in vivo*

En la actualidad, la posibilidad de integrar todos los procesos fisiológicos que ocurren durante el consumo de un alimento sólo es posible mediante el análisis *in vivo*. La liberación del aroma durante el consumo se puede medir muestreando los compuestos volátiles exhalados directamente en la boca o la nariz del consumidor con el objetivo de proporcionar una mejor representación de los compuestos volátiles que alcanzarán el epitelio olfativo (Piggott y Schaschke, 2001). Este tipo de metodología ha recibido diferentes nombres: análisis del aroma *in vivo*, *nosespace o breath by breath* (Taylor y Linforth, 2000; Yeretian y col., 2000; Taylor y Linforth, 2003).

Un importante punto a tener en cuenta durante el empleo de esta metodología es la gran variación entre individuos debida a diferencias en flujos respiratorios, patrones de deglución, composición de la saliva, etc. (Buettner y col., 2001; Taylor 2002; Normand y col., 2004; Mestres y col., 2006; Muñoz-González y col., 2014). Este problema, sin embargo, puede reducirse empleando un amplio número de individuos, usando datos normalizados y siguiendo estrictos procedimientos de consumo (Piggott y Schaschke, 2001; Normand y col., 2004; Aprea y col., 2007; Salles y col., 2011). De hecho, en un reciente estudio llevado a cabo por Aprea y col. (2007), el uso de un protocolo de consumo permitió reducir la variabilidad interindividual en un 52%.

La monitorización de liberación de aroma durante el consumo puede realizarse en tiempo real o de manera *off line*. Respecto a esta segunda aproximación, se han descrito varios sistemas de atrapamiento del aroma, con una característica común: los volátiles se atrapan durante el consumo gracias al uso de trampas poliméricas que posteriormente pueden desorberse y analizarse por cromatografía de gases (Linforth y Taylor, 1993; Delahunty y col., 1996). Estos dispositivos permiten un enriquecimiento de la muestra que normalmente está muy diluida, una separación previa ya que pueden acoplarse a GC-O y GC-MS y, por tanto, una identificación más exacta. Además, pueden proporcionar una mayor selectividad por el uso de diferentes materiales poliméricos y son relativamente fáciles de emplearse en cualquier laboratorio.

Existen varios tipos de sistemas de atrapamiento en función de si los volátiles exhalados se monitorizan a nivel de la cavidad nasal u oral. El primer grupo de sistemas de atrapamiento son los que muestrean los volátiles presentes en la cavidad oral y se basan en la premisa de que los volátiles monitorizados a este nivel se encuentran en una concentración similar a la que alcanzan en los receptores olfativos (O’Riordan y Delahunty, 2001). Roozen y Legger-Huysman (1994) desarrollaron un sistema mediante el cual los compuestos volátiles liberados en la boca tras el consumo eran atrapados en una trampa de Tenax empleando vacío y posteriormente fueron analizados por GC. Este sistema se conoce como *muestreo de la respiración oral* (OBS, Oral Breath Sampling), y fue posteriormente modificado y adaptado para estudiar la liberación del aroma de café en diferentes bebidas con distinto contenido en grasa y proteínas (Denker y col., 2006).

El segundo grupo de sistemas de atrapamiento de aroma es el basado en el muestreo en la cavidad nasal (análisis *in-nose*) (Ingham y col., 1995). Estas técnicas analíticas también se basan en la premisa de que la concentración de aroma que se alcanza en las fosas nasales es similar a la que llega a los receptores olfativos (Taylor, 1996; Denker y col., 2006; Linforth y col., 2002), aunque recientemente se considera la posibilidad de la existencia de un gradiente intranasal que produzca variaciones temporales en la concentración dependiendo del tipo de compuesto (Frasnelli y col., 2005).

Los primeros análisis *in-nose* se basaron en el atrapamiento de los volátiles liberados a través de las fosas nasales en una trampa polimérica o criogénica a diferentes tiempos después del consumo de alimentos (Piggott y Schaschke, 2001). En este sentido, Buettner y Schieberle (2000) introdujeron el concepto de la *medida del odorante*

exhalado (EXOM, Exhaled Odorant Measurement) para obtener datos cuantitativos y precisos de liberación de aroma de alimentos. Esta técnica combinaba las ventajas del atrapamiento en un material adsorbente como el Tenax junto con la aplicación del ensayo de dilución de isótopos estables (SIDA, Stable Isotope Dilution Assay), permitiendo una cuantificación muy exacta de los volátiles de la respiración. Además, ofrecía la posibilidad de concentrar las moléculas odorantes antes del análisis, por lo tanto, fue una aproximación útil para estudiar la liberación de aroma en las concentraciones tan bajas en las que se encuentran muchos de los odorantes en condiciones de consumo reales (*in vivo*), que no podrían detectarse mediante el empleo de técnicas de análisis en tiempo real. Esta metodología ha sido recientemente utilizada por Lasekan y col. (2009) para evaluar la liberación de aroma durante el consumo de una bebida fermentada conocida como *vino de palma*. En el caso del vino, el trabajo recientemente desarrollado por Muñoz-González y col. (2014) representa la primera aproximación analítica para la determinación de la cantidad total de aroma liberado empleando condiciones *in vivo*. En este trabajo se empleó un dispositivo denominado RATD (Retronasal Aroma Trapping Device), que fue previamente optimizado y validado (Muñoz-González y col., 2014a), y que permitía atrapar el aliento de respiración (exhalación) de los panelistas tras el consumo de 100 mL de vino empleando trampas de Tenax. Todo el sistema estaba conectado a una bomba de vacío que favorecía la extracción del aroma desde las fosas nasales al polímero (**Figura 2**). Posteriormente, el aroma retenido en la trampa era eluído con una mezcla de disolventes orgánicos y, tras la concentración, los volátiles fueron analizados empleando CIS (Cooled Injection System)-GC/MS.

La percepción prolongada del aroma retronasal, a menudo llamada persistencia del aroma, puede ser debida a la liberación de los volátiles adsorbidos por las mucosas oral o faríngea después del consumo de alimentos. La mucosa puede actuar como una especie de depósito aromático, responsable de la persistencia de la percepción de un determinado aroma que se produce después del consumo (Buettner, 2004). Esta capacidad está determinada por la posibilidad de algunos odorantes de adsorberse a la mucosa oral y liberarse con diferentes cinéticas de desorción según sus características físico-químicas. La adsorción de las moléculas odorantes a la mucosa oral puede evaluarse de diferentes maneras. Una de ellas consiste en calcular la diferencia entre la cantidad de aroma presente en una solución antes y después de ser expectorada tras ser mantenida en la boca durante cierto tiempo (SOOM, Spit Off Odorant Measurement). Esta aproximación fue empleada por Buettner y col. (2002), quienes unos años más tarde desarrollaron otro sistema que permitía moni-

torizar la liberación de aroma en la cavidad bucal: BOS (Buccal Odour Screening System). Esta técnica se basa en la extracción intraoral a tiempos definidos de compuestos odorantes que se han quedado retenidos en la cavidad bucal gracias al empleo de una barrita agitadora o Twister (SBSE). Seguidamente, los volátiles son desorbidos en la unidad de desorción térmica y analizados por GC-O o GC-MS (Buettner, 2004; Buettner y Welle, 2004; Buettner y Mestres, 2005). Otro desarrollo analítico que recientemente se ha comprobado permite la monitorización del aroma liberado de la cavidad oral es el empleo de la técnica SPME intra-oral. Mediante esta aproximación, Esteban-Fernández y col. (2014) evaluaron el impacto de la composición de la matriz no volátil del vino en la capacidad de adsorción a la mucosa oral de compuestos del aroma del vino.

No obstante, todas estas técnicas se basan en el atrapamiento de la cantidad total de compuestos volátiles liberados durante el consumo y no toman en consideración la dimensión dinámica de la liberación del aroma que se produce durante el consumo y que podría correlacionar mejor con la evolución en la percepción del aroma durante el consumo de un alimento.

El análisis del aroma en tiempo real es una aproximación metodológica muy importante para establecer la relación entre liberación y percepción de aroma durante el tiempo que dura el consumo del alimento (Linthorpe y Taylor, 1993; Avison, 2013). Como se ha comentado anteriormente, el análisis del aroma en tiempo real es posible gracias al empleo de técnicas espectrométricas, tales como APCI-MS (Taylor, 1996), PTR-MS (Lindinger y col., 1998; Yereztian y col., 2000) y Selected Ion Flow Tube Mass Spectrometry (SIFT-MS) (Spaniel y Smith, 1999). Entre ellas, las más ampliamente utilizadas son APCI-MS y PTR-MS. La primera fue desarrollada para el análisis de aromas y fragancias, mientras que el análisis de contaminantes atmosféricos o la monitorización de volátiles de respiración con fines médicos fue el objetivo principal de la segunda. Sin embargo, en la actualidad ambas técnicas se utilizan indistintamente en estudios de liberación del aroma durante el consumo.

Estas técnicas se basan en la monitorización de los compuestos del aroma en las fosas nasales mediante el empleo de un espectrómetro de masas y proporcionan un perfil de masas del aroma liberado a tiempo real durante el período que dura el consumo del alimento. Además, la aplicación de esta metodología permite comprobar los compuestos que se liberan después del consumo y que pueden estar relacionados con la persistencia del aroma. La mayor parte de los estudios de liberación del aroma *in*

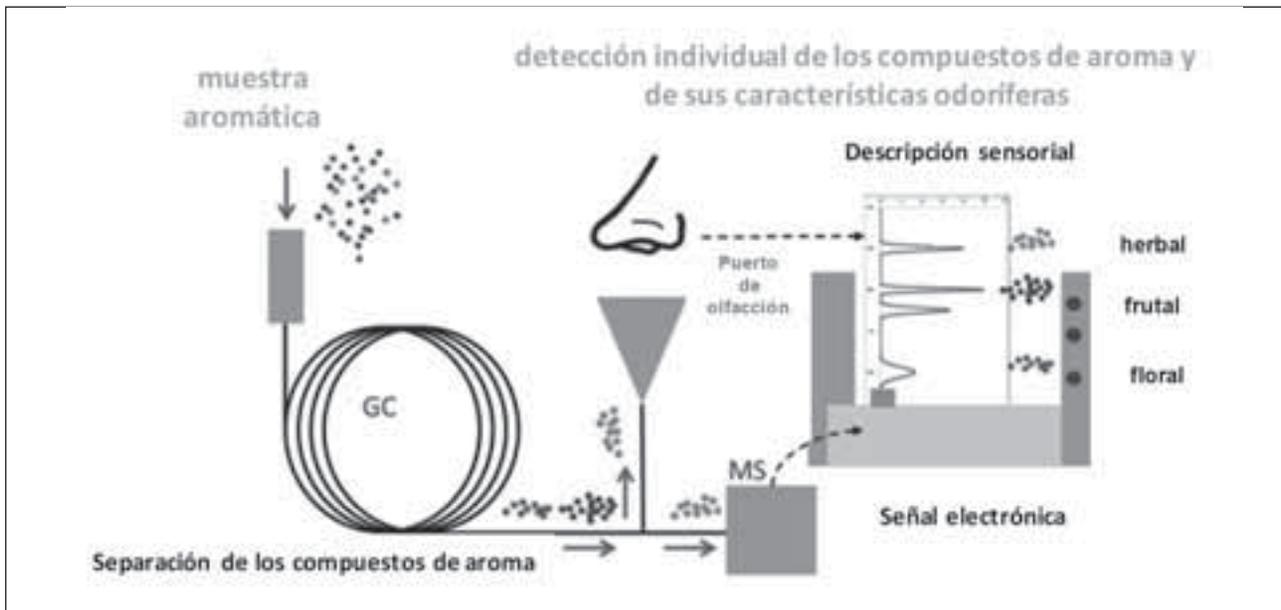


Figura 1. Esquema del análisis mediante cromatografía de gases-olfatometría (GC-O).
Adaptada de <http://www.foodprocessingtechnology.com/contractors/training/flavologic/flavologic2.html>.

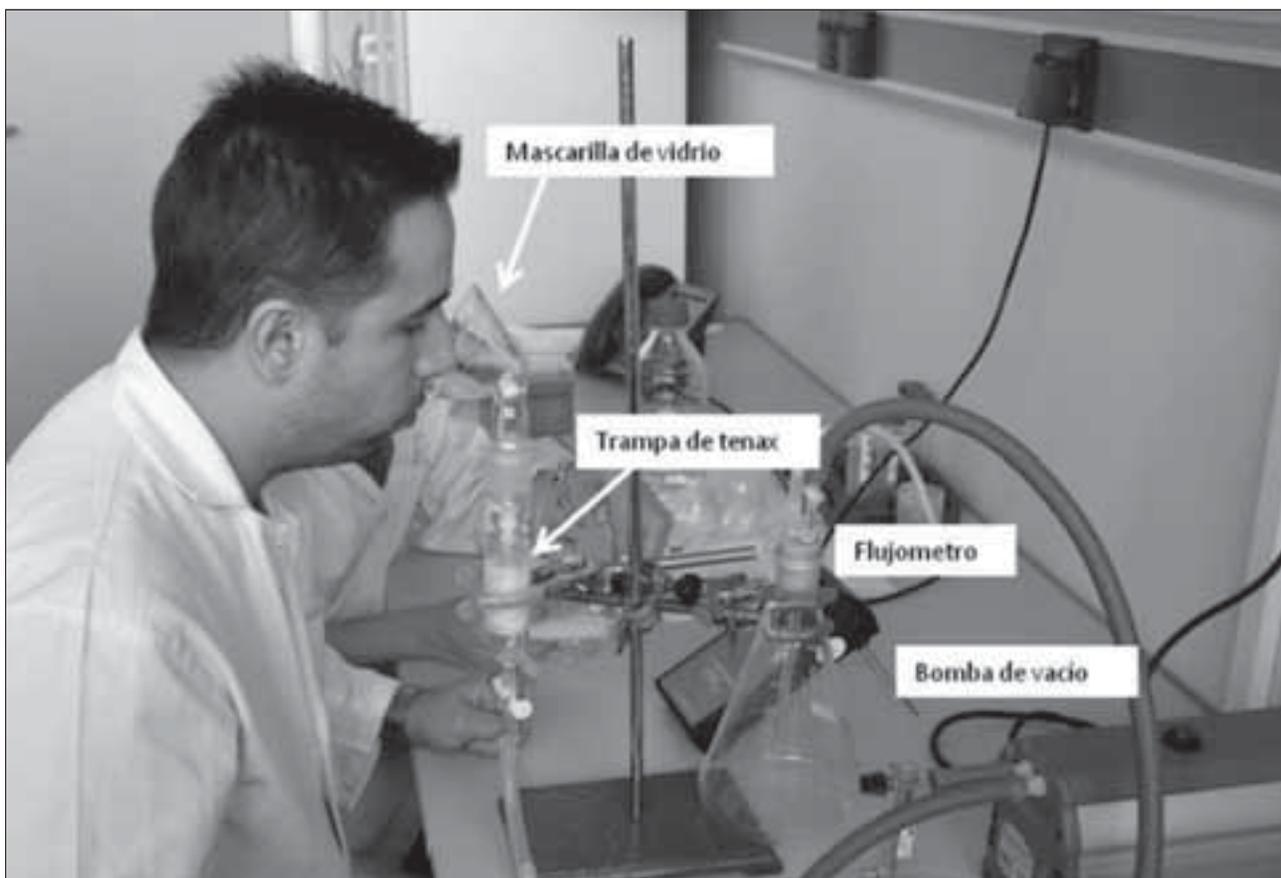


Figura 2. Ejemplo de análisis del aroma total liberado durante el consumo de vinos empleando el sistema de atrapamiento de aroma retronasal (RATD) desarrollado en el Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL, CSIC).

vivo se han llevado a cabo con productos sólidos y semi-sólidos como geles, productos lácteos, gomas de mascar (Brauss y col., 1998; Brauss y col., 1999; Linforth y col., 1999; Boelrijk y col., 2006). Sin embargo, sólo unos pocos estudios se han centrado en alimentos líquidos (Linforth y Taylor, 2000; Doyen y col., 2001; Linforth y col., 2002; Lasekan y col., 2009).

En el sistema de APCI-MS, una interfaz dirige una fracción del aire exhalado a la fuente de ionización del espectrómetro de masas mediante efecto Venturi. Allí, los volátiles son ionizados e introducidos en la región de alto vacío del espectrómetro de masas. Esta técnica se ha utilizado en un gran número de aplicaciones (Linforth y Taylor., 2000; Ruijschop y col., 2009; Linforth y col., 2010; Blee y col., 2011; Clark y col., 2011, etc.) y actualmente se comercializa con el nombre de MS Nose™ (Micromass-Manchester, Reino Unido) (Figura 3).

Las principales características de la técnica de PTR-MS han sido revisadas en artículos previos (Lindinger y col., 1998; Hansel y col., 1998) y, como en el caso de la APCI-MS, se trata de una técnica muy sensible. En PTR-MS, los compuestos volátiles son introducidos en la fuente de ionización gracias a las condiciones de vacío del espectrómetro de masas. Los iones son extraídos y transferidos a la cabina de reacción (*drift tube*) donde tiene lugar la ionización química a temperatura y presión controlada, por lo que todos los componentes de la mezcla se ionizan en el mismo grado.

En ambas técnicas el ion primario usado para la ionización química es habitualmente el hidronio (H_3O^+) que se produce en la fuente de ionización. La ionización ocurre cuando se transfiere la carga del agua (H_3O^+) al analito. Los volátiles son detectados de acuerdo a su relación m/z como iones correspondientes al ion molecular protonado (MH^+). En APCI-MS esto sucede a presión atmosférica, mientras que en PTR-MS esto ocurre a bajo vacío. Recientemente, en un estudio de comparación de las dos técnicas se ha comprobado que la APCI-MS presenta un límite de detección 10 veces menor y un rango lineal diez veces mayor que la PTR-MS (Avison, 2013). Sin embargo, los resultados de otro estudio de comparación de ambas técnicas no mostraron diferencias entre ellas (Deleris y col., 2013). Además, la PTR se ha combinado con otros tipos de analizadores diferentes al cuadrupolo, tales como la trampa de iones (Warneke y col., 2004; Warneke y col., 2005) o el analizador de tiempo de vuelo (Blake y col., 2004; Soukoulis y col., 2013; Tsevdou y col., 2013), lo que proporciona mayor sensibilidad y resolución (Heenan y col., 2012), permitiendo realizar los estudios de liberación del aroma en alimentos tan complejos como el vino.

Ambas técnicas proporcionan perfiles de liberación tiempo-intensidad de los iones de interés bien resueltos, de tal manera que se pueden calcular algunos parámetros como la cantidad total de odorantes detectados en un cierto tiempo, y que es equivalente al *AUC*, la *I_{max}*, y el tiempo necesario para alcanzar la máxima intensidad (*T_{max}*) (Figura 4).

Las ventajas más importantes del empleo de espectrómetros de masas para monitorizar el aroma en tiempo real están normalmente relacionadas con tiempos cortos de respuesta (generalmente 200 ms o menos) y la relativamente alta sensibilidad de la técnica. Además, el hecho de ser técnicas de ionización suaves, minimiza la fragmentación de los compuestos lo que implica una interpretación más sencilla de los resultados. Desafortunadamente, estas metodologías también presentan limitaciones, como son las relativas a la discriminación de algunos compuestos en el detector del equipo, la presencia de interferencias procedentes de la matriz del alimento, la dificultad en la identificación de compuestos que presentan el mismo peso molecular (compuestos isobáricos), etc. Por otra parte, la falta de una separación previa a la detección del analito implica la superposición del espectro de todos los compuestos que llegan al mismo tiempo al detector (*mass fingerprint*). Esto hace que, dependiendo de la complejidad de la muestra analizada, la identificación del compuesto (y cuantificación) puede a veces ser difícil o imposible (Spitaler y col., 2007). Además, el análisis de los datos y la interpretación de los resultados requiere mucho tiempo y en ocasiones es problemática (Gierczynski y col., 2011). Otra de las desventajas que se han indicado recientemente es su dificultad para el estudio de aromas complejos, presentes en la mayoría de los alimentos, debido precisamente a la falta de selectividad y a la dificultad de interpretación de los espectros (Poinot y col., 2013).

A pesar del número creciente de aplicaciones de las técnicas basadas en PTR-MS y APCI-MS para monitorizar la liberación del aroma en tiempo real, estas técnicas apenas se han empleado en el caso del vino. Esto puede ser debido a algunos problemas relacionados con la composición de la matriz vínica, en concreto con el impacto del etanol en el proceso de ionización (Spitaler y col., 2007). Se ha comprobado que cuando el etanol está presente en una concentración superior a 100 ppm, los iones primarios H_3O^+ pueden reaccionar con él para formar monómeros, dímeros, trímeros, aductos con moléculas de agua, iones fragmentados e incluso agrupamientos de etanol, que podrían reaccionar con los compuestos volátiles (Spitaler y col., 2007), de tal manera que sería imposible poder comparar muestras con diferente contenido en etanol.

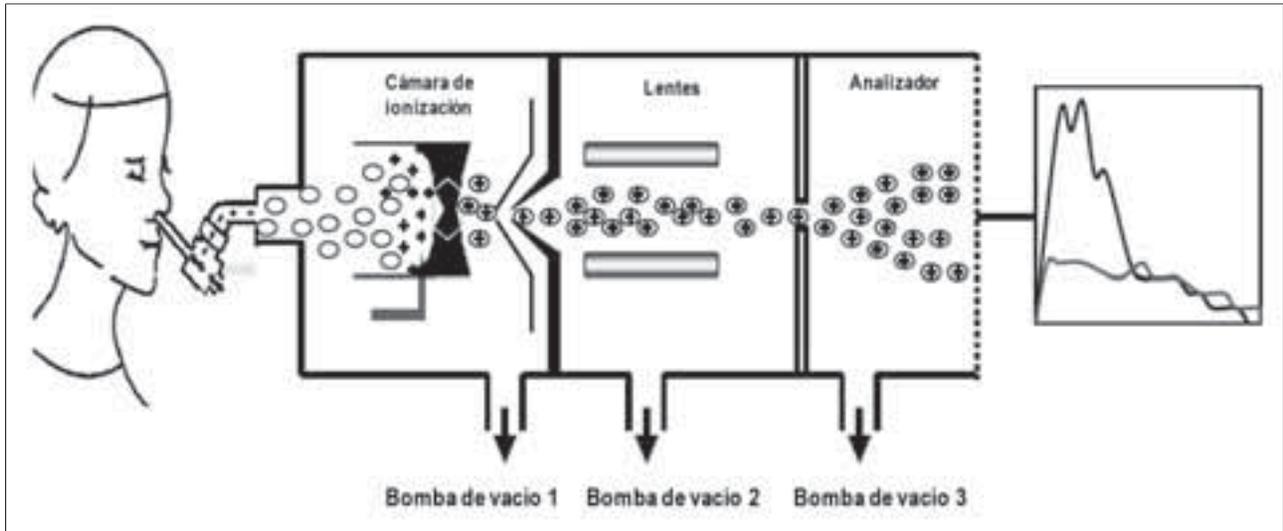


Figura 3. Diagrama esquemático del análisis mediante MS Nose™. Adaptada de Hollowood 2002, PhD.

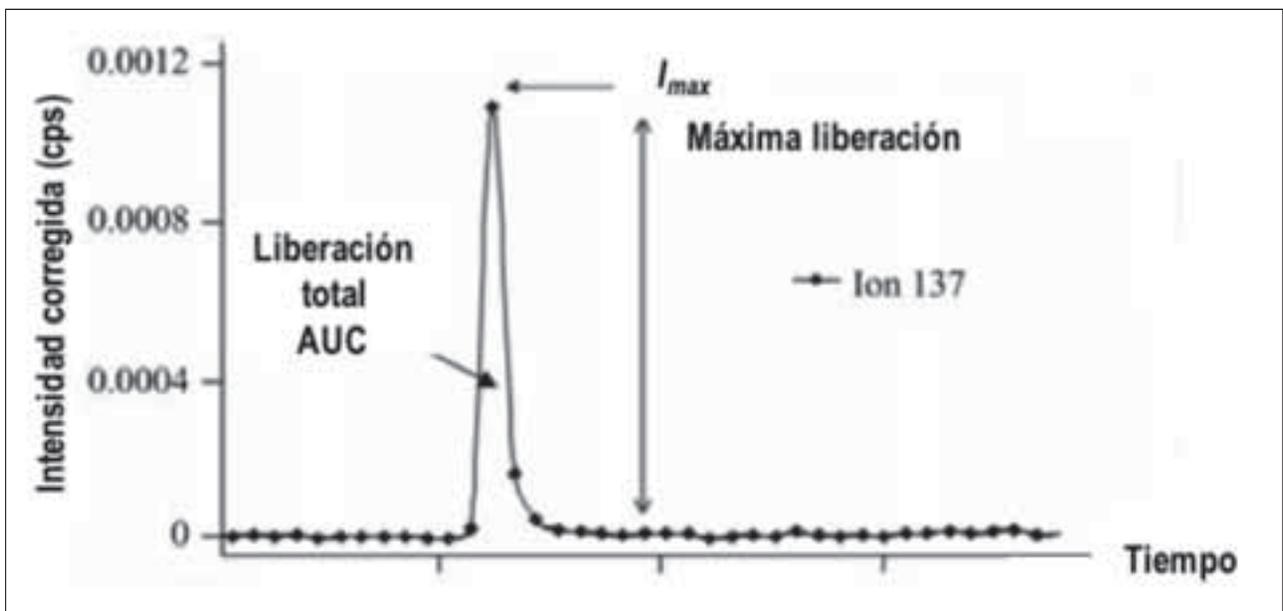


Figura 4. Curva de liberación de limoneno en agua aromatizada obtenida mediante el empleo de una garganta artificial acoplada a un equipo de PTR-MS. Adaptada de Pozo-Bayón y col., 2009.

Se han propuesto dos posibles soluciones para evitar estos problemas. Una consiste en diluir el espacio de cabeza de la muestra con un flujo de nitrógeno saturado en etanol, desplazando los iones H_3O^+ por etanol protonado (Boscaini y col., 2004; Aznar y col., 2004). Otra solución propuesta en la literatura consiste en mantener los iones H_3O^+ como iones reactivos de ionización química, pero aplicando una dilución 40x al espacio de cabeza del vino con N_2 puro (Spitaler y col., 2007). Más recientemente, Fiches y col. (2013) han propuesto un sencillo método basado en el control del proceso de ionización en el que la variación de la energía media de colisión en el *drift tube* durante el análisis de disoluciones hidroalcohólicas (en un rango comprendido entre el 10-40 % (v/v)) permite realizar un análisis cuantitativo para caracterizar brandies en función de su grado de envejecimiento (Fiches y col., 2014). Sin embargo, todas estas aplicaciones han sido con fines dirigidos a la clasificación de muestras de distintas características y no para evaluación de liberación del aroma en tiempo real. Tan sólo en el trabajo de Deleris y col. (2011) se investigó la influencia de la deglución en la liberación del aroma durante el consumo de vodka empleando la técnica de PTR-MS.

3. CONCLUSIONES

En los últimos años hay cada vez más evidencias científicas de que la fisiología oral influye en la composición del aroma retronasal y es importante incluirla entre los factores más decisivos que intervienen a la hora de explicar la percepción del aroma de un alimento. Aunque en el caso del vino este tipo de investigación es muy incipiente, el desarrollo de nuevas aproximaciones analíticas *in vivo* e *in vitro* está permitiendo identificar los factores composicionales del vino y orofisiológicos que afectan a la liberación del aroma durante el consumo. En los próximos años la aplicación combinada de técnicas analíticas (GC-MS, GC-O), metodologías para la monitorización de aroma en tiempo real (PTR-MS, APCI-MS) y técnicas fisioanalíticas como la videofluoroscopia o el empleo de la resonancia magnética de imágenes (fMRI) de las áreas del cerebro que se activan con distintos estímulos aromáticos, así como el análisis sensorial, permitirán comprender mejor cómo se produce el proceso de la percepción del aroma durante la ingesta de vino y los principales factores implicados.

4. BIBLIOGRAFÍA

- Acree, T. E., Barnard, J., & Cunningham, D. G. (1984). *Food Chem.*, 14 (4), 273-286.
- Andújar-Ortiz, I., Moreno-Arribas, M. V., Martín-Álvarez, P. J., & Pozo-Bayón, M. A. (2009). *J. Chromatogr. A*, 1216 (43), 7351-7357.
- Aprea, E., Biasioli, F., Mark, T. D., & Gasperi, F. (2007). *Int. J. Mass Spectrom.*, 262 (1-2), 114-121.
- Arvisenet, G., Billy, L., Poinot, P., Vigneau, E., Bertrand, D., & Prost, C. (2008). *J. Agric. Food Chem.*, 56 (9), 3245-3253.
- Atanasova, B., Thomas-Danguin, T., Chabanet, C., Langlois, D., Nicklaus, S., & Etievant, P. (2005). *Chem. Senses*, 30 (3), 209-217.
- Avison, S. J. (2013). *J. Agr. Food Chem.*, 61 (9), 2070-2076.
- Aznar, M., Tsachaki, M., Linforth, R., Ferreira, V., & Taylor, A. (2004). *Int. J. Mass Spectrom.* 239 (1), 17-25.
- Blake, R. S., Whyte, C., Hughes, C. O., Ellis, A. M., & Monks, P. S. (2004). *Anal. Chem.*, 76 (13), 3841-3845.
- Blee, N., Linforth, R., Yang, N., Brown, K., & Taylor, A. (2011). *Flavour Frag. J.*, 26 (3), 186-191.
- Boelhrik A. E., Smith G., & Weel K. G. (2006). En: A. Voilley & P. Etievant, *Flavour in Food* (pág. 260-279). New York: CRC Press.
- Boscaini, E., Mikoviny, T., Wisthaler, A., von Hartungen, E., & Mark, T. D. (2004). *Int. J. Mass Spectrom.*, 239 (2-3), 215-219.
- Brauss, M. S., Linforth, R. S. T., & Taylor, A. J. (1998). *J. Agric. Food Chem.*, 46 (6), 2287-2292.
- Brauss, M. S., Linforth, R. S. T., Cayeux, I., Harvey, B., & Taylor, A. J. (1999). *J. Agric. Food Chem.*, 47 (5), 2055-2059.
- Buettner, A., & Schieberle, P. (2000). *Lebensm-Wiss. Technol.*, 33 (8), 553-559.
- Buettner, A., Beer, A., Hannig, C., & Settles, M. (2001). *Chem. Senses*, 26 (9), 1211-1219.
- Buettner, A., Beer, A., Hannig, C., Settles, M., & Schieberle, P. (2002). *Food Qual. Prefer.*, 13 (7-8), 497-504.
- Buettner, A. (2004). *J. Agric. Food Chem.*, 52 (8), 2339-2346.
- Buettner, A., & Welle, F. (2004). *Flavour Frag. J.*, 19 (6), 505-514.
- Buettner, A., & Mestres, M. (2005). *J. Agric. Food Chem.*, 53 (5), 1661-1669.
- Buettner, A., Otto, S., Beerc, A., Mestres, M., Schieberle, P., & Hummel, T. (2008). *Food Chem.*, 108 (4), 1234-1246.
- Charles, M., Poinot, P., Texier, F., Arvisenet, G., Vigneau, E., Mehinagic, E., & Prost, C. (2013) *Food Qual. Prefer.*, 28 (1), 264-270.
- Clark, R., Linforth, R., Bealin-Kelly, F., & Hort, J. (2011). *J. I. Brewing*, 117 (1), 74-81.
- Coelho, E., Coimbra, M. A., Nogueira, J. M. F., & Rocha, S. M. (2009). *Anal. Chim. Acta*, 635 (2), 214-221.
- d'Acampora Zellner, B., Dugo, P., Dugo, G., & Mondello, L. (2008). *J. Chromatogr. A* 1186 (1-2), 123-143.

- De Roos, K. B., & Wolswinkel, K. (1994). En: H. Maarse & D. G. van der Heij, *Trends in Flavour Research* (pág. 15-32). Amsterdam: Elsevier Science.
- Deibler, K., Lavin, E., Linforth, R., Taylor, A. J., & Acree, T. E. (2001). *J. Agric. Food Chem.*, 49 (3), 1388–1393.
- Delahunty, C., Piggott, J., Conner, J., & Paterson, A. (1996). *J. Sci. Food Agric.*, 71 (3), 273–281.
- Deleris, I., Saint-Eve, A., Guo, Y., Lieben, P., Cypriani, M.-L., Jacquet, N., Brunerie, P., & Souchon, I. (2011). *Chem. Senses*, 36 (8), 701-713.
- Deleris, I., Saint-Eve, A., Semon, E., Guillemin, H., Guichard, E., Souchon, I., & Le Quere, J.-L. (2013). *J. Mass Spectrom.*, 48 (5), 594-607.
- Denker, M., Parat-Wilhelms, M., Drichelt, G., Paucke, J., Luger, A., Borchering, K., Hoffmann, W., & Steinhart, H. (2006). *Food Chem.*, 98 (2), 201-208.
- Doyen, K., Carey, M., Linforth, R. S. T., Marin, M., & Taylor, A. J. (2001). *J. Agric. Food Chem.*, 49 (2), 804-810.
- Ebeler, S. E. (2005) En: K. Deibler, *Handbook of Flavor Characterization*. New York: CRC Press.
- Ebeler, S. E., & Thorngate, J. H. (2009). *J. Agric. Food Chem.*, 57 (18), 8098-8108.
- Escudero, A., Gogorza, B., Melus, M. A., Ortin, N., Cacho, J., & Ferreira, V. (2004). *J. Agric. Food Chem.*, 52 (11), 3516-3524.
- Esteban-Fernández, A., Rocha-Albadillo, N., Muñoz-González, C., Moreno-Arribas, M.V., Pozo-Bayón, M. A. En: *Jornadas de Análisis Instrumental 2014*, Barcelona, Spain (póster AALP-16).
- Ezquerro, O., Pons, B., & Tena, M. T. (2003). *J. Chromatogr. A*, 999 (1-2), 155-164.
- Ezquerro, O., Ortiz, G., Pons, B., & Tena, M. T. (2004). *J. Chromatogr. A*, 1035 (1), 17-22.
- Ferreira, V., Rapp, A., Cacho, J. F., Hastrich, H., & Yavas, I. (1993). *J. Agr. Food Chem.*, 41 (9), 1413-1420.
- Ferreira, V., López, R., Escudero, A., & Cacho, J. F. (1998). *J. Chromatogr. A*, 806 (2), 349-354.
- Ferreira, V. (2002). *ACE Revista de Enología* (24).
- Ferreira, V., Ortin, N., Escudero, A., Lopez, R., & Cacho, J. (2002). *J. Agric. Food Chem.*, 50 (14), 4048-4054.
- Ferreira, V., Juan, F. S., Escudero, A., Culleré, L., Fernández-Zurbano, P., Saenz-Navajas, M. P., & Cacho, J. (2009). *J. Agric. Food Chem.*, 57 (16), 7490-7498.
- Fiches, G., Deleris, I., Saint-Eve, A., Brunerie, P., & Souchon, I. (2014). *Int. J. Mass Spectrom.*, 360, 15-23.
- Frasnelli, J., Van Ruth, S., Kriukova, I., & Hummel, T. (2005). *Chem. Senses*, 30 (7), 575-582.
- Genovese, A., Piombino, P., Gambuti, A., & Moio, L. (2009). *Food Chem.*, 114 (1), 100-107.
- Gierczynski, I., Guichard, E., & Laboure, H. (2011). *Flavour Frag. J.*, 26 (3), 141-152.
- Grosch, W. (1993). *Trends Food Sci. Tech.*, 4 (3), 68-73.
- Guth, H. (1997). *J. Agric. Food Chem.*, 45 (8), 3022-3026.
- Hansel, A., Jordan, A., Warneke, C., Holzinger, R., & Lindinger, W. (1998). *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 12 (13), 871-875.
- Heenan, S., Soukoulis, C., Silcock, P., Fabris, A., Aprea, E., Cappellin, L., Maerk, T. D., Gasperi, F., & Biasioli, F. (2012). *Food Chem.*, 131 (2), 477-484.
- Hernanz, D., Gallo, V., Recamales, A. F., Melendez-Martinez, A. J., & Heredia, F. J. (2008). *Talanta*, 76 (4), 929-935.
- Hollowood, T. A. (2002) .PhD thesis, University of Nottingham.
- Ingham, K. E., Linforth, R. S. T., & Taylor, A. J. (1995). *Food Chem.*, 54 (3), 283-288.
- King, B. M., Arents, P., Bouter, N., Duineveld, C. A. A., Meyners, M., Schroff, S. I., & Soekhai, S. T. (2006). *J. Agric. Food Chem.*, 54 (7), 2671-2677.
- Land, D. G. (1996). En: R. J. McGorin & J. V. Leland, *Flavor-Food Interactions*, vol. 633 (pág. 2-11). Washington: American Chemical Society.
- Lasekan, O., Buettner, A., & Christlbauer, M. (2009). *AJFAND*, 9 (2), 793-813.
- Lindinger, W., Hansel, A., & Jordan, A. (1998). *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, 173 (3), 191-241.
- Linforth, R., & Taylor, A. (1993). *Food Chem.*, 48 (2) 115-120.
- Linforth, R. S. T., Baek, I., & Taylor, A. J. (1999). *Food Chem.*, 65 (1), 77-83.
- Linforth, R., & Taylor, A. J. (2000). *J. Agric. Food Chem.*, 48(11), 5419-5423.
- Linforth, R., Martin, F., Carey, M., Davidson, J., & Taylor, A. J. (2002). *J. Agric. Food Chem.*, 50 (5), 1111-1117.
- Linforth, R., & Taylor, A. (2006). En: A. Voilley & P. Etievant, *Flavour in Food* (pág. 287-307). New York: CRC Press.
- Linforth, R., Cabannes, M., Hewson, L., Yang, N., & Taylor, A. (2010). *J. Agric. Food Chem.*, 58 (11), 6905-6911.
- López, R., Aznar, M., Cacho, J., & Ferreira, V. (2002). *J. Chromatogr. A*, 966 (1-2), 167-177.
- Lytra, G., Tempere, S., Le Floch, A., de Revel, G., & Barbe, J.-C. (2013). *J. Agric. Food Chem.*, 61 (36), 8504-8513.
- Maarse, H., & Visscher, C. A. (1989). *The Netherlands, Zeist Grafische Industry Kreon*.
- Margomenou, L., Birkmyre, L., Piggott, J. R., & Paterson, A. (2000). *J. I. Brewing*, 106 (2), 101-105.
- McDaniel, M., Miranda-López, R., Walson, B., Micheals, N., & Libbey, L. (1990). En: G. Charalambous, *Flavors and Off-Flavors* (pág. 23-36). Amsterdam: Elsevier.
- Mestres, M., Busto, O., & Guasch, J. (1998). *J. Chromatogr. A*, 808 (1-2), 211-218.
- Mestres, M., Kieffer, R., & Buettner, A. (2006). *J. Agric. Food Chem.*, 54 (5), 1814-1821.
- Mitropoulou, A., Hatzidimitriou, E., & Paraskevopoulou, A. (2011). *Food Res. Int.*, 44 (5), 1561-1570.
- Morell, P., Hernando, I., & Fiszman, S. M. (2014). *Trends Food Sci. Tech.*, 35 (1), 18-31.
- Muñoz-González, C., Rodríguez-Bencomo, J. J., Moreno-Arribas, M. V., & Pozo-Bayón, M. A. (2011). *Anal. Bioanal. Chem.*, 401 (5), 1497-1512.

- Muñoz-González, C., Martín-Alvarez, P., Moreno-Arribas, M. V., Pozo-Bayón, M. A. (2014). *J. Agric. Food Chem.*, 62 (1), 66-73.
- Muñoz-González, C., Rodríguez-Bencomo, J. J., Moreno-Arribas, M. V., Pozo-Bayón, M. A. (2014a). *Food Sci. Nutr.*, 2(4), 361–370.
- Muñoz-González, C., Semon, E., Martín-Alvarez, P., Guichard, E., Feron, G., Moreno-Arribas, M. V., Pozo-Bayón, M. A. *Aust. J. Grape Wine R.*, 21 (3), 367-375.
- Normand, V., Avison, S., & Parker, A. (2004). *Chem. Senses*, 29(3), 235-245.
- O’Riordan, P. J., & Delahunty, C. M. (2001). *Flavour Frag. J.*, 16 (6), 425-434.
- Ortega-Heras, M., González-SanJosé, M. L., & Beltrán, S. (2002). *Anal. Chim. Acta*, 458 (1), 85-93.
- Perestrelo, R., Nogueira, J. M. F., & Cámara, J. S. (2009). *Talanta*, 80 (2), 622-630.
- Piggott, J., & Schaschke, C. (2001). *Biomol. Eng.*, 17 (4-5), 129-136.
- Poinot, P., Arvisenet, G., Grua-Priol, J., Fillonneau, C., & Prost, C. (2009). *Food Res. Int.*, 42 (5-6), 717-726.
- Poinot, P., Arvisenet, G., Ledauphin, J., Gaillard, J.-L., & Prost, C. (2013). *Food Qual. Prefer.*, 28(1), 304-316.
- Polásková, P., Herszage, J., & Ebeler, S. E. (2008). *Chem. Soc. Rev.*, 37 (12), 2478-2489.
- Pollien, P., Ott, A., Montigon, F., Baumgartner, M., Muñoz-Box, R., & Chaintreau, A. (1997). *J. Agric. Food Chem.*, 45 (7), 2630-2637.
- Pozo-Bayón, M. A., Pueyo, E., Martín-Álvarez, P. J., & Polo, M. C. (2001). *J. Chromatogr. A*, 922 (1-2), 267-275.
- Pozo-Bayón, M. A. (2009). Estrategias en el estudio del aroma de los alimentos y su relación con la percepción del aroma (http://www.percepnet.com/ciencia/aroma_alimentos_consumo_cien1009.htm).
- Pozo-Bayón, M. A., & Reineccius, G. (2009). En: M. V. Moreno-Arribas & P. Carmen, *Wine Chemistry and Biochemistry* (pág. 417-435). New York: Springer Science + Business Media.
- Pozo-Bayón, M., Santos, M., Martín-Álvarez, P., & Reineccius, G. (2009). *Flavour Frag. J.*, 24 (5), 226–233.
- Pozo-Bayón, M. A., Pimenta, P., Pilch, S., Masters, J., Martín-Álvarez, P., & Reineccius, G. (2010). *J. Agric. Food Chem.*, 58 (8), 5034–5041.
- Rabe, S., Krings, U., Banavara, D. S., & Berger, R. G. (2002). *J. Agric. Food Chem.*, 50 (22), 6440-6447.
- Rabe S, Linforth R, Krings U, Taylor A, Berger R. (2004a). *Chem. Senses*, 29 (2), 163-173.
- Rabe, S., Krings, U., & Berger, R. (2004b). *Chem. Senses*, 29 (2), 153-162.
- Rapp, A., & Mandery, H. (1986). *Experientia*, 42 (8), 873-884.
- Roozen, J., & Legger-Huysman, A. (1995). En: M. Rothe & H. Kruse (pág. 627-632). Eusenach: Potsdam-Rehbrücke: Eigenverlag Deutsches Institut für Ernährungsforschung.
- Roudnitzky, N., Bult, J. H. F., de Wijk, R. A., Reden, J., Schuster, B., & Hummel, T. (2011). *Behav. Brain Res.*, 216 (1), 109-115.
- Ruijschop, R. M. A. J., Burgering, M. J. M., Jacobs, M. A., & Boelrijk, A. E. M. (2009). *Chem. Senses*, 34 (5), 395-403.
- Salles, C., Tarrega, A., Mielle, P., Maratray, J., Gorria, P., Liaboeuf, J., & Liodenot, J. J. (2007). *J. Food Eng.*, 82 (2), 189-198.
- Salles, C., Chagnon, M.-C., Feron, G., Guichard, E., Laboure, H., Morzel, M., Semon, E., Tarrega, A., & Yven, C. (2011). *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 51 (1), 67-90.
- Small D.M., Gerber J., Mak Y.E., Hummel T. (2005). *Neuron*, 47(4) pp. 593–605.
- Soukoulis, C., Cappellin, L., Aprea, E., Costa, F., Viola, R., Maerk, T. D., Gasperi, F., & Biasioli, F. (2013). *Food Bioprocess Tech.*, 6 (10), 2831-2843.
- Spanel, P., & Smith, D. (1999). *RCM*, 13 (7), 585-596.
- Spitaler, R., Araghypour, N., Mikoviny, T., Wisthaler, A., Via, J. D., & Märk, T. D. (2007). *Int. J. Mass Spectrom.*, 266 (1-3), 1-7.
- Stephan, A., Bucking, M., & Steinhart, H. (2000). *Food Res. Int.*, 33 (3-4), 199-209.
- Styger, G., Prior, B., & Bauer, F. F. (2011). *J. Ind. Microbiol. Biot.*, 38 (9), 1145-1159.
- Taylor, A. J. (1996). *Compr. Rev. Food Sci. F.*, 36 (8), 765-784.
- Taylor, A. J., & Linforth, R. S. T. (2000). En: D. D. Roberts & A. J. Taylor, *Flavour release*, vol. 763 (pág. 8-21). Washington: ACS Publications.
- Taylor, A. (2002). *Compr. Rev. Food Sci. F.* 1(2), 45-57.
- Taylor, A. J., & Linforth, R. S. T. (2003). *Int. J. Mass Spectrom.*, 223-224, 179-191.
- Tsevdou, M., Soukoulis, C., Cappellin, L., Gasperi, F., Taoukis, P. S., & Biasioli, F. (2013). *Food Chem.*, 138 (4), 2159-2167.
- Ullrich, F., & Grosch, W. (1987). *Z. Lebensm. Unters. For.*, 184 (4), 277-282.
- Van Ruth, S., Roozen, J., & Cozijnsen, J. (1994). En: H. Maarse & D. Van Der Heij, *Trends in Flavor Research* (pág. 59-64). Amsterdam: Elsevier Science.
- Van Ruth, S., & Roozen, J. (2000). *Food Chem.*, 713 (3), 339-345.
- Villamor, R. R., & Ross, C. F. (2013). *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, 4, 1-20.
- Warneke, C., Rosen, S., Lovejoy, E., De Gouw, J., & Fall, R. (2004). *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 18 (1), 133-134.
- Warneke, C., De Gouw, J., Lovejoy, E., Murphy, P., Kuster, W., & Fall, R. (2005). *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, 16 (8), 1316-1324.
- Weel, K. G. C., Boelrijk, A. E. M., Burger, J. J., Claassen, N. E., Gruppen, H., Voragen, A. G. J., & Smit, G. (2003). *J. Agric. Food Chem.*, 51 (16), 4746-4752.
- Weel, K. G. C., Boelrijk, A. E. M., Burger, J. J., Verschueren, M., Gruppen, H., Voragen, A. G. J., & Smit, G. (2004). *J. Agric. Food Chem.*, 52 (21), 6564-6571.
- Yeretzyan, C., Jordan, A., Brevard, H., & Lindinger, W. (2000). En: *Flavour release*, vol. 763 (pág. 58-72). Washington D.C.: ACS Publications.
- Yven, C., Guessasma, S., Chaunier, L., Della Valle, G., & Salles, C. (2010). *J. Food Eng.*, 101 (1), 85-91.