



Tesis Doctoral

**Fenotipado rápido de germoplasma de tomate por
características de calidad organoléptica para su uso en
programas de mejora**



Presentada por:

Ginés Ibáñez Vidal

Dirigida por:

Dr. Salvador Antonio Roselló Ripollés

Dr. Jaime Cebolla Cornejo

Octubre de 2019



UNIVERSITAT
JAUME·I

Programa de Doctorado en Ciencias

Escuela de Doctorado de la Universitat Jaume I

Fenotipado rápido de germoplasma de tomate por características de calidad organoléptica para su uso en programas de mejora

Memoria presentada por Ginés Ibáñez Vidal para optar al
grado de doctor por la Universitat Jaume I

Ginés Ibáñez Vidal

Dr. Salvador A. Roselló
Ripollés

Dr. Jaime Cebolla
Cornejo

Castellón de la Plana, Octubre de 2019

Financiación recibida

Agencias financiadoras del doctorando:

Universitat Jaume I, a través de un contrato predoctoral (PREDOC/2015/45).

Agencias financiadoras del proyecto de investigación o de los recursos materiales específicos del grupo de investigación:

Universitat Jaume I, la cual ha cubierto de forma parcial los gastos, a través de la concesión de los proyectos P1-1B2011-41 y COGRUP/2016/04.

Tesis por compendio de las siguientes publicaciones:

Ibáñez, G., Cebolla-Cornejo, J., Martí, R., Roselló, S. y Valcárcel, M., 2019. Non-destructive determination of taste-related compounds in tomato using NIR spectra. *Journal of Food Engineering*, 263: 237-242. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.098>. Journal Impact Factor: 3.625 (26/135 Food Science & Technology (Q1)).

Ibáñez, G., Valcárcel, M., Cebolla-Cornejo, J. y Roselló, S., 2019. FT-MIR determination of taste-related compounds in tomato: a high throughput phenotyping analysis for selection programs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99: 5140-5148. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.9760>. Journal Impact Factor: 2.422 (9/56 Agriculture, Multidisciplinary (Q1)).

Valcárcel, M., Ibáñez, G., Martí, R., Beltrán, J., Cebolla-Cornejo, J., y Roselló, S., 2019. Evaluation of the volatile profile in breeding programs using e-noses: the role of drift correction. *Food Chemistry (Enviado)*. Journal Impact Factor: 5.399 (7/135 Food Science & Technology (Q1)).

Esta tesis dispone de la aceptación de los coautores de las publicaciones que el doctorando presenta como tesis y su renuncia expresa a presentarlas como parte de otra tesis doctoral.

“Nada es más gozoso que el trabajo de un agricultor que cultiva la tierra”

Calendario de la sabiduría (1909)

León Tolstói

“El verdadero agricultor procurará aprovechar su parcela, no explotarla”

El horticultor autosuficiente (1978)

John Seymour

“Todo lo que somos se lo debemos a la agricultura”

Comer sin miedo (2014)

José Miguel Mulet

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a mis directores de tesis, Salva y Jaime, por haberme dado la oportunidad de llevar a cabo mi etapa investigadora y por todo lo aprendido durante todos estos años. En especial a Salva, a quien conocí hace ya una década en la UJI cuando empecé la ITA. Igualmente quisiera agradecer la ayuda recibida por parte de Raúl y Merche.

En segundo lugar, quería dar las gracias a mis padres Miguel y Paqui por la educación recibida y también quiero dar las gracias a mi hermana Fátima. No quiero olvidarme de mis dos abuelos Vicente y Miguel, quienes de algún modo me transmitieron la pasión por la agricultura.

También al uruguayo llamado Alejandro, quien además de ser mi amigo estuvo a mi lado en el laboratorio durante mucho tiempo hasta que defendió su tesis y se convirtió en doctor: ahora es mi turno.

Y como no, quiero agradecer al resto de amigos y compañeros del piso de arriba (tanto a los que siguen allí como a los que ya no están): Marta, Sara, Tico, Jorge y Damián. Muchas gracias por haberme aceptado como si fuera uno más de vuestro grupo y por todos los buenos ratos que hemos pasado.

A Pilar, que siempre me ha ayudado en las tareas de la parcela y del invernadero.

¡Muchas gracias a todos!

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ABREVIATURAS.....	ix
RESUMEN	xiii
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. Importancia económica del tomate	3
2. El tomate en un mercado globalizado.....	4
3. Evolución del mercado de semillas: objetivos de los programas de mejora	6
4. La calidad en el tomate	8
4.1. Definición de calidad	8
4.2. Percepción de la calidad.....	9
4.3. Calidad externa.....	9
4.4. Calidad interna	10
4.4.1. Calidad organoléptica.....	10
4.4.2. Calidad nutritiva y funcional	11
4.4.3. Seguridad y formas de producción de los alimentos	12
5. Estrategias de mejora de la calidad organoléptica del tomate.....	13
5.1. Mejora mediante ingeniería genética.....	13
5.2. Mejora convencional.....	17
6. Dificultades en el fenotipado del tomate.....	20
6.1. Influencia del genotipo, el ambiente y su interacción	20
6.2. Metodologías de evaluación de la calidad organoléptica.....	22
7. Posibilidades de uso de la espectroscopía de infrarrojo para el fenotipado rápido de características de calidad relacionadas con el gusto	24
7.1. NIR	26
7.1.1. Aspectos generales.....	26
7.1.2. Tipos de equipos	27
7.1.3. Ventajas e inconvenientes	28
7.1.4. Partes del equipo	30
7.2. MIR	32
7.2.1. Aspectos generales.....	32
7.2.2. Tipos de equipos	35

7.2.3. Ventajas e inconvenientes	38
7.2.4. Partes del equipo	40
7.3. Quimiometría aplicada a la espectroscopía del infrarrojo.....	44
7.3.1. Pretratamiento de datos.....	44
7.3.2. Modelización	47
7.3.3. Métodos de regresión	47
7.3.4. Eliminación de puntos anómalos (<i>outliers</i>).....	49
7.3.5. Evaluación de la precisión de los modelos.....	49
7.4. Aplicabilidad de la espectroscopía infrarroja al estudio de la calidad en tomate	52
8. Posibilidades de uso de los sistemas multisensor para el fenotipado rápido de características de calidad relacionadas con el aroma.....	54
8.1. Aspectos generales.....	54
8.2. Tipos de equipos	56
8.2.1 Sistemas tradicionales.....	56
8.2.2. Sistemas híbridos	56
8.3. Ventajas e inconvenientes	57
8.4. Partes del equipo	57
8.5. Quimiometría aplicada a los sistemas multisensor.....	61
8.5.1. Métodos para la corrección de deriva	62
8.5.2. Pretratamiento de la señal.....	65
8.5.3. Técnicas de reconocimiento de patrón.....	66
8.6. Aplicabilidad de los sistemas multisensor al estudio de la calidad en tomate	68
9. BIBLIOGRAFÍA.....	71
OBJETIVOS.....	99
CAPÍTULO 1	103
1. Introduction.....	106
2. Material and methods.....	107
2.1. Plant material	107
2.2. Acquisition of NIR spectra	108
2.3. Quantification of sugars and acids with capillary electrophoresis.....	108
2.4. Chemicals and reagents	108
2.5. Data analysis	109
3. Results and discussion.....	110
3.1. Prediction models	110
3.1.1. SSC.....	110
3.1.2. Sugars and acids	114

4. Conclusions.....	115
Acknowledgements.....	115
References.....	116
CAPÍTULO 2	119
INTRODUCTION	122
MATERIALS AND METHODS	123
<i>Plant Material</i>	123
<i>Sample preparation</i>	123
<i>Infrared spectroscopy analysis</i>	124
<i>CZE analysis</i>	124
<i>Data analysis</i>	124
RESULTS.....	125
<i>Characterization of sample sets</i>	126
<i>FT-MIR prediction models</i>	128
<i>Prediction of an external assay</i>	131
DISCUSSION.....	132
CONCLUSIONS	135
ACKNOWLEDGMENTS	135
REFERENCES	136
CAPÍTULO 3	139
1. Introduction.....	143
2. Materials and Methods.....	146
<i>2.1 Experimental design</i>	146
<i>2.2 Plant material and tomato-like synthetic standards</i>	146
<i>2.3 Electronic nose and data acquisition</i>	148
<i>2.4 Drift correction and inter-sequence standardization</i>	149
3. Results and discussion.....	151
<i>3.1 Short-term drift correction</i>	151
<i>3.2 Long-term drift correction and data standardization.</i>	156
4. Conclusions.....	161
5. Acknowledgments.....	162
6. References.....	162
DISCUSIÓN GENERAL	167
CONCLUSIONES	183
ANEXO	187

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO 1

Table 1. Statistical parameters of the sample sets used for the calibration and validation of PLS models. N_c : number of samples used for calibration; N_v number of samples used for validation. N: Navarra; E: Extremadura.

Table 2. Performance of NIR based models using partial least squares (PLS) regression predicting contents of taste-related compounds. SSC: soluble solids content; R^2 coefficient of determination; RMSE: root mean squared error; C: calibration; CV: cross-validation; P: prediction; RPD: residual prediction deviation.

Table 3. Performance of NIR based models using partial least squares (PLS) regression for cross-predicting soluble solids content in other assays. SSC: soluble solids content; R^2_p coefficient of determination of the predictions; RMSEP: root mean squared error of the predictions. N: Navarra; E: Extremadura. For each sample set (calibration and validation), the number of samples is indicated.

CAPÍTULO 2

Table 1. Statistical parameters of the samples regarding the accumulation of soluble solids content (SSC), sugars and acids contents using refractometry and capillary zone electrophoresis. For each sample set the characteristics of the samples used for calibration (n_c) and those used for prediction (n_v) are indicated. An external assay was included only to predict values using the general model.

Table 2. Performance of the partial least squares (PLS) regression models predicting taste-related compounds content from ATR FT-MIR spectra.

Table 3. Values of sensitivity and specificity obtained using the general PLS model in plant selection for high content of taste-related constituents when applying a selection pressure of 10% or 20%. Samples from the general model validation set group and the external assay (processing tomato grown in Navarra) were evaluated. Mean percentiles of selected plants are also provided.

Table 4. Performance of the predictions made for the external assay (processing tomato grown in Navarra; 111 samples) obtained with the general model and the specific model of sample set 1 (processing tomato grown in Extremadura). R^2_p correlation coefficient of the prediction; RMSEP: root mean squared error of the prediction ($^{\circ}$ Brix for SSC and g kg^{-1} for individual compounds).

CAPÍTULO 3

Table 1: Tomato-like synthetic standard TomSSt_4's volatile composition (ng mL^{-1}).

Table 2. Description of the tomato accessions tested and their assignment in the different work-sequences in the two assays performed.

Supplementary Table 1. Percentage of sample correctly classified using KNN and PLS-DA classification methods for seven tomato cultivars and the tomato-like synthetic standard 2, before (raw data) and after intra-sequence drift correction using our adaptation of Salit & Turk and PLS component correction method, the original Salit & Turk (1998), ICA (Di Natale et al., 2002) and PARAFAC2 (Skov & Bro, 2005) methods. Data are an average of three work-sequences (variation range in brackets).

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN GENERAL

Figura 1. Evolución de la producción y la superficie cultivada de tomate durante los últimos 10 años (datos 2017; FAO, 2019).

Figura 2. Producción de tomate de los 8 primeros países del ranking (datos 2017; FAO, 2019).

Figura 3. Valor promedio de consumo de tomate ($\text{kg capita}^{-1} \text{ año}^{-1}$) en las diferentes regiones del mundo (datos 2013; FAO, 2019).

Figura 4. Variedad tradicional de tomates “morados”.

Figura 5. Distribución de la radiación incidente en el fruto: a = reflectancia especular, b = reflectancia difusa, y c = transmitancia (modificado de Xie et al., 2016).

Figura 6. Modos de detección: a) reflectancia difusa, b) transmitancia y c) transflectancia. (1) fuente de luz, (2) fruto, (3) monocromador/detector, (4) soporte y (5) barrera (modificado de Xie et al., 2016).

Figura 7. Espectro infrarrojo de absorción de una muestra de tomate en el equipo portátil Cary 630 FT-MIR.

Figura 8. Esquema de un ATR de 5 rebotes.

Figura 9. Partes de un FT-MIR (modificado de Smith 2011).

Figura 10. Esquema de similitudes entre la nariz humana y la nariz electrónica (modificado de Santos et al., 2017 y Jia et al., 2019).

CAPÍTULO 2

Figure 1: FT-MIR spectra of tomato samples in the $4000\text{-}650 \text{ cm}^{-1}$ region (a) and in the $1500\text{-}900 \text{ cm}^{-1}$ region (b) used for chemometric analysis.

Figure 2. Predicted (ATR FT-MIR) vs. measured (CZE) glucose contents using the partial least squares (PLS) regression model for sample set 1 (processing tomato in Extremadura). Grey dots: samples used to calibrate the PLS model; red diamonds: samples used to predict using the PLS model.

Supplementary figure 1. Heatmap of pairwise correlations between statistical parameters of the model samples and the performance of PLS regression models. rRMSE: root mean squared error/mean*100; C: calibration; CV: cross-validation; P: prediction

CAPÍTULO 3

Fig. 1. Similarity maps of volatile electronic profiles from raw signals (on the left) and short-term drift-corrected signals (on the right) data from samples tested in three different work sequences assayed in the first assay. Sample codes as indicated in Table 2. TomSSt = Tomato-like synthetic standard. Ellipsoids represent confidence intervals ($p=0.05$) for samples with more than three replicates.

Fig. 2. Sensors response in the evaluation of tomato “Caramba” samples in (top) long work sequences (22h) and (bottom) short work sequences (8h). On the left: Raw sensor signals (a, c). On the right: intra-sequence drift corrected sensor signal (e, f). Legends (b, d) show the evolution of sensor signals %RSD before and after applying intra-sequence drift correction (first and second value in parenthesis). External reference %RSD values using the same equipment and 6 injections is provided in square brackets (Xu et al., 2015).

Fig. 3. PLS-DA similitude map from electronic nose fingerprints for the 6 control samples in three different work sequences (a) with short-term drift correction only and (b) with short-term drift correction + long term drift correction using sequence standardization (b). Confidence ellipsoids ($P=0.05$) are represented for samples with more than 4 repetitions. TomSSt: tomato-like synthetic standards. 1: “Zayno RZ”; 2: BGV005718 (real tomato samples used as controls). _1, _2, _3: sequence number.

Fig. 4. PLS-DA similitude map merging data from four tomato-like synthetic standards (TomSSt) and 14 tomato varieties, obtained in three different work sequences. (a) using raw data, (b) using short-term intra-sequence drift correction + long-term drift correction using sequence standardization. Confidence ellipsoids ($P=0.05$) are represented for samples with more than four repetitions. 1: “Zayno RZ”; 2: BGV005718; 3: “Caramba”; 4: UJI011; 5: “Divyne RZ”; 6: “Vinchy RZ”; 7: UJI023; 8: BGV005477; 9: BGV005651; 10: BGV005655; 11: BGV004587; 12: UJI008; 13: UJI014; 14: UJI028. _1, _2, _3 samples analyzed in different sequences.

ABREVIATURAS

AADC: Aromatic Amino Acid Decarboxylase.

AAT1: Alcohol Acetyl Transferase.

ADH2: Alcohol dehydrogenase 2.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ANN: (Artificial Neural Network). Redes Neuronales Artificiales.

AOTF: . (Acousto-Optic Tunable Filter). Filtros ajustables acústico-ópticos.

ARNi: Ácido ribonucleico de interferencia.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

ART: (Adaptative Resonance Theory). Teoría de la Resonancia Adaptativa.

ATR: (Attenuated Total Reflection). Reflectancia total atenuada.

CA: (Cluster Analysis). Análisis de clúster.

CC: (Component Correction). Corrección de componentes.

CCD: (Charge-Coupled Device). Dispositivo de carga acoplada.

CCD1: Carotenoid Cleavage Dioxygenase 1.

CG-EM: Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.

CSS: Contenido en sólidos solubles.

CXE1: Carboxylesterase 1.

CZE: (Capillary Zone Electrophoresis). Electroforesis Capilar Zonal.

DHS: (Dynamic Headspace). Espacio de cabeza dinámico.

DTGS: (Deuterated Triglycine Sulfate). Sulfato de triglicina deuterado.

EPL: (Effective Path Length). Longitud efectiva de paso.

FAO: (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

FIR: (Far Infrared). Infrarrojo lejano.

FT-MIR/FTIR: Fourier Transform Mid Infrared.

FT-NIR: Fourier Transform Near Infrared.

GES: Geraniol synthase.

GPP: Geraniol diphosphate.

HPLC: (High Performance Liquid Chromatography). Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

ICA: (Independent Component Analysis). Análisis de componentes independientes.

INVINH1: (Invertase Inhibitor 1).

IR: (Infrared). Infrarrojo.

LD: (Laser diode). Diodos láser.

LDA: (Linear Discriminant Analysis). Análisis lineal discriminante.

LED: (Light-Emitting Diode). Diodos emisores de luz.

LIS: S-linalool synthase.

LS-SVM: (Least Squares Support Vector Machine). Máquinas de vectores soporte de mínimos cuadrados.

LV: (Latent Variables). Variables latentes.

MAPA: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

MDC: (Multiplicative Drift Correction). Corrección de deriva multiplicativa.

MIR: (Mid Infrared). Infrarrojo medio.

MLR: (Multiple Linear Regression). Regresión lineal múltiple.

MOS: (Metal Oxide Semiconductor). Semiconductor de óxidos metálicos.

MOSFET: (Metal Oxide Semiconductor Field Effect Transistor). Semiconductores de óxidos metálicos basados en efecto de campo.

MSC: (Multiplicative Scatter Correction). Corrección de la dispersión multiplicativa.

NIR: (Near Infrared). Infrarrojo cercano.

OSC: (Orthogonal Signal Correction). Corrección ortogonal de la señal.

PAS: (Photoacoustic Infrared Spectroscopy). Espectroscopía infrarroja fotoacústica.

PCA: (Principal Component Analysis). Análisis de componentes principales.

PCR: (Principal Component Regression). Regresión del componente principal.

PDA: (Photodiode Array). Matriz de fotodiodos.

PLS: (Partial Least Squares). Regresión parcial mínimo cuadrática.

PLS-DA: (Partial Least Squares Discriminant Analysis). Análisis discriminante basado en regresiones parciales mínimo cuadráticas.

ppm: partes por millón.

QTL: (Quantitative Trait Loci). Locus de un carácter cuantitativo.

RAPD: (Random Amplification of Polymorphic DNA). Ampliación aleatoria del ADN polimórfico.

RER: (Range Error Ratio). Relación error a rango.

RFLP: (Restriction Fragment Length Polymorphism). Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción.

RILs: (Recombinant Inbred Lines). Líneas puras recombinantes.

RMSE: (Root Mean Squared Error). Error mínimo cuadrático.

RMSEC: (Root Mean Squared Error of Calibration). Error mínimo cuadrático de calibrado.

RMSECV: (Root Mean Squared Error of Cross Validation). Error mínimo cuadrático de validación cruzada.

RMSEP: (Root Mean Squared Error of Prediction). Error mínimo cuadrático de predicción.

RPD: (Residual Prediction Deviation). Desviación residual predictiva.

SE: (Standard Error). Error estándar.

SEP: (Standar Error of Prediction). Error estándar de predicción.

SPME: (Solid Phase Microextraction). Microextracción en fase sólida.

SHS: (Static Headspace). Espacio de cabeza estático.

SNV: (Standard Normal Variate). Variación normal estándar.

SOM: (Mapas de autoorganización). Mapas auto-organizados.

SVM: (Support Vector Machines). Máquinas de vectores soporte.

TRAMP: (Tomato ripening-associated membrane protein). Proteína de membrana asociada a la maduración del tomate.

TSWV: (Tomato Spotted Wilt Virus). Virus del bronceado del tomate.

TYLCV: (Tomato Yellow Leaf Curl Disease). Virus del rizado amarillo del tomate.

RESUMEN

La mejora de la calidad organoléptica, y más específicamente del sabor, se ha convertido en un objetivo principal en el desarrollo de programas de mejora genética en tomate. El propósito reside en aumentar los contenidos de los compuestos relacionados con la percepción del sabor, sin que estos se vean afectados al mejorar otra característica, como podría ser la resistencia a enfermedades.

Este ha sido el objetivo principal de la tesis: desarrollar metodologías de fenotipado indirecto específicamente orientadas a satisfacer las necesidades de las evaluaciones en programas de mejora.

Para ello, se han llevado a cabo métodos de cuantificación indirectos que permitan disminuir costes y tiempos de análisis en el cribado previo de gran cantidad de materiales. En el caso de los azúcares y ácidos relacionados con la percepción del gusto se han desarrollado métodos basados en la espectroscopía del infrarrojo cercano (NIR) y medio (MIR). En cuanto a los volátiles relacionados con el aroma se ha optado por optimizar el uso de sistemas multisensor o nariz electrónica para caracterizar el perfil volátil de muestras de tomate.

La ventaja del método basado en espectroscopía NIR por reflectancia difusa es que permite la cuantificación indirecta de azúcares y ácidos sin necesidad de destruir la muestra, lo que acorta los tiempos de análisis. Sin embargo, a cambio la eficiencia de las determinaciones es notablemente inferior a las obtenidas en el caso del infrarrojo medio. En cualquier caso, la raíz del error cuadrático medio para la predicción (RMSEP, expresado como %media) fue menor del 6.1% para el contenido en sólidos solubles totales (CSS), 13.3% para fructosa, 14.1% para glucosa, 12.7% para ácido cítrico, 13.8% para ácido málico y 21.9% para ácido glutámico. Valores razonables tratándose de una evaluación no destructiva de frutos con estructura interna irregular. El uso de modelos generales con niveles amplios de variación no mejora la eficiencia de los modelos específicos adaptados a tipos varietales. La principal desventaja de la metodología reside en la necesidad de desarrollar calibrados internos para cada ensayo específico, ya que los modelos obtenidos no son extrapolables a muestras externas, al contar con un nivel de RMSEP elevado (mayor de 21% de la media en el caso de los azúcares).

El uso de espectroscopía MIR con transformada de Fourier (FT-MIR) empleando reflectancia total atenuada (ATR) de cinco rebotes tiene el inconveniente de tener que procesar las muestras, pero por otra parte la mejora en el fenotipado indirecto es sustancial. En este caso el modelo general presentó una eficiencia intermedia entre el mejor y el peor de los modelos específicos. Aumentar el número de muestras en el calibrado de los modelos no parece aumentar la eficiencia de los mismos, ya que el error relativo del modelo se correlaciona positivamente con el coeficiente de variación del contenido detectado en las muestras de calibrado y negativamente con el valor mínimo. Con el modelo general los valores de RMSEP fueron inferiores al 15% del contenido medio y del 6% de los contenidos máximos de las muestras en el caso del CSS y contenidos en glucosa, fructosa y ácido cítrico. La eficiencia en la determinación de los ácidos málico y glutámico fue inferior, probablemente por la baja

concentración en tomate. La eficiencia de un modelo general es superior a la obtenida con un modelo específico aplicado a la cuantificación de muestras externas de las mismas variedades en un ambiente distinto y en general ofrece valores de RMSEP inferiores al 21% de los contenidos medios. Mejor aún, el modelo general aplicado a la evaluación de ensayos externos ofreció valores de sensibilidad superiores al 70% y de especificidad mayores de 96%. El análisis del percentil promedio de las muestras seleccionadas permitió comprobar que aquellas incorrectamente seleccionadas presentaban contenidos muy próximos al umbral de selección.

Finalmente se han puesto las bases para el uso de un sistema multisensor, o nariz electrónica, aplicado a programas de mejora. Para ello ha sido necesario corregir los efectos de deriva de los sensores tanto a corto plazo, dentro de cada secuencia, como a largo plazo, entre secuencias, mediante el uso de un patrón sintético con una composición de volátiles característica de tomate, así como aplicar una estandarización entre las secuencias obtenidas en diferentes días de trabajo. Con esta metodología integral de corrección de deriva se puede conseguir una corrección intrasecuencia con una reducción de entre 1 y 27% de RSD de señal y una muy buena estandarización entre secuencias con un 94.4 % de éxito en la superposición de muestras del mismo material. Ello permite disponer de huellas electrónicas de la composición en volátiles de una muestra y relacionarlo con los datos disponibles en librerías elaboradas de forma previa. De esta forma se puede evaluar la variación experimentada en los materiales respecto por ejemplo a un parental recurrente o una línea objetivo de reconocida calidad organoléptica.

INTRODUCCIÓN GENERAL



1. Importancia económica del tomate

El tomate, *Solanum lycopersicum* L., es una de las hortalizas más importantes a nivel mundial. En el año 2017 fue la tercera hortaliza más producida, por detrás de la patata y la mandioca, alcanzando una producción de algo más de 182 millones de toneladas y ocupando una superficie de 4.848.384 hectáreas (FAO, 2019). El mercado sigue siendo muy dinámico y la producción a nivel mundial sigue una tendencia al alza (Figura 1). El estancamiento durante los últimos años de la superficie cultivada pone en evidencia el notable incremento del rendimiento a nivel mundial.

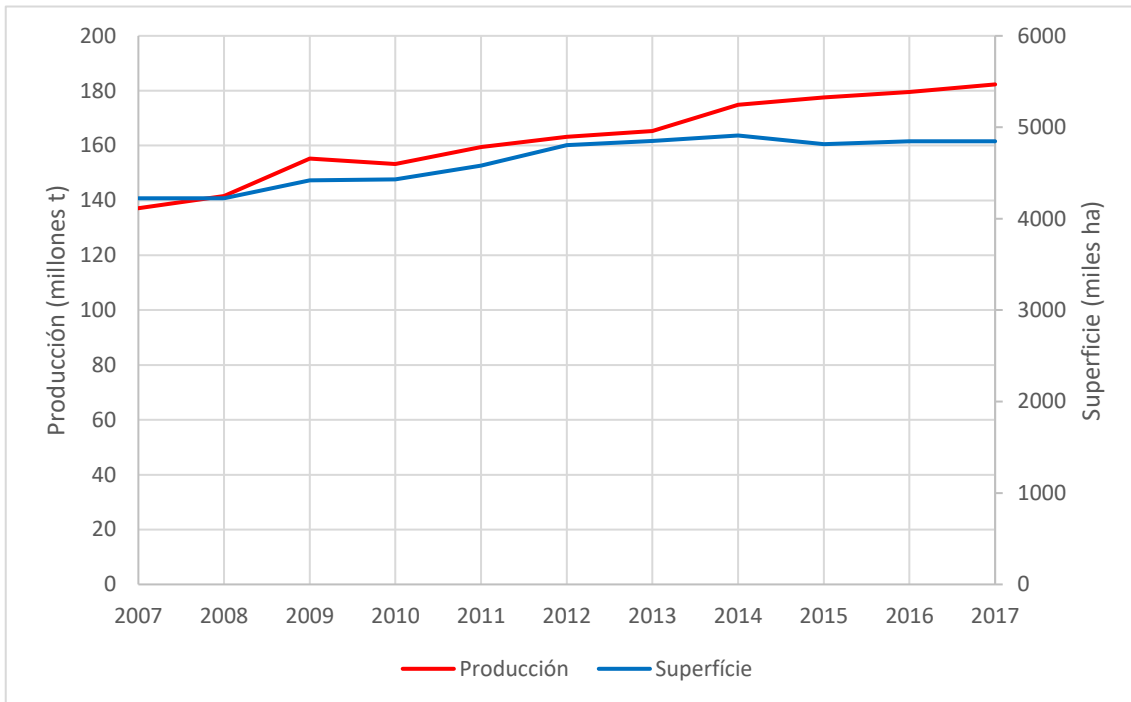


Figura 1. Evolución de la producción y la superficie cultivada de tomate durante los últimos 10 años (datos 2017; FAO, 2019).

Aunque no es la hortaliza más producida, si es la que lidera el comercio a nivel mundial con un valor económico de casi 65 billones de dólares estadounidenses, sobre todo los tomates para consumo en fresco (FAO, 2019). La popularidad del tomate se relaciona con la posibilidad de comerlo de diferentes formas, ya sea en fresco o como producto procesado. Desde ambas perspectivas se dispone de un elevado grado de diversificación. En el caso del consumo en fresco abasteciendo distintos tipos varietales, principalmente el clásico redondo.

Del total de la producción mundial la mayor parte proviene de China (Figura 2), que produce algo más de 59 millones de toneladas, seguida de la India, Turquía, EE.UU., Egipto, Irán, Italia y España. En cuanto a la Unión Europea, esta produce algo más del 10% de la producción mundial, cerca de 18 millones de toneladas (FAO, 2019).

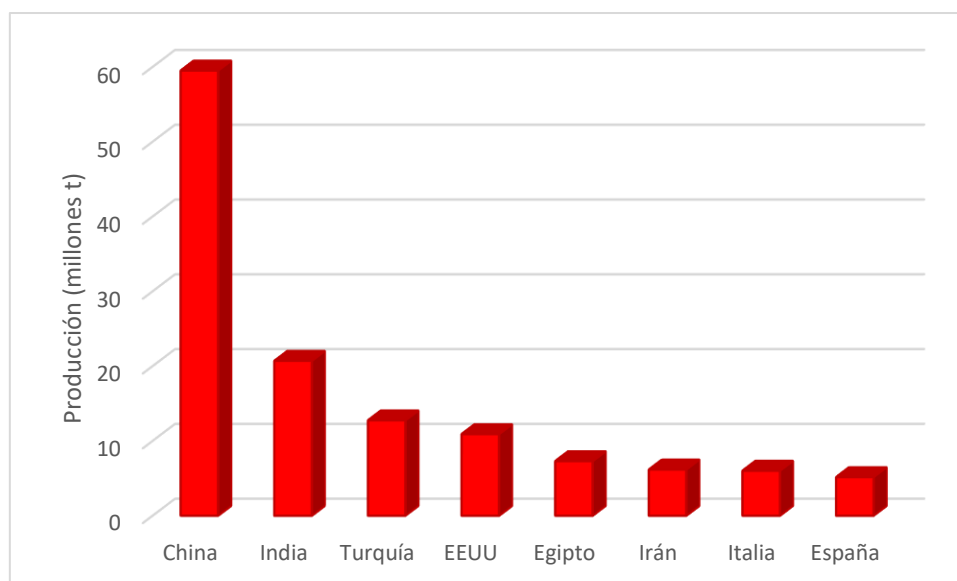


Figura 2. Producción de tomate de los 8 primeros países del ranking (datos 2017; FAO, 2019).

Por lo que respecta al ámbito nacional, en el año 2017 el cultivo de tomate en España ocupaba una superficie de 60.852 hectáreas, con una producción de 5.163.466 toneladas, cuyo valor alcanzó algo más de 2 millones de euros (MAPA, 2019). Esto supuso el 28,59% de la producción de la Unión Europea y el 2,8% de la producción mundial. En este mismo año España exportó casi el 26% de su producción global, incluyendo tomate fresco, pasta y pelado. Se trató de 1.338.020 toneladas, cuyo valor económico alcanzó los 1,45 billones de dólares estadounidenses (FAOSTAT 2019).

Un 42% de la producción española de tomate se destina al consumo en fresco, y el resto para su procesado en industria (MAPA, 2019). La mayor parte de la producción en España (un 83%) se concentra en Andalucía y Extremadura (MAPA, 2019). La primera destacando en producción de tomate fresco y la segunda de procesado. Les siguen de lejos la Región de Murcia, Navarra, Galicia, Castilla La Mancha, Comunidad Valenciana, Canarias, Aragón y Cataluña.

2. El tomate en un mercado globalizado

El tomate es una hortaliza muy apreciada, tanto es sus formas frescas como procesadas, lo que se traduce en elevados niveles de consumo. Los últimos datos disponibles son los de 2013, año en el que el consumo promedio mundial fue de 20,6 kg capita⁻¹ año⁻¹. La región del mundo donde más se consume es Norteamérica, seguida a distancia de Europa y Oceanía (Figura 3). No obstante, dentro de cada región el consumo es muy desigual y se encuentran consumos elevados en países como Turquía, Armenia, Uzbekistán, Líbano e Irán en Asia; Egipto y Túnez, en África y Grecia, Albania, Montenegro, Ucrania y España, en Europa (FAO, 2019).

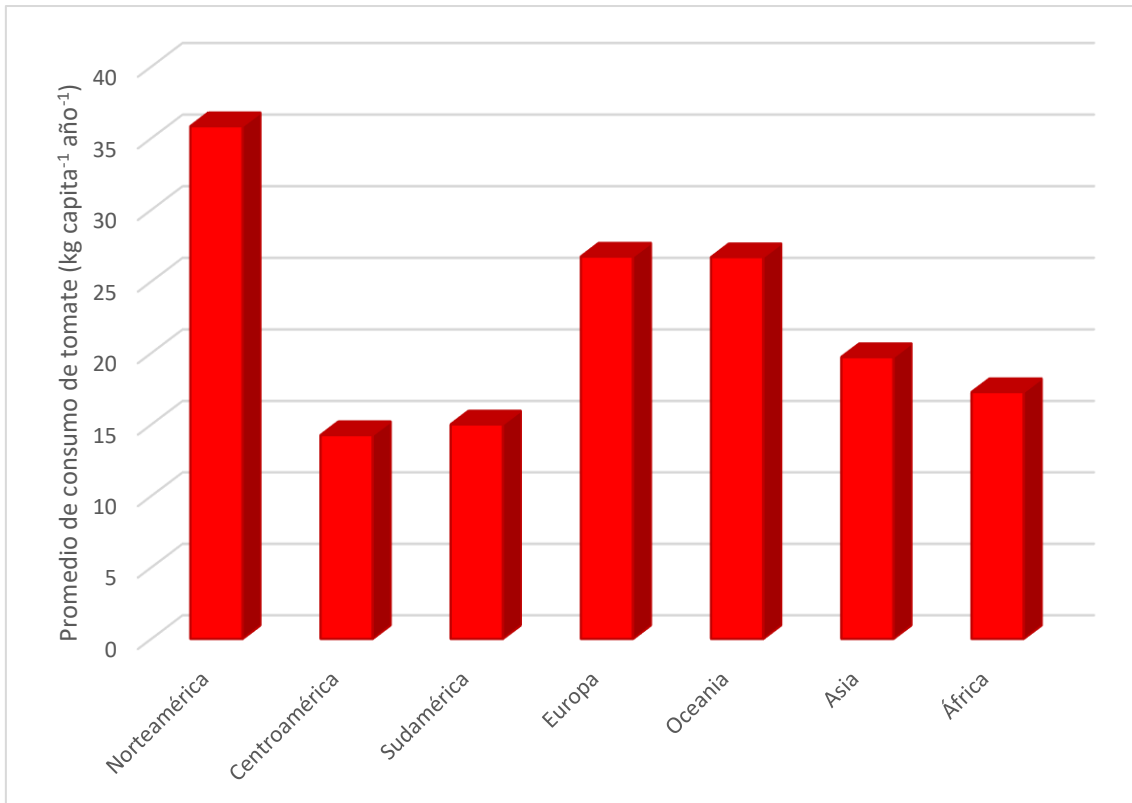


Figura 3. Valor promedio de consumo de tomate (kg capita⁻¹ año⁻¹) en las diferentes regiones del mundo (datos 2013; FAO, 2019).

Aunque el tomate se cultiva en muchas regiones del mundo, principalmente en zonas templadas con veranos largos, pero también en climas subtropicales, lo cierto es que el mercado se ha globalizado y determinadas regiones actúan como proveedoras de regiones cercanas, algo necesario considerando la limitada vida comercial del fruto. En este sentido la producción de Estados Unidos se concentra en Florida y California, representando el primer estado la mayor contribución a la producción de tomate fresco y la segunda monopolizando la producción de tomate procesado (Peralta y Spooner, 2007). Lo mismo ocurre en regiones como Europa, donde la mayor parte del consumo procede de la autoproducción con un dominio del mercado por parte de Holanda y España (Uriarte et al., 2017).

La globalización del mercado también ha supuesto la aparición de enfermedades en zonas donde antes no se encontraban (Marchoux et al., 2001). Al transportar la mercancía puede ocurrir que se traslade consigo a los patógenos. Por ejemplo, esto ha ocurrido en el caso del tomate con enfermedades como el *Tomato Yellow Leaf Curl Disease* (TYLCV), la provocada por el *Tomato Spotted Wilt Virus* (TSWV) o plagas como el minador del tomate (*Tuta absoluta* Meyrick) (Jones 2003; Gabarra et al., 2014; Vaes-Petignat y Nentwig 2014). Todos ellos provocan grandes pérdidas económicas, lo cual ha obligado a buscar e introducir resistencias en las nuevas variedades (Soler et al., 2003; Julian et al., 2013; Lima et al., 2015).

No sólo el mercado de productos finales, plagas y enfermedades se ha globalizado. Esta tendencia también ha afectado al mercado de semillas. Antes de los años 70 existían numerosas casas de semillas de pequeño y mediano tamaño, tanto a escala regional como nacional. A

mediados de los 70, grandes químicas entraron en el mercado de semillas absorbiendo casas ya existentes. Este proceso se aceleró en los 80 ante el interés creado por los desarrollos en biotecnología, que llevó a un complejo proceso de compras y fusiones durante los 90 y hasta la actualidad (Fernandez Cornejo, 2004). De esta forma, ya en 2011 más de la mitad del mercado propietario de semillas estaba controlado por sólo tres empresas (Howard, 2015).

3. Evolución del mercado de semillas: objetivos de los programas de mejora

El aumento de la productividad fue el primer objetivo que se estableció en el cultivo del tomate. Ya a principios de siglo se descubrió el potencial del vigor híbrido en tomate para el aumento de la productividad y como sistema de protección de la propiedad intelectual (Hedrick y Booth, 1907). Sin embargo, en los años 30 la aparición de varias enfermedades, como por ejemplo *Fusarium*, provocaron grandes pérdidas de producción y obligaron a mejorar los cultivares de tomate introduciendo genes de resistencia a enfermedades. En poco tiempo estas mejoras ya se incorporaban en híbridos F1, como el primero comercializado, el *Single Cross* en Holanda (Dorst, 1946)

De este modo, hasta los años 60 los mejoradores se centraron en obtener cultivares de tomate más productivos y resistentes frente a varias enfermedades para de este modo aumentar los beneficios tanto del agricultor como del comercializador, satisfaciendo así sus demandas.

Ya en los años 60 la globalización exigió una serie de nuevas demandas centradas únicamente en el comercializador, de modo que este pudiera distribuir sus frutos a cualquier parte del mundo. Para ello se obtuvieron nuevos materiales con mayor firmeza que permitieron su manipulación y comercialización a gran escala, gracias al descubrimiento de los genes de larga vida (*shelf life*), *nor* (*non-ripening*) y *rin* (*ripening inhibitor*), los cuales retrasan la maduración del fruto al actuar en la ruta de biosíntesis del etileno (revisado por Paran y van der Knaap, 2007).

A partir de este momento existe una clara diferencia entre los tomates de consumo en fresco y los tomates de industria, cuyos objetivos de mejora son distintos. En el caso del tomate de industria los esfuerzos se dirigieron en cubrir las necesidades del procesador para reducir al máximo los costes de producción y procesado industrial. En cuanto a la producción, se desarrollaron materiales más productivos y adaptados a la mecanización. Y en cuanto al procesado, se trabajó en aumentar el contenido en sólidos solubles (CSS) y en la viscosidad del tomate, para disminuir los costes energéticos de producción del tomate triturado (Young et al., 1993), así como en la disminución del pH para evitar el desarrollo de hongos (Stevens, 1972; Saimbhi et al., 1995). Estos objetivos de mejora (firmeza y CSS) han hecho divergir el cromosoma 5 de los tomates de industria con respecto al de tomate para consumo en fresco (van Deynze et al., 2007).

En los tomates para consumo en fresco se mantuvieron las demandas de los comercializadores, desarrollando variedades más productivas y resistentes a enfermedades, e

introduciendo genes para el aumento de la firmeza y el retraso de la maduración. Adicionalmente se buscaron frutos de forma, tamaño y color uniforme, para así satisfacer las demandas iniciales de los consumidores en el momento de realizar la compra. Sin duda, la selección por mayor productividad, resistencia a enfermedades y larga vida aseguraron los beneficios para productores y comercializadores con un coste razonablemente barato para los consumidores, pero tuvo un efecto colateral importante: la pérdida de calidad organoléptica (Folta y Klee, 2016). Esto es así, porque si bien los atributos iniciales son fácilmente diferenciables, era mucho más difícil incorporar atributos sensoriales a los programas de mejora. Aunque evidentemente otros factores se vieron implicados en la pérdida de sabor de los materiales modernos. En cualquier caso, a finales del siglo XX los consumidores detectaron el evidente empobrecimiento del sabor en tomate y empezaron a demandar una mayor calidad organoléptica (Hobson, 1988; Bruhn et al., 1991). Una demanda a la que más adelante se sumaría la mejora de la calidad nutritiva y funcional (Schmidt, 2000).

En este contexto surgió el auge del mercado de variedades tradicionales (Figura 4). Estas son el resultado de muchos años de trabajo realizado por los propios agricultores (Guzmán et al., 2000; Cebolla y Nuez, 2005), que fueron seleccionando aquellos materiales más rústicos y adaptados a su zona de cultivo, incluyendo la calidad del fruto como parámetro de selección. Como resultado, y de forma general, en el caso del tomate, las variedades tradicionales suelen destacar por su excelente calidad organoléptica y abastecen a mercados de calidad dispuestos a pagar un precio más alto por un sabor más intenso (Cebolla-Cornejo et al., 2007). Aun así, dentro de una variedad tradicional existe una enorme variabilidad, lo cual obliga a seleccionar solamente a aquellos individuos dentro de la población que realmente son superiores en cuanto al sabor (Casals et al., 2011). Lamentablemente, estas variedades suelen ser poco productivas, muestran frutos heterogéneos y perecederos y son susceptibles a la mayoría de las enfermedades, por lo que no representan el material adecuado para abastecer al gran consumo.



Figura 4: Variedad tradicional de tomates “morados”.

En la actualidad, el mercado de semillas no es ajeno a esta tendencia. Las nuevas estrategias de mejora se basan en la identificación de las preferencias del consumidor y el uso de métodos modernos de genómica y analítica para poder satisfacerlas (Folta y Klee, 2016).

Respecto a las preferencias del consumidor hay que considerar que realmente no existe un único tipo de consumidor. Además, la percepción de la calidad de los consumidores no es estática, sino que evoluciona con el tiempo junto con una serie de factores, entre los cuales están el origen, el género, la edad, la educación, el poder adquisitivo, el estilo de vida, el tiempo disponible para preparar los alimentos, las preocupaciones por la salud, o los escándalos alimentarios (López, 2004; Schreiner et al., 2013; Kyriacou y Roupael, 2018). A todo esto, hay que tener en cuenta que los patrones de consumo también están influenciados por la segmentación del mercado a través de la expansión de formas, colores, sabores, formas de preparación y envasado del producto.

En el caso del tomate sigue existiendo un importante sector de consumidores que establecen su preferencia en un bajo precio, importándoles poco la ausencia de sabor y priorizando aspectos como la jugosidad. No obstante, hay otros sectores que sí valoran la experiencia sensorial y están dispuestos a pagar un diferencial de precio por ella (Cebolla-Cornejo et al., 2007; Causse et al., 2010).

Se abre por tanto una nueva perspectiva en la que ya no se trata de producir en masa, sino en destacar por calidad. Una calidad que no se restringe a la experiencia sensorial (Klee y Tieman, 2018), sino que aborda otros aspectos como el impacto de la producción y comercialización en el ambiente, valorando positivamente los mercados de proximidad o el cultivo ecológico (Pelletier et al., 2013), o el aporte de compuestos bioactivos que contribuyan a prevenir enfermedades (Martí et al., 2019).

4. La calidad en el tomate

4.1. Definición de calidad

Constituyendo la calidad el fin último al que debe dirigirse la producción española para mantener su competitividad, conviene detenerse para estudiarla con mayor profundidad. Etimológicamente calidad proviene del latín *qualitas*, que significa atributo, propiedad o naturaleza básica de un objeto. Sin embargo, hoy en día se emplea el término calidad haciendo referencia a su mejor expresión, por tanto, también se puede definir como grado de excelencia o superioridad (Kader et al., 1985).

En el caso de los alimentos, Kramer (1965) la definió como *“el conjunto de características que diferencian las unidades individuales de un producto y tienen un significado para determinar el grado de aceptabilidad de esas unidades para el usuario”*.

Y si nos referimos a la satisfacción que le produce al consumidor, la calidad también puede definirse como grado de cumplimiento del número de condiciones que determinan su

aceptación por el consumidor. Aquí es donde entra en juego la subjetividad, ya que cada consumidor juzgará de forma distinta un mismo producto siguiendo sus preferencias personales. En algunos casos el uso final que se le va a dar al producto también condiciona el concepto de calidad. Así pues, en los tomates para consumo en fresco se busca que sean uniformes, maduros, sabrosos y sin defectos externos; mientras que si los tomates van destinados a la industria para su procesado, se busca maximizar el color, la viscosidad y el rendimiento industrial (López, 2004).

4.2. Percepción de la calidad

A la hora de percibir y evaluar la calidad el consumidor tiende a fijarse en una serie de atributos, como son la apariencia, el sabor (gusto y aroma), la textura, el valor nutricional y funcional, la seguridad alimentaria y los residuos químicos e incluso la repercusión de la producción y transporte en el medioambiente. Por lo general, los consumidores evalúan la calidad de los alimentos siguiendo el orden establecido anteriormente. De forma resumida, el cerebro procesa la información recibida a través de los sentidos de la vista, el olfato y el tacto e inmediatamente asocia dicha información con la obtenida en experiencias anteriores. Sin embargo, la evaluación de la textura, el aroma y el gusto solo pueden ser evaluados cuando el producto es consumido. Además, en lo que se refiere al valor nutritivo y funcional, la seguridad de los alimentos, la forma de producción y la presencia de residuos, estos no son evaluables a través de los sentidos, pero cada vez más son tenidos en cuenta por los consumidores (López, 2004; Barrett et al., 2010). Como resultado final el consumidor asigna una puntuación al producto consumido, y la compara con las percepciones anteriores (Sloof et al., 1996). En general podemos agrupar los atributos anteriores según se refieran a la calidad externa o a la calidad interna del fruto.

4.3. Calidad externa

En cuanto a la calidad externa esta se refiere a la apariencia del producto. Esta la percibimos a través del sentido de la vista (comemos con los ojos) y el tacto y es la que más influye en la primera decisión de compra, ya que el consumidor busca productos que tengan una apariencia externa adecuada. Se incluyen propiedades físicas como el color, el brillo, la forma, el tamaño o la ausencia de defectos externos (manchas, golpes, etc.) (Nicolaï et al., 2014). El consumidor suele preferir aquellos productos que son de color intenso, brillantes, de tamaño mediano-pequeño, frescos y maduros (López, 2004; Barrett et al., 2010). Para todos ellos está bien valorada la uniformidad (Mitcham et al., 1996). La presencia de defectos externos es otro aspecto decisivo, ya que el consumidor suele preferir aquellos frutos que no muestran imperfecciones. Aunque dichos defectos no tienen porque disminuir la buena calidad del producto, ya que algunos factores durante el crecimiento (clima, riego, suelo, variedad, fertilización, exposición a insectos y enfermedades) pueden provocar defectos fisiológicos y

morfológicos. Respecto al tacto, el consumidor espera comprar frutos que mostrando la máxima intensidad de color mantengan un tacto firme.

4.4. Calidad interna

Respecto a los atributos de la calidad interna se encuentran las propiedades ligadas a la textura (harinosidad, jugosidad, masticabilidad, fibrosidad, suavidad, etc.) y estructura del fruto (tamaño de los lóculos, presencia de gel, tamaño del corazón, etc.), así como el sabor, definido a través de la percepción del gusto y el aroma, y la ausencia de defectos internos. Dichos atributos en tanto que son percibidos por los sentidos formarían parte de la calidad organoléptica del fruto (Nicolai et al., 2014). Pero dentro de la calidad interna hay que tener en cuenta otros atributos no perceptibles sensorialmente, como son la acumulación de nutrientes y compuestos bioactivos que configurarían la calidad nutritiva y funcional, así como la ausencia de trazas de productos fitosanitarios.

4.4.1. Calidad organoléptica

Como se ha comentado, dentro de la calidad organoléptica el sabor cobra un interés especialmente importante en la actualidad, por lo que es conveniente analizar de qué depende con detalle. El sabor es el resultado de la combinación de sensaciones que percibimos a través de los sentidos del gusto y el olfato, y de cómo ambos estímulos se combinan (Wills et al., 1981). El gusto se puede clasificar en cinco sabores primarios: dulce, ácido, salado, amargo y umami. En el caso del tomate los más relevantes son el dulzor y acidez, los cuales son a su vez indicadores de la madurez. El dulzor está determinado por el contenido en azúcares, los cuales representan cerca del 50% del contenido en materia seca y aproximadamente el 65% del CSS (Davies y Hobson, 1981); mientras que la acidez está asociada al contenido en ácidos orgánicos (López, 2004, Barrett et al., 2010).

Respecto a los azúcares, los tomates maduros contienen principalmente los azúcares fructosa y glucosa. La presencia de sacarosa en el tomate rojo maduro es residual ya que las invertasas la degradan en glucosa y fructosa (Davies, 1966a). Solamente en las especies silvestres, como por ejemplo *Solanum chmielewskii* Spooner, Anderson y Jansen, se encuentran niveles altos de sacarosa (Yelle et al., 1988). Por eso, en general, fructosa y glucosa se suelen encontrar a partes iguales, aunque cuando el fruto está totalmente maduro el contenido en fructosa es ligeramente superior al de glucosa (Davies y Kempton, 1975; Yelle et al., 1988). A medida que el fruto madura el contenido en ácidos suele disminuir, mientras que el contenido en azúcares aumenta (Gautier et al., 2008), especialmente en el momento de cambio de color (Davies y Hobson, 1981). Por otro lado, la acumulación no sólo cambia temporalmente, sino también espacialmente, ya que los contenidos en azúcares suelen ser mayores en el pericarpio que en los tejidos locales (Davies y Hobson, 1981). De los tres, la fructosa es la que tiene un mayor peso en la sensación de dulzor, la cual se mide en relación a pruebas sensoriales

realizadas con diluciones acuosas de sacarosa. Por ello, al comparar el poder edulcorante de estos tres azúcares a la sacarosa se le asigna el valor de referencia 1, siendo el de la fructosa de 1,73, mientras que el de la glucosa es de 0,74 (Koehler y Kays, 1991).

En el caso de los ácidos, los que se acumulan a mayores niveles en tomate son el ácido cítrico y el málico, de los cuales el cítrico tiene una mayor influencia en la acidez al encontrarse en mayor concentración, aunque el málico se percibe un 14% más ácido (Stevens et al., 1977). También cabe destacar el papel del contenido en ácido glutámico en los frutos de tomate, pero no porque afecte a la acidez del fruto, sino porque elevados ratios entre los azúcares y este ácido pueden mejorar la aceptabilidad del tomate (Bucheli et al., 1999; Fulton et al., 2002). Además, dicho aminoácido puede contribuir a percibir el sabor umami (Oruna-Concha et al., 2007; Sorrequieta et al., 2010). Respecto a la evolución temporal, el ácido cítrico es el mayoritario durante todas las etapas, pudiendo encontrarse también niveles altos de ácido málico en los frutos verdes. Sin embargo, los niveles de ácido málico en los frutos maduros son bajos (Davies 1966b). También hay que destacar que la relación entre ácido málico y cítrico es una característica marcadamente varietal (Davies y Hobson, 1981).

En general, los tomates con altos contenidos en ácidos y azúcares tienen un sabor intenso, mientras que los tomates con poca concentración de estos compuestos son más insípidos (Stevens et al., 1979; Malundo et al., 1995). Sin embargo, la aceptabilidad del tomate depende de la relación ácidos a azúcares, y si esta sobrepasa un determinado umbral, el sabor de dichos frutos se percibe de forma negativa (Malundo et al., 1995).

Por otro lado, el sabor también depende del aroma. Este está determinado por multitud de sustancias volátiles que percibimos a través del sentido del olfato, pero que también son apreciadas a través de los receptores gustativos de la boca cuando se disuelven en la saliva durante el proceso de masticación (Barrett et al., 2010). Además, dichos compuestos volátiles pueden modular la precepción del dulzor. En el caso del tomate el aroma está determinado por más de 400 compuestos volátiles, pertenecientes a diferentes grupos de compuestos orgánicos: alcoholes, ésteres, aldehídos, cetonas, aminas, amidas, etc. (Petro-Turza, 1986). Aunque se cree que solamente unos 20-30 son los principales implicados en el aroma característico de los tomates (Buttery y Ling, 1993). Todos ellos se encuentran en bajas concentraciones, lo cual dificulta y mucho su cuantificación, pero aun así son capaces de crear una respuesta en los sentidos del gusto y del olfato (Pyne y Wick, 1965). Otro aspecto a tener en cuenta es que los frutos refrigerados son menos aromáticos porque la liberación de los volátiles disminuye con la temperatura (Bruhn et al., 1991). Como en el caso del gusto, muchos aromas se perciben cuando estos se liberan al romperse los tejidos, lo cual dificulta su evaluación.

4.4.2. Calidad nutritiva y funcional

Las frutas y verduras poseen, en general, un alto contenido en agua y bajo en azúcares, proteínas y lípidos, con lo cual no satisfacen las necesidades diarias de nuestro organismo (López, 2004). Sin embargo, suelen ser una buena fuente de minerales, vitaminas, polifenoles, carotenoides y glucosinolatos (Barrett et al., 2010) los cuales son necesarios para el buen

funcionamiento del organismo (propiedades nutricionales). Además, algunos de estos nutrientes también actúan como compuestos bioactivos beneficiosos para la salud (propiedades funcionales) (Shewfelt, 2000). En general ayudan a prevenir enfermedades cardiovasculares, ciertos tipos de cáncer, reducen los niveles de colesterol y la hipertensión y previenen la trombosis (López, 2004; Chong et al., 2010; Slavin y Lloyd, 2012; Raiola et al., 2014; Abuajah et al., 2015; Pinela et al., 2016).

Para el caso concreto del tomate este aporta multitud de minerales (K, P, Ca, Mg), vitaminas (A, B, C y E), carotenoides (licopeno y β -caroteno), y polifenoles (flavonoides y ácidos fenólicos) (Canene-Adams et al., 2005; Dorais et al., 2008). En el caso del tomate, se han comercializado cultivares con elevado contenido en vitamina C y carotenoides (Cebolla-Cornejo et al., 2013). Aunque la *Food and Drug Administration* de los Estados Unidos puso en entredicho la capacidad de estos últimos para prevenir enfermedades (Kavanaugh et al., 2007), lo cierto es que estudios posteriores han comprobado su efectividad frente a determinados tipos de cáncer (revisado por Martí et al., 2016). No obstante, durante los últimos años el foco se ha puesto en la capacidad de los polifenoles para prevenir determinados tipos de cáncer y otras enfermedades degenerativas (revisado por Martí et al., 2019).

4.4.3. Seguridad y formas de producción de los alimentos

A parte de todo lo mencionado anteriormente, el consumo de frutas y hortalizas no ha de poner en riesgo la salud del consumidor, ya que este es incapaz de detectar la presencia de sustancias peligrosas y está en manos de la seriedad y responsabilidad de todos los miembros de la cadena de producción y distribución. Aun así, el consumidor sí puede tomar ciertas precauciones como lavar, pelar y/o cocinar el producto antes de consumirlo.

De este modo la seguridad alimentaria se refiere a la ausencia de sustancias peligrosas para la salud (microorganismos patógenos, micotoxinas, metales pesados, etc.), pero también a la presencia de residuos procedentes de los fitosanitarios (herbicidas, insecticidas, fungicidas, fumigantes, rodenticidas, reguladores del crecimiento, ceras, desinfectantes, aditivos, etc.) usados durante la producción o postcosecha, los cuales dejan unos residuos que pueden ser perjudiciales. Los productos utilizados en la actualidad son menos tóxicos y persistentes, y sus productos de degradación suelen ser inocuos. También se dispone de los métodos de laboratorio necesarios para detectarlos y existe una mayor concienciación sobre su uso, los plazos de seguridad, las dosis de aplicación, etc. (López, 2004).

Finalmente, los consumidores también se preocupan por la forma en la que se producen los alimentos. De esta forma, se valora el uso de sistemas sostenibles como la producción ecológica, la minimización del uso de recursos escasos como el agua o la promoción de mercados de proximidad que minimicen la huella de carbono en el transporte. Por otro lado, algunas de las medidas que minimizan el impacto sobre el ambiente contribuyen a maximizar otras componentes de la calidad como el sabor (Lahoz et al., 2016a y 2016b) o el valor funcional (Martí et al., 2018a y 2018b).

Esta tesis se engloba en el desarrollo de programas de mejora que permitan maximizar la calidad organoléptica del tomate, en tanto que se trata de uno de los principales objetivos de mejora actuales, por el que ya se paga un diferencial de precio. Se trata en este caso de desarrollar programas adaptados a estrategias asistidas por el consumidor (Folta y Klee, 2016), en que se desarrollen materiales que satisfagan diferencias sutiles en los matices de sabor (Causse et al., 2010).

5. Estrategias de mejora de la calidad organoléptica del tomate

A la hora de mejorar el sabor, como componente fundamental de la calidad organoléptica del tomate, se han seguido dos estrategias. La primera se basa en introducir nuevos genes o alterar la expresión de genes mediante ingeniería genética. El objetivo consiste en alterar una o varias rutas metabólicas para así aumentar el contenido en uno o varios compuestos relacionados con la calidad organoléptica (azúcares, ácidos, aromas, etc.). Sin embargo, conseguir una transformación exitosa no es del todo fácil, y además existen restricciones legales en cuanto a la comercialización de los organismos transgénicos, junto con el rechazo por parte de los consumidores. La segunda consiste en aprovechar la amplia variabilidad natural existente en el género *Solanum* sección *Lycopersicon*, seleccionando como parentales donantes, de entre el germoplasma de tomate silvestre y cultivado, aquellos que destacan por sus características de calidad organoléptica. A continuación, se inicia un programa de mejora que incluye cruzamientos y varias generaciones de retrocruzamientos para recuperar las características importantes de la variedad inicial junto con los genes recientemente incluidos. Si se tratan de variedades cultivadas (principalmente las variedades tradicionales), tal y como hemos dicho anteriormente, estas suelen presentar una excelente calidad organoléptica, aunque sus frutos no son uniformes y la planta no suele tener resistencia a patógenos. Sin embargo, se encuentran ya adaptadas al cultivo y no muestran características indeseables, así como tampoco presentan problemas de compatibilidad para realizar los cruces, lo cual facilita su uso en un programa de mejora. En cambio, las especies silvestres, aunque atesoran una variabilidad inmensa, también suelen presentar características desfavorables (aromas desagradables, reducción del tamaño de fruto, menor vigor de la planta, problemas de compatibilidad, etc.) que habrá que eliminar posteriormente.

5.1. Mejora mediante ingeniería genética

Una de las estrategias seguidas mediante ingeniería genética para aumentar el dulzor del tomate ha consistido en la expresión de nuevos genes que codifican para una serie de proteínas con elevado poder edulcorante, como por ejemplo la taumatina procedente de *Thaumatococcus daniellii* Benth (Bartoszewski et al., 2003), la cual es 100.000 veces más dulce que la sacarosa. Con el mismo poder edulcorante que la taumatina se encuentra la monelina proveniente de *Dioscoreophyllum cumminsii* Diels, que también se ha conseguido sintetizar en tomate (Peñarrubia et al., 1992; Reddy et al., 2015). También destaca la transformación con el

gen que codifica la síntesis de miraculina (400.000 veces más dulce que la sacarosa) procedente de *Richadella dulcifera* (Schuachh y Tonn.) Baehni (Sun et al., 2007; Hirai et al., 2011).

Otra forma de aumentar el contenido de azúcares en el fruto es modificando las enzimas que intervienen en la ruta de síntesis de los azúcares, como por ejemplo la sacarosa fosfato sintasa. Esta enzima cataliza la hidrólisis reversible de la sacarosa para producir UDP-glucosa y UDP-fructosa, lo que sugiere que esta puede jugar un papel importante en la composición de los azúcares solubles en la fruta. Sin embargo, esta enzima sí que provoca, en algunos casos, un aumento de la sacarosa en el fruto, resultado de un cambio en la partición del carbono entre almidón, sacarosa y compuestos iónicos (principalmente aminoácidos), más que un aumento en su síntesis (Laporte et al., 1997, 2001). En otros casos, la transformación ha resultado ineficaz, ya que no altera los niveles normales de azúcares ni de otros componentes del sabor (Chengappa et al., 1999; Lunn et al., 2003).

Otra enzima involucrada en la acumulación de sacarosa en las frutas es la invertasa β -fructosidasa que puede hidrolizar la sacarosa en glucosa y fructosa. Klann et al. (1996) descubrieron que los frutos de las plantas de tomate transgénicas que expresan un transgén de invertasa antisentido constitutivo mostraban un aumento de sacarosa y una disminución de las concentraciones de hexosas. Sin embargo, las líneas de tomate transgénico producían unos frutos que eran aproximadamente un 30% más pequeños que los frutos control, lo cual es inaceptable en el mercado.

El incremento de la actividad de la invertasa de la pared celular mediante el uso del ARN de interferencia (ARNi) para silenciar *INVINH1*, un inhibidor putativo de la invertasa provocó un aumento significativo en los niveles de hexosas en el fruto (Jin et al., 2009). El papel de la invertasa en el control del contenido de azúcares también se ha demostrado mediante la medición de la actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo del azúcar en genotipos contrastados con el contenido y la composición de azúcares. La única diferencia enzimática significativa entre los frutos que acumulan sacarosa y los que acumulan hexosas fue la falta de actividad de la invertasa en los frutos que acumulan sacarosa. Por este motivo el patrón de acumulación de sacarosa en *S. chmielewskii* y *S. habrochaites* está asociado con un bajo nivel de actividad de la invertasa (Yelle et al., 1988, 1991; Chetelat et al., 1993).

El almidón que se acumula en las primeras etapas del desarrollo del fruto del tomate está completamente degradado en la fruta madura, sirviendo como un depósito que contribuye al CSS (Dinar y Stevens, 1981; Ho, 1996). En este sentido la pirofosforilasa ADP-Glc (AGPasa) cataliza la síntesis de ADP-Glc y se considera el primer paso en la síntesis de almidón. Las plantas de tomate que albergan el alelo para la subunidad grande AGPase (AgpL1), derivada de la especie silvestre *S. habrochaites* (AgpL1 (H)), se caracterizan por una mayor actividad de AGPasa y un mayor contenido de almidón en la fruta inmadura, así como por mayores niveles de sólidos solubles en la fruta madura, en comparación con los frutos de plantas que albergan el alelo del tomate cultivado, AgpL1 (E) (Schaffer et al., 2000).

Otra forma de aumentar los niveles de azúcar ha consistido en emplear la represión de la traducción inducida por sacarosa. De este modo Sagor et al. (2016) han conseguido tomates

más dulces empleando los factores de transcripción SibZIP1 y SibZIP2 con el promotor específico de fruto E8.

En cuanto a los ácidos, la transformación con glutamato deshidrogenasa procedente de *Aspergillus nidulans* aumentó los niveles de aminoácidos libres totales en los frutos transgénicos, y el nivel de glutamato fue el doble que en los frutos control (Kisaka y Kida, 2003). Del mismo modo, la introducción del gen antisentido de SIACO3b, que codifica la enzima aconitasa citosólica, aumento los niveles de ácido cítrico y ácido málico en la madurez (Morgan et al., 2013).

Otra forma de alterar el contenido en ácidos y azúcares en el fruto es regulando el proceso de maduración. Así, la introducción de una secuencia de ARN antisentido de la proteína de membrana asociada a la maduración (TRAMP) mostraba una reducción del 94% del ARNm de dicha proteína. Esto provocó una mayor acumulación de ácido málico y cítrico, y una menor acumulación de fructosa y glucosa (Chen et al., 2001).

También se ha intentado cambiar el perfil aromático de los frutos de tomate mediante ingeniería genética. Los volátiles derivan de la degradación de aminoácidos, ácidos grasos, carotenoides o compuestos fenólicos. Debido a la gran diversidad de compuestos, poco se sabe acerca de los genes que controlan su acumulación, pero algunos de ellos han sido identificados como responsables de su acumulación y pueden ser objetivo de modificación mediante ingeniería genética (revisado por Klee, 2010). Entre los grupos más importantes de enzimas relacionadas con la síntesis de volátiles en tomate se encuentran las lipoxigenasas. Estas enzimas participan en la degradación de lípidos para sintetizar aldehídos, muchos de los cuales mantienen concentraciones muy elevadas en tomate, como el hexanal, Z-3-hexenal o E-2-hexenal. Dentro de este grupo, la *lipoxygenase C* está implicada en la síntesis de los principales aldehídos de tomate (Klee y Tieman, 2013). A partir de los aldehídos se sintetizan los alcoholes, gracias a la actividad de alcohol deshidrogenasas, como la *alcohol dehydrogenase 2* (ADH2) (Prestage et al., 1999) y de otras enzimas como la *fatty acid hydroperoxide lyase* (Klee y Tieman, 2018). Por otro lado, el gen que codifica la enzima *carotenoid cleavage dioxygenase 1* (CCD1) está involucrado en la síntesis de varios compuestos volátiles de aroma derivados de la escisión de los carotenoides (Vogel et al., 2008) y está relacionada con la síntesis de apocarotenoides. En rutas más específicas, los genes de tomate que codifican las *aromatic amino acid decarboxylase 1 y 2* (AADC1 y AADC2) son los responsables de la descarboxilación de la fenilalanina y la posterior síntesis de feniletanol y compuestos relacionados (Tieman et al., 2006). En la misma ruta, Tieman et al. (2007) observaron que la *phenylacetaldehyde reductase* cataliza el último paso en la síntesis del aroma volátil 2-feniletanol. Se ha demostrado también que una *salicylic acid methyltransferase* está involucrada en la síntesis del metil salicilato (Tieman et al., 2010), mientras que la *carboxylesterase 1* (CXE1) está implicada en la síntesis de alcoholes a partir de ésteres (Klee y Tieman, 2013), al igual que la *alcohol acetyl transferase 1* (AAT1) (Klee y Tieman, 2018).

Las líneas de tomate transgénicas con la expresión incrementada del gen de la ADH2 aumentaron los niveles de diversos volátiles aromáticos, incrementándose notablemente los niveles de hexanol y Z-3-hexenol (Speirs et al., 1998). En otros trabajos no resultó en un incremento en el nivel de estos alcoholes, aunque la regulación negativa sí que disminuyó la

concentración (Prestage et al., 1999). Curiosamente, los niveles más altos de alcoholes en frutas transgénicas se asociaron con un sabor maduro más intenso por parte de los panelistas (Speirs et al., 1998).

También se han realizado varios ensayos para modificar la ruta de los terpenoides. Por ejemplo, intentando cambiar el perfil aromático del tomate empleando la *S-linalool synthase* (LIS) que utiliza el geranil difosfato (GPP) como sustrato para sintetizar S-linalool. Las plantas de tomate que sobreexpresaron el gen de la LIS de *Clarkia breweri* bajo control del promotor E8, acumularon mayores cantidades de S-linalool y su producto de oxidación (8-hidroxylnalool) en el fruto maduro sin provocar otras alteraciones fenotípicas (Lewinsohn et al., 2001). Inicialmente, y sin pruebas sensoriales específicas, los autores sí que evidenciaron un cambio en el perfil aromático del fruto, aunque pruebas posteriores sugirieron que no modificaba sustancialmente la percepción global del sabor (Dudareva y Pichersky, 2008).

Dentro de la misma ruta, la introducción del gen de la *geraniol synthase* (GES) que también emplea el GPP como sustrato de *Ocimum basilicum* en plantas de tomate produjo cambios en la acumulación de compuestos volátiles (Davidovich-Rikanati et al., 2007). Sin embargo, estos frutos de tomate transgénicos al producir elevadas cantidades de geraniol veían reducida su pigmentación, ya que dicho aumento se hace a expensas del licopeno, al sustraer el GPP de la ruta de síntesis de carotenoides. A pesar del efecto colateral del cambio de color, la mayoría de los panelistas no entrenados prefirieron los tomates transgénicos, por tener un aroma más fuerte que los tomates control (Davidovich-Rikanati et al., 2007).

También se han realizado intentos para cambiar el perfil aromático a través de la regulación negativa de lipoxigenasas en tomate, aunque se evidenció que niveles muy bajos de actividad eran suficientes para mantener la acumulación de aldehídos C6, los principales en esta especie (Griffiths et al., 1999). Por el contrario, estudios recientes han descubierto un alelo raro en el promotor de lipoxigenasa TomloxC, perdido durante la domesticación del tomate, que tiene una relación directa con la síntesis de apocarotenoides, volátiles muy positivos en la configuración del aroma de tomate (Gao et al., 2019).

En definitiva, la ingeniería genética ha tenido un papel relevante a la hora de identificar los genes implicados en las rutas de síntesis de los principales azúcares, ácidos y volátiles. Además, su manipulación y la introgresión de nuevos genes ha conseguido modificar el perfil de sabor. Sin embargo, la mayor limitación de uso de esta tecnología es la no aceptación de los transgénicos por parte de los consumidores europeos (Malyska et al., 2016), así como las restricciones legales para su comercialización. Aunque recientemente, el auge de la genómica y el desarrollo de nuevas herramientas como la edición genética han permitido obtener plantas de colza resistentes a herbicidas “no transgénicas” modificando unos pocos nucleótidos de la secuencia de ADN. De este modo, dichas plantas no serían transgénicas por definición porque no se han introducido uno o varios genes foráneos en el ADN de la planta (Nature Ed. Office, 2015).

En cualquier caso, hay que tener en cuenta que cualquier manipulación genética posteriormente requiere comprobar cómo afecta a la acumulación de compuestos relacionados con la percepción sensorial en etapas iniciales y finalmente la comprobación del efecto directo

sobre el perfil sensorial de los frutos, ya que en muchos casos las regulaciones de las rutas biosintéticas son complejas, pueden estar interconectadas e influenciadas por productos intermedios de otras rutas (por ejemplo la regulación de la ruta hp3, ver revisión de Cebolla-Cornejo et al., 2013).

5.2. Mejora convencional

Los primeros programas convencionales de mejora de la calidad organoléptica se iniciaron hace más de 60 años en los tomates de industria, centrados en aumentar el CSS y disminuir el pH, aprovechando la amplia variabilidad natural presente en las especies silvestres de tomate: *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* Dunal, *S. piminellifolium* Juslen, *S. chmielewskii* Spooner, Anderson y Jansen, *S. cheesmaniae* forma *typicum* y forma *minor* Riley y *S. penelli* Correll (Lambeth et al., 1966; Rick, 1974; Hewitt y Garvey, 1987; Fridman et al., 2000). Sin embargo, a pesar del elevado potencial del germoplasma seleccionado como parental donante, los resultados obtenidos no han sido todo lo buenos que cabría esperar, en parte debido a que las medidas empleadas en los procesos de selección son parámetros complejos e imprecisos, al estar cuantificando al mismo tiempo diferentes compuestos que pueden variar y mucho a lo largo de un programa de mejora. Además, no se están teniendo en cuenta los matices que aportan cada uno de los compuestos individuales (ácidos y azúcares, principalmente, pero también los compuestos volátiles). Del mismo modo, todo este conocimiento se aplicó posteriormente en la mejora del sabor de los cultivares para fresco (Gardner, 1993 a y b, 2006 a y b).

Para mejorar la efectividad de la selección en las últimas décadas se ha recurrido al desarrollo de poblaciones segregantes para intentar localizar *quantitative trait loci* (QTLs) relacionados con los caracteres de calidad como el CSS, pero sobre todo para los distintos compuestos individuales que contribuyen al sabor del tomate (ácidos, azúcares y compuestos volátiles). Cuando se dispone de ellos, los QTLs son una herramienta de selección muy poderosa al poder seleccionar indirectamente en estadios tempranos de desarrollo de la planta, ahorrando tiempo y trabajo. También se evitan los problemas asociados al cultivo y a la variabilidad provocada por las condiciones ambientales y los factores agronómicos sobre la expresión de los caracteres de calidad (Bucheli et al., 1999, 2001).

Inicialmente se identificaron algunos marcadores denominados *restriction fragment length polymorphism* (RFLPs) ligados al carácter CSS en un cruce entre *S. cheesmaniae* y *S. chmielewskii* (Ibarbia y Lambeth, 1969; Paterson et al., 1988; Paterson et al., 1991; Garvey y Hewitt, 1992; Goldman et al., 1995, Grandillo y Tanksley, 1996). También se identificaron varios QTLs para la mejora del CSS, sin embargo, estos también estaban ligados con un menor tamaño de fruto.

Eshed y Zamir (1995) consiguieron mejores resultados al generar líneas de introgresión entre *S. lycopersicum* y *S. penelli*. En concreto identificaron el QTL Brix-9-2-5 en una línea de introgresión, IL9-2-5, que fue la que produjo frutos maduros con mayor CSS, así como un aumento de los contenidos en fructosa y glucosa. Un estudio de mapeo posterior delimitó este

QTL a una región que abarca el gen LIN5 (Fridman et al., 2000), que codifica una invertasa apoplástica expresada exclusivamente en frutos y flores (Godt y Roitsch, 1997; Fridman y Zamir, 2003). Más adelante, Fridman et al. (2004) descubrieron que el alelo de las especies silvestres de LIN5 era más eficiente que el alelo de los genotipos de tomate cultivado, debido a una única sustitución de nucleótidos que codificaba un residuo de aminoácido cerca del sitio de unión a fructosilo de la enzima. En planta se ha confirmado la importancia de LIN5 en el control del CSS en tomate utilizando la tecnología del ARNi (Zanor et al., 2009). El factor principal que conduce a un aumento de hexosas (fructosa y glucosa) del fruto en IL9-2-5 se debería, por tanto, a la mayor capacidad para absorber la sacarosa del floema (Baxter et al., 2005, revisado por Matsukura, 2016).

Otros investigadores buscaron QTLs en líneas de mejora de *S. lycopersicum* y en entradas de *S. pimpinellifolium*, que fueron evaluadas mediante un panel de cata entrenado y además se realizó la cuantificación del contenido de azúcares y ácidos orgánicos individuales. Un estudio que permitió posteriormente identificar QTLs para el sabor afrutado del tomate, °Brix, ácido cítrico, ácido glutámico, fructosa y glucosa (Fulton et al., 2002).

También se construyó un mapa saturado de marcadores RFLPs, AFLPs y RAPDs en un cruce intraespecífico entre entradas de *S. lycopersicum*, que fue evaluado por un panel de cata (Saliba-Colombani et al., 1999; Causse et al., 2001, 2002). Los resultados mostraron que solo unas pocas regiones de los cromosomas 2, 3, 4, 8, 9, 11 y 12 explicaban la variabilidad encontrada para los diferentes caracteres físicos y químicos evaluados. Se identificaron QTLs para el peso del fruto, diámetro, color, firmeza, harinosidad y para seis compuestos volátiles. Estos autores observaron que algunos de los QTLs de caracteres correlacionados se localizaban conjuntamente; por ejemplo, QTLs para el peso de fruto y el contenido de azúcares, o el peso de materia seca. La mayoría de estas localizaciones conjuntas se producían en el cromosoma 2, sin embargo, se localizó un QTL para CSS y peso de materia seca en el cromosoma 9, una región sin QTLs de peso del fruto. También se localizaron conjuntamente QTLs para distintos compuestos volátiles, el contenido en licopeno y el color del fruto.

Estudios realizados en RILs (*recombinant inbred lines*) procedentes de un cruce con *S. pimpinellifolium* han permitido identificar un QTL de tamaño de fruto FrW7 que se colocaliza con el CSS, vitamina C y glucosa, peso seco/peso fresco y el gen de la sacarosa fosfato sintasa, sugiriendo que el polimorfismo de este gen puede influir en la variación genética de diversos caracteres de calidad (Capel et al., 2015).

Por otro lado, Barrantes et al. (2016) identificaron dos QTL en una línea de introgresión de *S. pimpinellifolium* que aumentan el CSS sin efectos negativos sobre el tamaño del fruto.

Rambla et al. (2016) en RILs de esta misma especie han identificado QTLs relacionados con una mayor concentración de volátiles derivados de carotenoides, que tienen un efecto positivo sobre la percepción del sabor.

Por su parte, Tieman et al. (2017) han identificado, a partir de varias entradas de *S. pimpinellifolium*, una serie de genes implicados en el metabolismo de los principales compuestos volátiles que influyen en el aroma típico de los tomates, así como otros genes relacionados con el CSS, fructosa, glucosa, ácido cítrico y ácido málico.

Recientemente, Gao et al. (2019) han estudiado el genoma de más de 700 accesiones distintas, identificando casi 5000 genes que no se encontraban en el genoma de referencia. En especial destaca el gen TomLoxC que regula una lipooxigenasa, y que durante la domesticación se habría ido perdiendo. Se sabe que este gen influye en el sabor al catalizar la síntesis de compuestos volátiles derivados de los lípidos.

Otra forma de mejorar la calidad organoléptica es mediante selección negativa, al identificar QTLs asociados a caracteres indeseados del sabor, procedentes de las especies silvestres. Por ejemplo, al utilizar *S. penelli* en un cruzamiento se ha identificado un QTL relacionado con el contenido en 2-feniletanol y fenilacetaldehído. Ambos compuestos a muy bajas concentraciones (0,005 ppm) provocan un sabor y aroma bastante desagradable (Tadmor et al., 2002).

A parte de identificar los QTLs implicados en los caracteres de la calidad, también existe un conocimiento amplio sobre los genes que alteran el metabolismo de los azúcares en las especies silvestres de tomate.

Así, se ha introducido el gen *sucr* procedente de *S. chmielewskii* (especie que acumula sacarosa en lugar de fructosa y glucosa en el fruto) para aumentar el contenido en sacarosa, al provocar un silenciamiento transcripcional de la invertasa vacuolar del fruto del tomate, permitiendo la acumulación de este azúcar (Chetelat et al., 1993; Klann et al., 1993). Pero la introducción de este gen también provoca una reducción en el peso del fruto y la cosecha de frutos maduros (Chetelat et al., 1995a, 1995b).

La especie *Solanum habrochaites* también se ha utilizado para cambiar la ratio fructosa a glucosa que suele estar en torno a 1 en tomate y en esta especie es superior a 1,5. Este carácter puede ser interesante ya que el sabor endulzante de la fructosa es mayor, sin embargo, este tiene un carácter poligénico, aunque se ha descrito un locus principal *Fgr* en el cromosoma 4 (Levin et al., 2000). Más adelante se identificó un locus que codifica la Fructokinasa2, ubicado en el cromosoma 6, y que interactúa con el anterior. Ambos genes muestran un comportamiento epistático, obteniéndose los mayores ratios con las combinaciones *Fgr^{HH}* y *Fk2^{HH}* (Levin et al., 2004, 2006).

Sin embargo, pese al importante aumento del conocimiento y diversidad disponible para mejorar el sabor de los tomates, los avances de los programas de mejora han sido limitados. Por ello, sigue siendo necesaria la búsqueda de más variación para mejorar la calidad organoléptica del tomate. Además, independientemente de la vía seleccionada para la mejora (convencional o ingeniería genética) al final del proceso resulta necesario realizar la evaluación y posterior cribado de los nuevos materiales obtenidos. Para ello es crítico disponer de las metodologías adecuadas para evaluar dichos materiales de la forma más rápida y precisa posible.

6. Dificultades en el fenotipado del tomate

Independientemente de que se siga cualquiera de las dos estrategias de mejora comentadas anteriormente para aumentar el sabor del tomate, existen una serie de dificultades a la hora de llevar a cabo un programa de mejora dirigido a aumentar la calidad organoléptica de los frutos.

En primer lugar, el sabor del tomate es un carácter muy complejo debido a la gran cantidad de compuestos químicos implicados (ácidos, azúcares, volátiles, etc.), que han de mejorarse de forma simultánea. Y no solo influye la cantidad individual de cada compuesto, sino también la proporción existente entre ellos. Además, dichos caracteres suelen estar controlados por varios genes y también se ven influenciados por el ambiente de cultivo.

En segundo lugar, la forma de conseguir resultados que se aproximen al máximo a las demandas de los consumidores consiste en realizar evaluaciones sensoriales mediante los paneles de cata. Al inicio, eran los propios agricultores los que realizaban tales evaluaciones sensoriales, los cuales consumían sus cosechas e iban seleccionando año tras año las que satisfacían sus preferencias. Pero obviamente, esta metodología es un tanto subjetiva y requiere de mucho tiempo. En la actualidad se puede recurrir a los paneles de cata entrenados, pero tal proceso también requiere de mucho tiempo, es bastante caro, su uso está limitado a unas pocas muestras y, sobre todo, están expuestos a una importante fuente de variación, que son precisamente los propios panelistas (Causse et al., 2001). Resulta necesario pues desarrollar otras técnicas de evaluación que de forma objetiva, rápida y barata permitan disponer de información que posibilite seleccionar de forma fiable y con resultados similares a los que cabría esperar al utilizar un panel de catadores (Causse et al., 2006).

Por ello, para poder realizar de forma más eficaz un programa de mejora, con el objetivo de aumentar el sabor del tomate, se deben de tener en cuenta dos aspectos importantes:

- Existe una elevada influencia del genotipo, así como de las variables agronómicas y ambientales que modifican el sabor del tomate.
- Se necesitan desarrollar nuevas metodologías de evaluación que permitan el análisis rápido, amplio y preciso del sabor del tomate (lo cual es el objetivo principal de esta tesis).

6.1. Influencia del genotipo, el ambiente y su interacción

El resultado final de la calidad organoléptica del tomate, es decir, su fenotipo, depende del genotipo (G) en cuestión, pero también existe una parte de influencia del ambiente (E), así como de la interacción GxE.

Evidentemente, el genotipo es el principal responsable de la mayor o menor acumulación de los diferentes compuestos implicados en el sabor del tomate. Esto queda reflejado en estudios donde se observa el peso de esta componente al evaluar la gran diversidad

existente en cuanto al contenido en ácidos y azúcares en variedades tradicionales (Cebolla-Cornejo et al., 2013), en variedades antiguas o *heirloom* (Tieman et al., 2017) y en entradas pertenecientes a diferentes especies de tomate (Galiana-Balaguer et al., 2018). Lo mismo ocurre en cuanto al contenido en compuestos volátiles, tal y como queda reflejado en los estudios de Brauss et al. (1998), Tikunov et al. (2005), Cebolla-Cornejo et al. (2011) y Lahoz et al. (2016a).

A pesar de la importancia del genotipo, sin duda el ambiente condiciona la expresión del potencial genotípico, ya sea a través de aspectos climáticos (radiación, temperatura, humedad, etc.), agronómicos (riego, abonado, etc.) o de los posibles efectos adversos debidos a plagas, enfermedades y desórdenes fisiológicos.

La radiación afecta a la fotosíntesis, por lo tanto, parece obvio que a mayor radiación mayor será la tasa fotosintética, y habrá una mayor cantidad de fotoasimilados. Por este motivo, en el cultivo bajo protección, en donde hay una reducción importante de la radiación (aunque aumente la temperatura), se produce una menor acumulación de azúcares (Davies y Hobson, 1981; Beckmann et al., 2006; Caliman et al., 2010; Cebolla-Cornejo et al., 2011; Galiana-Balaguer et al., 2018). Sin embargo, el contenido en ácidos orgánicos parece no verse afectado por la radiación, tal y como apuntaron Ilic et al. (2012), Cebolla-Cornejo et al. (2011) y Galiana-Balaguer et al. (2018).

En cuanto a la temperatura existe cierta controversia. Mientras que Sakiyama (1968) e Ilic et al. (2012) observaron que a mayor temperatura aumentaba la acidez, Gautier et al. (2008) observaron el efecto contrario. Según estos últimos, al aumentar la temperatura disminuía la acidez y se producía un aumento en el contenido en azúcares. Sin embargo, Ilic et al. (2012) vieron que a mayor temperatura el CSS disminuía.

Por lo tanto, no está del todo claro el efecto de la radiación y la temperatura sobre la calidad del tomate. Una posible explicación sería el distinto momento de recolección del fruto para su análisis. No es lo mismo recoger de los primeros racimos de la planta, que de los intermedios o de los últimos, porque han estado sometidos a diferentes condiciones de radiación y temperatura, entre otros factores. Así, según Fanasca et al. (2007) el contenido en ácido cítrico parece no verse afectado, mientras que los niveles de los azúcares fructosa y glucosa son mayores en los últimos racimos. Tampoco es lo mismo muestrear un fruto en estadio verde maduro que cuando está totalmente maduro. Por este motivo se prefiere elegir siempre el estado rojo maduro, el cual es el más estable en cuanto al contenido de los compuestos implicados en el sabor.

En lo que se refiere al riego, una mayor dosis de agua en el cultivo puede hacer que aumente la producción, pero de forma indirecta la calidad organoléptica disminuye (Colla et al., 2001; Blaesing et al., 2006; Favati et al., 2009) porque los compuestos implicados en el sabor se encuentran más diluidos (Dorais et al., 2002). Sin embargo, Lahoz et al. (2016a) no observaron un aumento de la producción ni un descenso del CSS al aumentar la dosis de riego por encima de las necesidades del cultivo, aunque si vieron un menor contenido en volátiles. Por el contrario, la aplicación de técnicas de riego deficitario pueden aumentar la calidad organoléptica de los frutos sin disminuir la producción si se aplica en el momento adecuado. Esto se puede

conseguir reduciendo a la mitad la dosis de riego antes de que los frutos empiecen a madurar (Favati et al., 2009; Patanè et al., 2011; Valcárcel et al., 2014).

El abonado también puede influir en la calidad del fruto. Así algunos autores señalan que mayores dosis de nitrógeno incrementan la acidez (Kuscu et al., 2014) y el CSS (Fandi et al., 2010). Sin embargo, Dorais et al. (2001) determinaron que altas dosis de nitrógeno provocan la dilución de los azúcares, y que las dosis deficientes también afectan negativamente a la calidad, debido al menor desarrollo de la planta. Del mismo modo, otros autores no vieron una influencia clara de la fertilización nitrogenada sobre el CSS (Warner et al., 2004; Benard et al., 2009). En cuanto al fósforo no se ha visto que este afecte de algún modo a la calidad organoléptica del tomate (Oke et al., 2005; Liu et al., 2011). No así el potasio, ya que a dosis bajas produce una disminución de ácidos y azúcares (Liu et al., 2011). El tipo de abonado, ya sea mineral (cultivo convencional) u orgánico (cultivo ecológico), también afecta a la calidad organoléptica. En general, en el cultivo ecológico se obtienen mayores CSS (Chassy et al., 2006; Pieper y Barret, 2008; Vinha et al., 2014). Sin embargo, Lahoz et al. (2016b), con tomates para procesado, observaron un aumento de los niveles de ácidos cítrico y glutámico, pero no así de los azúcares.

Otro factor a tener en cuenta es la evolución del fruto durante la postcosecha, tanto desde la recolección hasta su puesta a la venta como desde su compra hasta su consumo. Así pues, a partir del momento de la recolección el CSS aumenta, mientras que la acidez disminuye (Yeshiwas y Tolessa, 2018).

Por otro lado, en la búsqueda de fuentes de variación para la mejora del sabor en tomate se ha puesto en evidencia la importancia de las interacciones GxE, especialmente a la hora de evaluar germoplasma silvestre (Galiana-Balaguer et al., 2018). Lo que llevó a proponer la necesidad de desarrollar programas de evaluación multiambiental para asegurar que una elevada contribución genotípica no se viera alterada por cambios ambientales.

Por lo tanto, en los estudios de evaluación y selección de líneas con alto valor organoléptico es preciso tener en cuenta los factores ambientales (temperatura, radiación, riego, etc.) y agronómicos (protección, suelo, nutrientes, etc.) y controlarlos en la medida de lo posible. De este modo se podría estimar la contribución del genotipo, del ambiente y de la interacción GxE. Pero para que esto sea posible se necesitan desarrollar métodos que permitan la evaluación rápida y precisa de la calidad organoléptica.

6.2. Metodologías de evaluación de la calidad organoléptica

Además de tener en cuenta la problemática de los efectos ambientales y de desarrollo en el transcurso de los programas de mejora, es preciso abordar un problema añadido, la necesidad de disponer de técnicas que permitan fenotipar grandes cantidades de material en el menor tiempo y con el menor coste posible.

Como ya hemos visto anteriormente, el gusto y el aroma pueden ser evaluados mediante evaluaciones sensoriales, pero también de forma alternativa mediante técnicas instrumentales precisas que determinan parámetros relacionados con la percepción sensorial.

Dentro de las técnicas sensoriales podemos diferenciar entre paneles de expertos y de consumidores, los cuales han sido ampliamente utilizados para evaluar la calidad en frutas y vegetales (Meilgaard et al., 2006). Los primeros suelen estar formados por entre 10-15 expertos que han sido entrenados siguiendo unos descriptores de calidad desarrollados por ellos mismos u obtenidos de la bibliografía. Pueden considerarse como sensores humanos que miden cuantitativamente los atributos de calidad del producto. Los segundos están formados por grupos de consumidores que vienen a representar a la población de consumidores que se considera relevante para la prueba. Solo permiten obtener puntuaciones de preferencias, que solo son relevantes cuando se pueden relacionar con los paneles sensoriales entrenados. La principal ventaja de ambos paneles es que están enfocados hacia los parámetros de calidad que buscan los consumidores finales. Sin embargo, hay que tener en cuenta, como ya se ha comentado, la variabilidad que conllevan los propios panelistas (Causse et al., 2001), así como la capacidad del panel está limitada a unas pocas muestras por sesión (6-8), lo cual ralentiza la evaluación y la vuelve más costosa, haciendo inviable su uso a lo largo de un programa de mejora. Por lo tanto, la evaluación sensorial únicamente se puede utilizar en las fases finales de los programas de mejora, donde únicamente se evaluarán unas pocas nuevas variedades candidatas.

Así pues, para poder seleccionar por características de calidad desde el inicio de los programas de mejora, los mejoradores necesitan sustituir la evaluación sensorial por determinaciones analíticas de compuestos inductores de estas percepciones sensoriales de calidad que hagan posible la evaluación de un gran número de genotipos. Las técnicas instrumentales tienen la ventaja de ofrecer determinaciones fiables y reproducibles de la acumulación de compuestos relacionados con la percepción del gusto y el aroma. Lógicamente la selección de estos compuestos objetivo se ha establecido a través del estudio de correlaciones entre las variables analíticas y los estudios sensoriales.

Inicialmente los investigadores utilizaron determinaciones analíticas simples, muy fáciles de realizar y rápidas, que determinan en conjunto varias sustancias. Es el caso del CSS (°Brix), el pH o la acidez titulable, los cuales están relacionados con la intensidad de sabor (Stevens et al., 1977) al cuantificar de forma conjunta el contenido en ácidos y azúcares, pero también otras sustancias (minerales, proteínas, pectinas, celulosa, etc.). Así pues, dichas medidas son imprecisas y no permiten distinguir entre frutos ácidos y dulces, lo cual hace que la selección basada en estos parámetros no sea eficiente. Por ello, resulta necesario poder cuantificar de forma individual cada uno de los compuestos implicados en el sabor.

En el caso del tomate ya se ha comentado que los principales compuestos que intervienen en la intensidad del sabor son los azúcares reductores fructosa y glucosa y los ácidos orgánicos cítrico, málico y glutámico (Yilmaz, 2001). Estos pueden ser cuantificados mediante técnicas de separación como la cromatografía líquida de alta resolución, HPLC (Agius et al., 2018), la cromatografía de gases, CG (Morvai y Molnár-Perl 1992), o se pueden utilizar métodos de cuantificación conjunta de azúcares y ácidos mediante electroforesis capilar zonal, CZE (Cebolla-Cornejo et al., 2012).

Con la CZE es posible la cuantificación conjunta de ácidos y azúcares con una mínima preparación de la muestra, con un coste contenido y en un tiempo de análisis razonable

(Cebolla-Cornejo et al., 2012). De hecho, esta metodología ha sido adaptada para cubrir las exigencias de las determinaciones de otros compuestos en programas de mejora, incluyendo la vitamina C (Galiana-Balaguer et al., 2001), los carotenoides (Adalid et al., 2007) y los polifenoles (Martí et al., 2017).

Del mismo modo, los volátiles que influyen en el aroma, pero también en el sabor del tomate, pueden ser cuantificados mediante CG (Beltrán et al., 2006). Sin embargo, su aplicación no es viable en el caso de los programas de mejora, puesto que cada muestra conlleva largos plazos de extracción y análisis.

En resumen, aunque la cuantificación de todos estos compuestos implicados en la calidad organoléptica del tomate usando los métodos analíticos tradicionales es posible, lo cierto es que esta es muy laboriosa, costosa, requiere de mucho tiempo, equipamiento caro y personal especializado, así como el uso de reactivos químicos peligrosos y contaminantes (Nikbakht et al., 2011; Bureau et al., 2019). Lo cual en los programas de mejora en los que se trabaja con cientos o miles de plantas resulta difícil en el caso de los azúcares y ácidos e inviable en el caso de los volátiles.

Esto conlleva la necesidad de buscar técnicas de evaluación fenotípica que requieran una mínima o nula preparación de la muestra, sean rápidas, económicas y precisas, y que además posibiliten la medida conjunta de varios compuestos químicos a partir de una única medida, lo cual permitiría acelerar los programas de mejora de variedades, siempre que los errores de determinación que se cometan sean asumibles. Por ello, cada vez cobra mayor importancia el estudio de métodos de determinación indirecta como los basados en la espectroscopía del infrarrojo en el caso de los compuestos relacionados con el gusto y en sistemas multisensor en el caso de los volátiles implicados en la percepción del aroma.

7. Posibilidades de uso de la espectroscopía de infrarrojo para el fenotipado rápido de características de calidad relacionadas con el gusto

La espectroscopía infrarroja (IR) se basa en la espectroscopía vibracional y estudia la relación entre la interacción de la radiación con la materia (sólidos, líquidos o gases) en esa parte del espectro electromagnético más allá de la zona correspondiente a la radiación visible y que comprende longitudes de onda entre 750 y 1×10^6 nm o 14.000 y 10 cm^{-1} (Bureau et al., 2019).

La región infrarroja del espectro electromagnético se puede dividir en tres regiones: infrarrojo cercano, medio y lejano, nombradas por su relación con el espectro visible. El infrarrojo lejano, FIR (*Far Infrared*) (aproximadamente $400 - 10 \text{ cm}^{-1}$ o $25.000 - 1 \times 10^6$ nm), se encuentra adyacente a la región de microondas y presenta poca energía, y se usa principalmente para la espectroscopía de rotación. El infrarrojo medio, MIR (*Mid Infrared*) (aproximadamente $4.000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ o $2.500 - 25.000$ nm), se puede usar para estudiar las vibraciones fundamentales y la estructura rotacional-vibratoria asociada, mientras que la energía más

cercana al infrarrojo cercano, NIR (*Near Infrared*) ($14.000 - 4.000 \text{ cm}^{-1}$ o $750 - 2500 \text{ nm}$), puede excitar sobretonos o vibraciones armónicas (Larkin, 2018).

La espectroscopía de Raman también puede emplearse para determinaciones indirectas, aunque la estimulación de las muestras no se restringe al ámbito del IR. La espectroscopía del IR y de Raman se diferencian por los tipos de vibraciones moleculares que detectan (Larkin, 2018). En cualquier caso, la espectroscopía del NIR y el MIR son las que conllevan el mayor número de aplicaciones relacionadas con la evaluación de frutas y hortalizas y sus productos procesados (Nicolaï et al., 2007; Bureau et al., 2019). En el caso del tomate, la espectroscopía Raman se ha orientado más al estudio de compuestos con anillos aromáticos como los carotenoides o polifenoles (Yang y Ying, 2011; Qin et al., 2012) o de residuos fitosanitarios (Li y Church, 2014).

Entre la espectroscopía del NIR y el MIR, la diferencia principal radica en que el NIR es la primera región de vibraciones de las moléculas, donde se producen las bandas de absorción fundamentales por la vibración de los átomos de las moléculas constituyentes, y es característica de sobretonos y combinaciones armónicas o de combinación de las bandas fundamentales. Estos sobretonos son debidos a la discontinuidad entre estados de energía vibracionales no contiguos, mientras que las bandas de combinación son debidas al cambio simultáneo en la energía de dos o más modos vibracionales. Todo esto hace que, para muestras de naturaleza química heterogénea, como es el caso del tomate, los espectros NIR obtenidos son el resultado de una compleja combinación de bandas o picos de absorción parciales superpuestos o muy cercanos, y cuya información solo se puede interpretar utilizando la quimiometría, la cual será explicada en profundidad más adelante.

La tecnología NIR presenta un gran interés para aplicaciones, como por ejemplo las mediciones mediante reflexión difusa en alimentos. Las bandas de sobretonos y armónicas son menos intensas que las fundamentales, lo que presenta la ventaja de que las radiaciones NIR penetran más profundamente en las muestras (varios centímetros) porque se absorben menos. Por lo tanto, es posible analizar de manera no destructiva productos agroalimentarios heterogéneos como lo son las frutas. Sin embargo, estas bandas de absorción son débiles, se superponen y no están claramente delimitadas, lo que hace que la interpretación de la información sea más compleja.

Mientras que el MIR es la región de las bandas fundamentales que son características de estructuras químicas y moleculares concretas que facilitan la identificación y cuantificación de compuestos individuales en una mezcla. Sin embargo, la radiación MIR es mucho menos energética que la NIR, y por lo tanto, solo es capaz de penetrar unas pocas micras en la muestra, lo cual obliga a destruirla (Bureau et al., 2019).

De todos modos, ambos métodos analíticos basados en espectroscopía presentan la limitación de las bandas de absorción similares o superpuestas de varios compuestos que podrían ser de interés para un análisis específico. Dicho problema, junto con el gran tamaño de las matrices de datos, ha conllevado el uso de técnicas quimiométricas, donde la más utilizada es la regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS). Además, es necesario el uso de diversas metodologías de pretratamiento de los espectros, detección de muestras anómalas, así como la

calibración y la validación de los modelos de predicción a partir de los espectros de infrarrojo (Norgaard et al., 2000; Fernández y Agosin, 2007; Bauer et al., 2008).

Cuando se dispone de los modelos de predicción dichas técnicas pueden ser utilizadas de forma rutinaria para cuantificar por predicción de forma bastante aproximada el contenido en uno o varios compuestos con una simple medida del espectro infrarrojo de la muestra en cuestión.

7.1. NIR

7.1.1. Aspectos generales

En el año 1800 el astrónomo Friedrich Wilhelm Herschel descubrió la radiación del infrarrojo cercano al hacer pasar la luz solar a través de un prisma de vidrio para que la luz se dividiera en sus diferentes colores y midiendo la capacidad de calentamiento de cada color utilizando termómetros con bombillas ennegrecidas (Davies, 2000). Descubrió que la parte de radiación más próxima al rojo era la que tenía mayor capacidad de calentamiento. De este modo Herschel concluyó que debía de haber algún tipo de radiación diferente más allá de la parte roja del espectro, la cual no es visible al ojo humano. De ahí que se la denomine radiación infrarroja (por debajo de la roja).

Sin embargo, esta técnica no fue explotada por los investigadores durante más de 150 años debido a que las bandas de absorción en esta región son muy débiles y están superpuestas, cosa que dificulta la obtención y el análisis de señales efectivas involucradas en el espectro (Polshin et al., 2006). No fue hasta 1964 cuando la técnica NIR fue puesta en práctica por primera vez en el ámbito de la agricultura para la medición de la humedad en grano (Norris, 1964). A partir de entonces, la utilización de esta técnica analítica ha ido en continuo crecimiento hasta el día de hoy. Tal es así que el uso de espectros NIR es una de las técnicas más utilizadas para la evaluación rápida de los atributos de calidad interna de las frutas (Nicolai et al., 2007).

El NIR es un tipo de espectroscopía que se debe a las transiciones vibracionales y rotacionales que cubren el rango electromagnético entre los 750 a 2500 nm. En esta zona del espectro se obtiene información de los sobretonos y la combinación de las vibraciones de los enlaces C-H, O-H y N-H (Burns y Ciurczak, 2007; Eldin, 2011; Wang et al., 2015).

Cuando la radiación incidente llega a una muestra esta puede ser reflejada, absorbida o transmitida. Mientras la radiación penetra en la muestra, sus características espectrales cambian a través de los procesos de dispersión y absorción que dependen de la longitud de onda. Estos cambios también dependen de la composición química del producto, así como de sus propiedades físicas de dispersión de la radiación que están relacionadas con la microestructura de este.

7.1.2. Tipos de equipos

La interacción entre la radiación y los tejidos biológicos es muy complicada. Como se ilustra en la figura 5, cuando un haz de radiación llega a la fruta, una fracción se refleja directamente en la superficie, la cual se define como la reflectancia especular (Mollazade et al., 2012). El resto de la radiación penetra en el tejido del fruto. Allí se producen dos interacciones básicas entre la radiación y el tejido: la absorción y la dispersión. Al entrar en el tejido, los fotones se dispersan en diferentes direcciones durante varios momentos antes de ser absorbidos o salir del tejido (Lu, 2004).

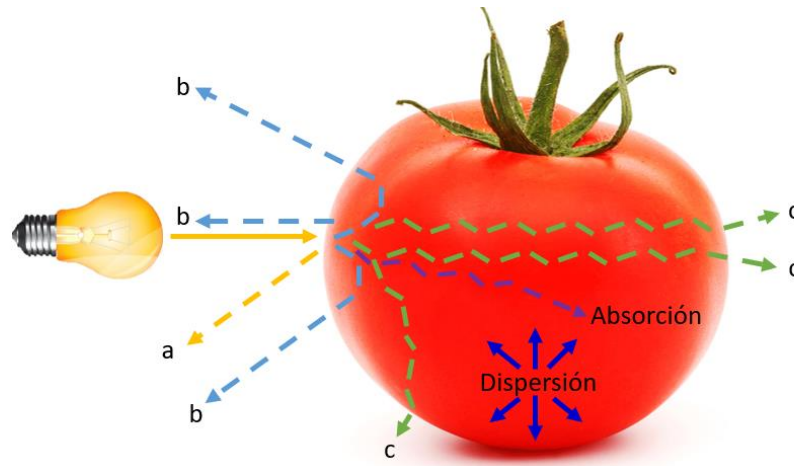


Figura 5. Distribución de la radiación incidente en el fruto: a = reflectancia especular, b = reflectancia difusa, y c = transmitancia (modificado de Xie et al., 2016).

En función de la interacción entre el tejido y la radiación existen tres configuraciones de medición diferentes para obtener espectros de infrarrojo cercano (Figura 6): reflectancia, transmitancia y transflectancia (Nicolaï et al., 2007; Xie et al., 2016).

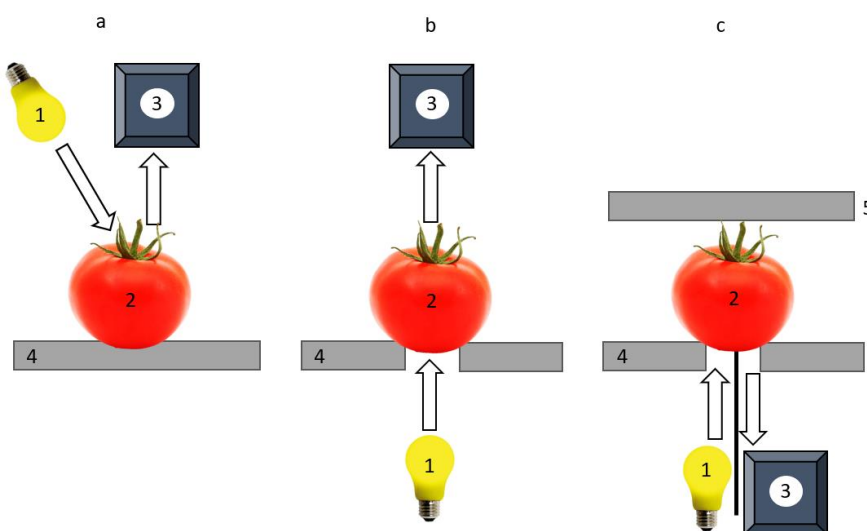


Figura 6. Modos de detección: a) reflectancia difusa, b) transmitancia y c) transflectancia. (1) fuente de luz, (2) fruto, (3) monocromador/detector, (4) soporte y (5) barrera (modificado de Xie et al., 2016).

El modo de **reflectancia** se refiere principalmente a la reflectancia difusa. Es el efecto producido cuando un haz de radiación incide sobre la superficie de un cuerpo y éste lo devuelve al medio en mayor o menor proporción en función del tipo de material sobre el que incida la radiación. El ángulo entre la radiación incidente y la emergente es menor de 90°. Así pues, la fuente de radiación y el detector se montan bajo un ángulo específico, por ejemplo, 45°, para evitar la reflexión especular.

En el modo de **transmitancia** el ángulo entre la radiación incidente y la radiación emergente es igual o mayor de 90°. Lo más habitual es que la fuente de radiación se coloque totalmente opuesta al detector, es decir, en línea recta. Así, cuando el haz de luz monocromática (de una sola longitud de onda) incide sobre la muestra, parte de ese haz será absorbido y otra parte atravesará el medio. La transmitancia es la parte del total que no es absorbida por la muestra en la que incide.

Por último, el modo de **transflectancia** es una combinación de los dos anteriores. También se le conoce como doble transmisión. En este caso parte de la radiación incidente es reflejada en la muestra y otra parte la atraviesa para ser reflejada por un material colocado en la cara opuesta de la muestra, entre el detector y la fuente de radiación. Además, la fuente de radiación y el detector se colocan paralelos entre sí de tal manera que la luz debida a la reflexión especular no puede ingresar directamente al detector. Esto se puede lograr por medio de un cable bifurcado en el que las fibras que conducen a la fuente y el detector son paralelas entre sí y ambas están en contacto con el producto, o por medio de una disposición óptica especial.

De los tres el modo de reflectancia difusa se ha utilizado durante décadas en los espectrómetros comerciales debido a la disposición simple de la muestra y a la facilidad de uso. Sin embargo, este modo es susceptible a variaciones debidas a la rugosidad de la superficie de las muestras y a la luz dispersa, que influyen negativamente en el rendimiento de la calibración.

7.1.3. Ventajas e inconvenientes

En la espectroscopía NIR el tiempo de medición de los espectros es corto (de unos pocos segundos a minutos, dependiendo del equipo), por lo que se facilita la evaluación de un gran número de muestras en relativamente poco tiempo. Además, no se requieren reactivos químicos para efectuar los análisis, lo cual la convierte en una técnica limpia y respetuosa con el medio ambiente (Jha y Matsuoka, 2004; Cen y He, 2007).

A diferencia de las técnicas de separación y cuantificación tradicionales (CZE, HPLC, CG-EM) la tecnología NIR permite, cuando se dispone de modelos de calibrado adecuados, determinar múltiples compuestos de forma simultánea. En estas condiciones, su manejo no requiere de personal cualificado (Wang et al., 2015).

La reducción del tamaño y el abaratamiento de estos equipos ha permitido su uso fuera del laboratorio, pudiendo ser aplicado directamente en campo antes de la cosecha de los frutos.

En postcosecha también existe la posibilidad de instalar estos equipos en las líneas de producción (Xie et al., 2016).

Se añade como ventaja que la radiación NIR penetra bastante en el tejido, por lo que se pueden desarrollar métodos de análisis no destructivos. Aunque la profundidad de penetración varía en función de la longitud de onda, en general se entiende que la mayor parte de la información obtenida por el espectro deriva de los primeros 5 mm, lo que complica su aplicación a frutos de corteza gruesa (Arendse et al., 2018) o aquellos casos en los que la estructura interna del fruto es irregular (de Oliveira et al., 2014a). De forma más precisa, Lammertyn et al. (2000) establecieron una profundidad de penetración de hasta 4 mm en el rango de 700–900 nm y entre 2 y 3 mm en el rango de 900–1900 nm para la manzana. Las medidas de transmisión, por otro lado, necesitan intensidades de luz muy altas que pueden quemar fácilmente la superficie de la fruta y alterar sus propiedades espectrales. Por ello, se suele limitar su uso a muestras ya procesadas.

No obstante, no todo son ventajas. Hay que tener en cuenta una serie de factores que dificultan el uso del NIR debido a la complejidad de los espectros. En primer lugar, las frutas y hortalizas están constituidas en su mayor parte por agua (en general más del 90% del su peso es agua), la cual absorbe radiación del infrarrojo cercano, al igual que multitud de compuestos químicos. Esto hace que los espectros NIR tomados en frutas y hortalizas estén muy influenciados por la absorción de agua, lo cual dificulta la determinación de otros compuestos (Nicolai et al., 2007).

Además, como ya hemos visto, los espectros NIR están formados por la superposición de bandas armónicas o combinadas (sobretonos) las cuales no se pueden asociar a los distintos grupos funcionales específicos ni tampoco a los diferentes componentes químicos, lo cual obliga a trabajar con todo el espectro recogido.

Estas dificultades hacen necesario el uso de técnicas estadísticas multivariantes, también llamadas quimiométricas, para la extracción de la información subyacente sobre los atributos de calidad que están en el espectro NIR. Por ello, la aplicación completa de la técnica NIR incluye la recolección de los espectros utilizando un sistema NIR, el pretratamiento de los espectros, la identificación de muestras anómalas (*outliers*) y el descarte de la información procedente de estas, el desarrollo de los modelos de calibración y la validación de dichos modelos antes de poder utilizarlos para predicción.

Dentro de las dificultades de la quimiometría en el NIR, una de las principales desventajas radica en la aplicabilidad de los modelos obtenidos. En primer lugar, porque para que los modelos sean robustos, deben construirse con un gran número de muestras. Pero una de las mayores limitaciones es que, generalmente, en cada ensayo debe obtenerse un modelo específico. Esto implica una desventaja económica, ya que para la construcción del modelo las muestras deben analizarse por métodos de cuantificación directos.

7.1.4. Partes del equipo

Los espectrómetros NIR están formados por cinco componentes principales: una fuente de radiación, un monocromador, un detector, un compartimiento para la muestra y, en algunos, casos diferentes accesorios ópticos (Xie et al., 2016).

Fuente de radiación

La fuente de radiación es el componente principal en un sistema NIR. Esta proporciona la energía de luz para iluminar las muestras. Además, antes de que se obtengan los espectros de las muestras, se debe adquirir un espectro oscuro con la fuente de radiación apagada y un espectro de referencia (también llamado referencia blanca) con la fuente de radiación encendida como referencias para calcular el valor de absorbancia.

La radiación proporcionada por la fuente debe cubrir la región NIR (750 a 2500 nm). Las más utilizadas en la mayoría de los estudios son las lámparas halógenas de tungsteno debido a su bajo coste. Sin embargo, existen algunos inconvenientes asociados a este tipo de lámparas: las fuentes de luz blanca a menudo generan grandes cantidades de calor, que pueden quemar la muestra; su vida útil operacional es limitada, por lo que la sustitución de las lámparas puede alterar la posición de la luz y el ángulo de la luz incidente; la salida espectral puede desviarse con el tiempo; y la salida de energía radiante no es igual en diferentes longitudes de onda (Cen y He, 2007).

También existen otros dos tipos de fuentes de radiación: los diodos de emisión de luz (LED) y los diodos láser (LD). Estas fuentes suministran longitudes de onda específicas que son críticas en el modelado y que a menudo se emplean en sistemas portátiles o dedicados después de seleccionar las longitudes de onda críticas. Aunque los LED y LD han existido durante años, estas fuentes de radiación aún no han reemplazado a las lámparas halógenas de tungsteno como la fuente de radiación NIR más popular, ya que su precio es muy alto, lo cual limita el uso de estas fuentes en el campo de la agricultura.

Sistema de detección de longitudes de onda

Los equipos NIR pueden ser clasificados en dos grupos según el tipo de detector: de longitud de onda discreta y de espectro completo.

Los primeros son más simples, ya que irradian las muestras con solo unas pocas longitudes de onda. Por lo tanto, solo pueden usarse en aplicaciones con analitos que absorben en zonas espectrales específicas. En estos, las longitudes de onda se seleccionan utilizando filtros de la fuente de radiación que permiten el paso de bandas concretas de longitud de onda o mediante diodos emisores de luz (LED) que emiten bandas estrechas. La ausencia de partes móviles hace que los espectros basados en LEDs sean sencillos y robustos, y por lo tanto son susceptibles de ser utilizados en equipos portátiles.

Los instrumentos NIR de espectro completo disponen del monocromador o unidad dispersiva, que no es más que un dispositivo que descompone la luz policromática que proviene de la fuente de radiación en longitudes de onda discretas. La radiación entra en forma de haz estrecho y un elemento dispersante (un prisma o una rejilla de difracción) la descompone. También pueden ser del tipo de transformada de Fourier (FT-NIR), el cual divide la luz en dos haces cuyas longitudes de trayectoria cambian continuamente para dar modelos de interferencia mediante un espejo móvil. Variando la posición de los espejos se pueden crear interferencias constructivas o destructivas. Al recombinar los dos haces se obtiene una señal denominada interferograma. Estos son mucho más flexibles que los instrumentos discretos de longitud de onda, por lo que se pueden utilizar en una variedad más amplia de situaciones.

Otros dispositivos de selección de longitud de onda incorporados en espectrofotómetros NIR en los últimos años incluyen los filtros ajustables acústico-ópticos (AOTF). Estos eligen las longitudes de onda mediante el uso de señales de radio frecuencia para alterar el índice de refracción de un cristal birrefringente (generalmente TeO_2) para que transmita luz de una longitud de onda determinada o realice una exploración de longitud de onda mucho más rápidamente que con los diseños anteriores. La ausencia de piezas móviles en los AOTF garantiza exploraciones de longitud de onda más fiables y reproducibles que las que ofrecen otros dispositivos. Esto hace que los AOTF sean especialmente adecuados para equipos sujetos a condiciones agresivas, como en las plantas de producción (Blanco y Villarroya 2002).

Detector

Su función, como su nombre indica, es detectar la intensidad de la radiación y luego transformarla en una señal eléctrica, la cual puede ser digitalizada y procesada. Actualmente, los detectores cuánticos hechos de semiconductores son los detectores más populares en los instrumentos NIR (Lu, 2010).

Los materiales comunes que se utilizan para construir detectores NIR son el silicio (Si), el arseniuro de galio e indio (InGaAs) y el sulfuro de plomo (PbS), entre los cuales los detectores de Si e InGaAs son los más utilizados. Los detectores de silicio son sensibles al espectro NIR hasta aproximadamente 1100 nm, mientras que los detectores InGaAs son útiles en la región espectral de 800-1700 nm. Con los detectores de PbS, el rango de longitud de onda es de 1000-2500 nm (Walsh et al., 2000).

Las condiciones de trabajo, especialmente la temperatura, influyen en el rendimiento de los detectores. Los detectores de silicio funcionan a temperatura ambiente, mientras que para los InGaAs y otros detectores, a menudo es necesaria una temperatura relativamente baja.

Según la cantidad de canales disponibles, se definen dos tipos de detectores: de un solo canal y de varios canales. Para los detectores de un solo canal, el espectro se recopila de una longitud de onda a otra mediante el escaneo mecánico, lo que lleva más tiempo y puede proporcionar una precisión pobre. La aparición de detectores multicanal ha superado estas deficiencias. En estos los elementos de detección de infrarrojos están alineados en una o dos dimensiones (Siesler et al., 2008). Los dispositivos de carga acoplada (CCD: *charge-coupled device*) y las matrices de fotodiodos (PDA: *photodiode array*) son los dos tipos de detectores

multicanal. Un sensor CCD comprende muchos píxeles pequeños que están hechos de materiales sensibles a la luz, como el Si y el InGaAs, y un sensor PDA está formado por una serie de fotodiodos. La función de los CCD o PDA es recolectar los electrones generados por los fotones que golpean el detector en los píxeles o fotodiodos durante el tiempo en que los detectores están expuestos a la luz. Actualmente, los PDA o CCD de bajo coste con Si y/o InGaAs se han utilizado ampliamente en espectrómetros portátiles comerciales (Greensill et al., 2001).

El tipo de detector debe considerarse de acuerdo con los requisitos de la aplicación. En general, se recomiendan los detectores CCD para aplicaciones con muy poca luz, mientras que los detectores PDA son la mejor opción para mediciones de absorbancia precisas cuando hay niveles de luz más altos disponibles (Walsh et al., 2000). Además, los sensores CCD y PDA permiten la construcción de equipos portátiles o en línea debido a las ventajas de bajo coste, rendimiento robusto y tamaño pequeño.

Compartimiento para la muestra y accesorios ópticos

Se necesitan diferentes compartimientos de muestra para los diferentes estados de la materia (sólido, líquido o gaseoso).

Para las frutas detectadas usando el modo de transmisión, a menudo se usa un soporte o bandeja con un orificio en el centro y con un material blando adherido, como una goma o esponja. El orificio en el centro es por donde se transmite la radiación emergente al detector, y el material blando se utiliza para rodear el área detectada y sellar el compartimiento de la luz externa.

En el caso de medir frutos mediante reflectancia difusa, se utiliza un cable de fibra óptica junto con una “campana” que se coloca sobre la muestra.

Para muestras líquidas, como zumos de frutas, las cubetas de cuarzo de diferentes tamaños a menudo se adoptan como compartimientos de muestra (Jha y Matsuoka, 2004).

En cuanto a los accesorios ópticos el más relevante es la fibra óptica a través de la cual se dirige la señal luminosa desde la fuente de radiación hasta la muestra. La pérdida de energía debida a la flexión de la fibra requiere una atención especial. De este modo el radio de curvatura de la fibra óptica debe ser mayor que el valor mínimo permitido, ya que la flexión excesiva del cable de fibra óptica puede afectar a su respuesta espectral.

7.2. MIR

7.2.1. Aspectos generales

Las primeras generaciones de espectrómetros de infrarrojo medio (MIR) surgieron en 1940, basados en la tecnología dispersiva. Más adelante, en la década de los 1960 se desarrollaron para uso comercial los espectrómetros de infrarrojo medio con transformada de

Fourier (FT-MIR) con interferómetro integrado de Michelson, principalmente para la investigación avanzada, debido al elevado coste de los primeros instrumentos y a los enormes ordenadores necesarios para utilizarlos (Franca y Oliveira 2011; Bureau et al., 2019). Dado que la transformada de Fourier se empezó a aplicar en el espectro MIR es habitual abreviar la técnica como FTIR, aunque por su extensión al NIR es más apropiado diferenciar entre FT-MIR y FT-NIR. En cualquier caso, de forma progresiva, los avances tecnológicos han ido reduciendo el tamaño y el coste de los FT-MIR, junto con la mejora de los softwares de procesado. Hoy en día casi todos los espectrómetros utilizados en la espectroscopía de infrarrojo medio son los del tipo de transformada de Fourier. De este modo, el FT-MIR es un equipo habitual que permite el análisis de diferentes tipos de muestras (sólidos, líquidos, gases, semisólidos, polvos, polímeros, compuestos orgánicos, inorgánicos, materiales biológicos, sustancias puras, etc.). Así pues, su uso está presente en ámbitos tan diferentes como la química analítica, control de calidad, medicina forense, ciencias de la vida y en la agricultura (Smith, 2011; Bureau et al., 2019).

En cuanto a la primera aplicación de la espectroscopía FT-MIR para el análisis de productos agrícolas no existe una total certeza, ya que muchos de los estudios iniciales que definen las bandas vibracionales de los azúcares en soluciones acuosas se remontan a los años 60. Lo que sí está claro es que las primeras aplicaciones de la espectroscopía FT-MIR para el análisis de alimentos se publicaron a principios de los 90 para determinar el contenido de fruta en las mermeladas (Wilson et al., 1993). Desde entonces y hasta el día de hoy se ha utilizado esta tecnología para cuantificar multitud de diferentes compuestos en más de 45 especies de frutas y verduras (Bureau et al., 2019).

La espectroscopía MIR se basa en la absorción de la radiación en el rango de los 4000–400 cm^{-1} , donde principalmente las vibraciones fundamentales son excitadas. Así, cuando la radiación infrarroja se dirige a una molécula, el campo eléctrico oscilante asociado con la radiación interactúa con los enlaces particulares de la molécula, lo que hace que absorban cantidades discretas de energía a frecuencias resonantes específicas y vibren (Smith, 2011; Larkin, 2018). En las moléculas complejas, estas vibraciones pueden adoptar diferentes formas, descritas como modos de estiramiento (Skoog et al., 2017; Bureau et al., 2019).

La región del infrarrojo medio se puede dividir a su vez en regiones específicas en las cuales se obtiene información acerca de enlaces simples que contienen H (O-H, C-H, N-H) entre 4000–2000 cm^{-1} , enlaces triples (C \equiv C, C \equiv N) entre 2300–2200 cm^{-1} , enlaces dobles (C=C, C=N, C=O) entre 1950–1550 cm^{-1} , y enlaces simples (C-C, C-N, C-O) entre 1300–800 cm^{-1} (Larkin, 2018). Así pues, a diferencia del NIR, en donde no es posible asignar la absorción característica de los enlaces a regiones concretas del espectro, el MIR resulta más específico, lo cual permite obtener más información y ajustar mejor los modelos al no tener que trabajar con el espectro entero. Además, los espectros resultantes son únicos para cada molécula, lo cual los convierte en una especie de “huella digital”.

Uno de los problemas a la hora de aplicar la espectroscopía MIR al análisis de frutos se debe a la interferencia del agua, que es el componente mayoritario. Así, el agua absorbe en las regiones entre 3700–2800 cm^{-1} y 1800–1470 cm^{-1} , que corresponden a enlaces O-H, característicos del agua. Algo similar ocurre con el dióxido de carbono del ambiente, el cual

absorbe en la región entre los 2400-1800 cm^{-1} (Bureau et al., 2009, 2012, 2013; Scibisz et al., 2011; Wilkerson et al., 2013; Ayvaz et al., 2016).

En el caso concreto del tomate, así como de otros frutos, de todo el espectro únicamente se extrae información referente a los compuestos relacionados con la intensidad del sabor (azúcares y ácidos) entre los 1800–900 cm^{-1} . Aunque en la franja de los 1600–1700 cm^{-1} se observa una fuerte absorción en las muestras (Figura 7), debida a la absorción por el agua que puede saturar los sensores (Wilkerson et al., 2013), por lo que para evitar esta interferencia, el espectro se suele ajustar al rango 1500-900 cm^{-1} . En esta región los enlaces característicos de los principales azúcares (fructosa, glucosa y sacarosa) y ácidos orgánicos (cítrico, málico y glutámico) muestran bandas características debidas a los enlaces de tipo C-C-H, C-O-H, C-C y C-O (Bureau, et al., 2009; Wilkerson et al. 2013; de Oliveira et al., 2014a). Sin embargo, aunque los espectros MIR sean más específicos que los NIR, estos también son complicados de interpretar y utilizar.

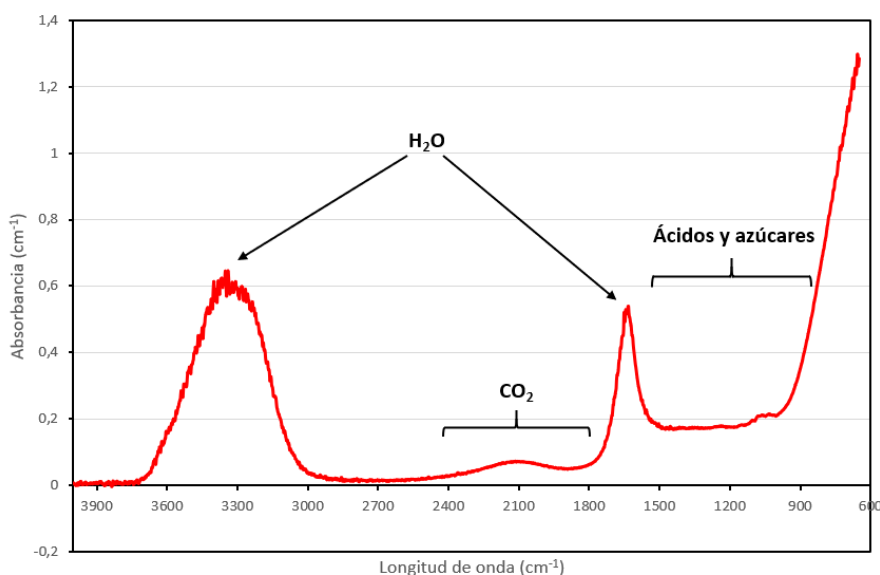


Figura 7. Espectro infrarrojo de absorción de una muestra de tomate en el equipo portátil Cary 630 FT-MIR.

Además, las muestras a analizar contienen multitud de compuestos diferentes mezclados. Y cada compuesto tiene su propia contribución al espectro, dependiendo de los tipos de enlaces que contengan y su concentración en la muestra. El espectro resultante es, por lo tanto, una combinación compleja de las diferentes absorbancias de los enlaces de los compuestos que forman parte de la muestra, lo que dificulta su utilización (Huang et al., 2009).

Aun así, al igual que ocurría con el NIR, se puede recurrir al uso de técnicas quimiométricas que nos permiten relacionar las cuantificaciones obtenidas mediante las técnicas analíticas separativas instrumentales directas (CZE, HPLC, CG-EM) con los espectros FT-MIR, y así poder desarrollar modelos de predicción.

De forma análoga, el uso de la técnica FT-MIR sigue los mismos pasos que vimos para el NIR: obtención de los espectros, el pretratamiento de los mismos, la detección de muestras anómalas, el desarrollo de los modelos de calibración y la validación de dichos modelos.

7.2.2. Tipos de equipos

Instrumentos MIR dispersivos

Los instrumentos de espectroscopía MIR iniciales eran del tipo dispersivo, los cuales separaban individualmente las frecuencias de energía emitidas desde la fuente infrarroja mediante el uso de un prisma o rejilla. Ambos elementos son capaces de separar las frecuencias de la energía infrarroja al dispersar la radiación como lo hace el vapor de agua para hacer que el arcoíris sea visible. El detector mide en cada una de las longitudes de onda la cantidad de energía (diferenciándola por frecuencias) que ha pasado a través de la muestra, y el resultado es un espectro o gráfico de intensidad frente a frecuencia (Sun, 2009; El-Azazy, 2018).

El principal inconveniente de los espectrómetros dispersivos es que cada frecuencia se mide de forma individual, lo cual requiere de mucho tiempo. Además, estos equipos necesitan de una fuente de calibración externa de la longitud de onda, ya que no disponen de una referencia interna.

Instrumentos con transformada de Fourier

A mediados de los años 60 se desarrollaron los primeros FT-MIR para superar las limitaciones encontradas con los instrumentos dispersivos. De este modo, el FT-MIR emplea un interferómetro que permite medir todas las frecuencias simultáneamente, y además contiene un láser para su calibración interna.

Esto permite analizar las muestras de forma muy rápida y, por lo tanto, con un alto rendimiento. El interferograma resultante se somete luego a la transformación de Fourier para transformarse en un espectro. Es más, la gran mayoría de espectrómetros de infrarrojo medio son del tipo transformada de Fourier (Smith, 2011).

Al igual que en el caso de la espectroscopía NIR, existen varios tipos de espectrómetros FT-MIR, aunque su estructura es la misma y lo único que cambia es su tamaño. Así, los primeros instrumentos FT-MIR se desarrollaron para su uso en el laboratorio. Sin embargo, la miniaturización de sus componentes ha permitido el desarrollo de espectrómetros portátiles que son compactos, resistentes, ligeros, y que además tienen un rendimiento similar a los de laboratorio.

En cualquier caso, hay que tener en cuenta que la radiación MIR apenas tiene capacidad para penetrar en los tejidos del fruto, de hecho, apenas alcanza los primeros μm (Porep et al., 2015), por lo que los métodos desarrollados son necesariamente destructivos. Esto en sí, representa una desventaja frente al NIR, que sí que puede penetrar varios milímetros como se

ha comentado. Por otro lado, la necesidad de triturar y homogenizar la muestra tiene la ventaja de evitar la interferencia estructural que dificulta el desarrollo de modelos predictivos eficientes.

El tipo de equipo también varía en función del **método de detección empleado**. Entre los principales métodos destacan los que basan las mediciones en transmisión, reflectancia total atenuada (*Attenuated Total Reflectance*, ATR), reflectancia especular, reflectancia difusa y espectroscopía infrarroja fotoacústica.

Transmisión

Es la técnica clásica de medición infrarroja, en donde la muestra se coloca en la trayectoria del haz del espectrómetro infrarrojo. La radiación infrarroja se transmite hacia la muestra y se analiza en relación con la radiación incidente. Con esta técnica se pueden analizar muestras gaseosas, líquidas y sólidas. En particular, ha sido satisfactoriamente usada en muestras de tomate (Wilkerson et al., 2013).

Reflectancia Total Atenuada

El uso de la ATR se ha convertido en el sistema de muestreo por contacto más habitual en productos agrícolas, ya que permite analizar muestras que contienen agua, la cual absorbe fuertemente en la región IR (Lu y Rasco, 2012). Además, la preparación de las muestras líquidas es mínima, ya que basta con centrifugarlas para eliminar las partículas sólidas y depositar la muestra sobre la superficie de medición.

La unidad ATR (figura 8) está formada por un cristal de alto índice de refracción (> 2.4) y excelentes propiedades de transmisión de IR, sobre el cual se coloca la muestra. Es importante que la muestra tenga un índice de refracción más bajo para conseguir el efecto de reflectancia interna total. Por lo general, dicho cristal está fabricado por un material duro, químicamente inerte e insoluble en agua. Los más comunes son de diamante, de Ge o ZnSe. Resulta crítico seleccionar el cristal adecuado para el análisis de ATR. Para ello se debe tener en cuenta la dureza de la muestra, así como la profundidad de penetración y el incremento espectral deseados.

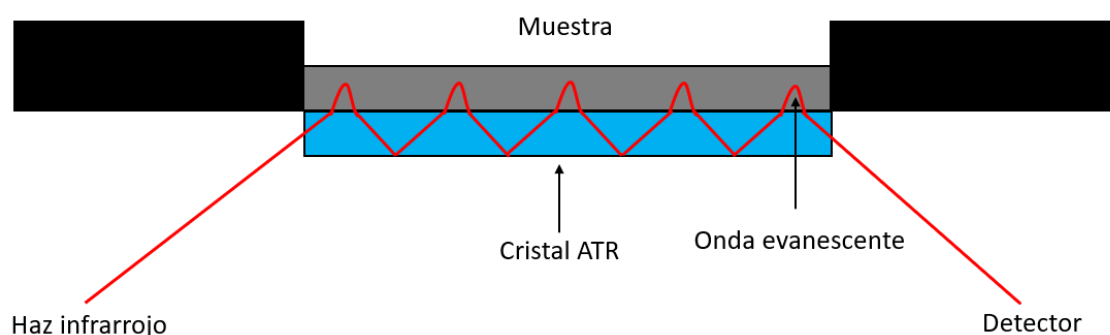


Figura 8. Esquema de un ATR de 5 rebotes.

Además de seleccionar el tipo de cristal ATR adecuado, también debe considerarse el número de rebotes. Existe una relación directa entre el número de rebotes dentro de un cristal ATR y la relación de intensidad del espectro resultante. Cuanto mayor sea el número de rebotes, más distintivas serán las bandas y mejor será la relación señal/ruido, ya que la longitud de paso efectiva (*Effective Path Length*, EPL) será mayor. En este sentido, cuanto menor sea la concentración de un compuesto, mayor debe ser la EPL. Del mismo modo, la relación señal/ruido puede mejorarse aumentando el tiempo de medición. La mayoría de los elementos ATR son de 1 único rebote, ya que el haz de IR solo interactúa con la muestra una vez antes de ir al detector. Cuando se dispone de suficiente muestra, los dispositivos ATR horizontales permiten que la radiación interactúe con la muestra en múltiples ocasiones (por ejemplo, 5 rebotes), lo que mejora considerablemente la sensibilidad.

Debido a la diferencia entre el índice de refracción de la muestra y el elemento de reflexión, la radiación IR dirigida a ángulos moderados de incidencia en la superficie sufre una "reflectancia interna total". Sin embargo, dicho haz reflejado todavía contiene información espectral sobre la muestra. Esto se debe a que la radiación en el punto de reflexión produce una "onda estacionaria evanescente" que se extiende hacia la muestra (Milosevic, 2013; Larkin, 2018). Dado que la energía total en la onda estacionaria y reflejada se conserva, las frecuencias en la onda estacionaria donde los componentes de la muestra absorben energía se atenúan o alteran de manera similar en el haz reflejado. Mientras que en otros lugares, si no se absorbe energía, las amplitudes de las otras frecuencias simplemente se reflejan sin cambios. La onda estacionaria tiene una serie de propiedades interesantes, entre las que destaca que la profundidad de la luz que penetra en la muestra depende de la longitud de onda (Averett et al., 2008; Milosevic, 2013). Es decir, en el rango entre 4000 y 400 cm^{-1} , la radiación penetra desde aproximadamente 0,4 a 4 μm a medida que disminuye la frecuencia. Como consecuencia, las absorbancias a frecuencias más bajas son correspondientemente más altas que aquellas obtenidas para las frecuencias más altas, ya que la radiación se encuentra con más especies absorbentes.

El ATR se puede usar para todo tipo de muestras tanto líquidas como sólidas, así como para muestras de polímeros, semiconductores, cristales, metales. Al igual que en el caso de la transmisión también se ha aplicado satisfactoriamente en el caso del tomate (Wilkerson et al., 2013).

Reflectancia difusa

La reflectancia difusa se usa a menudo para muestras heterogéneas o polvos y sólidos que tienen una superficie rugosa. La radiación dispersada difusamente de la muestra se recoge en un ángulo amplio. La reflectancia difusa se utiliza tanto en espectroscopia MIR como NIR. Para ello se necesitan diferentes accesorios de medida.

En el caso del MIR el accesorio para medir mediante reflectancia difusa es la denominada esfera integrada y se utiliza para analizar polvos, papel, polímeros, muestras sólidas con superficies rugosas.

El haz de radiación se emite hacia la muestra, la cual absorbe una parte, mientras que otra la refleja. Esta última choca con las paredes internas de la esfera, las cuales están recubiertas de oro para garantizar un alto grado de reflexión. La luz dispersada difusa de la muestra se integra en la esfera y finalmente llega al detector.

Las principales ventajas de esta son que las muestras no necesitan ser homogéneas y no se requiere una preparación de la muestra en la mayoría de los casos.

Espectroscopía infrarroja fotoacústica

Casi todas las muestras pueden analizarse mediante las técnicas anteriores: transmisión, reflectancia total atenuada y reflectancia difusa. Solo las muestras con absorción fuerte no pueden ser analizadas con estos métodos. Sin embargo, estos tipos de muestras pueden investigarse en el MIR con el método de detección basado en espectroscopía infrarroja fotoacústica (*Photoacoustic infrared spectroscopy*, PAS).

La luz infrarroja modulada se enfoca en la muestra que se coloca en una cámara hermética llena de un gas inerte. La absorción provoca la formación de ondas de calor, que llegan a la superficie de la muestra. El calor se libera parcialmente a los gases en la interfaz por encima de la muestra, por lo que las modulaciones de presión resultantes se pueden detectar con un micrófono sensible.

7.2.3. Ventajas e inconvenientes

Las principales ventajas que presenta el uso de la tecnología FT-MIR son: la necesidad de poca cantidad de muestra, así como la poca exigente preparación de la misma, sin necesidad de recurrir al uso de productos químicos tóxicos o carcinogénicos; la rapidez en la obtención de los espectros (alrededor de 1 minuto por muestra) y la simplicidad del análisis; es una técnica muy sensible (puede detectar pequeñas cantidades de compuestos químicos). Y aunque se trata de una técnica destructiva, esta permite analizar múltiples estados físicos (sólidos, líquidos, gases, materiales amorfos, películas, polvos, polímeros, etc.), así como determinar de forma simultánea múltiples compuestos con una única medida del espectro (Franca y Oliveira 2011; Smith 2011; Bureau et al. 2019).

Los equipos FT-MIR actuales son bastante económicos, más aún si los comparamos con los equipos instrumentales de laboratorio más precisos que utilizan técnicas como la cromatografía o la electroforesis capilar. Además, su simplicidad permite que sean manejados por personal no especializado.

Otra ventaja de los FT-MIR es que permiten realizar múltiples escaneos durante el periodo de observación. Cuanto mayor es el tiempo, mayor es la calidad del espectro. En los FT-MIR el tiempo de observación se determina por la suma del tiempo en que se tarda en realizar los escaneos y cuantos más escaneos se toman de una muestra, más tiempo se puede observar la intensidad de la radiación (Smith, 2011).

Además, los FT-MIR son muy precisos en la medición de las frecuencias de onda. Una elevada precisión permite mejorar la reproducibilidad de las mediciones (es decir, que la posición de los picos no varía entre mediciones). De ahí la importancia de contar con un láser que se utiliza para regular la velocidad del espejo móvil y para cronometrar la recopilación de datos. Este láser también se utiliza como señal de referencia dentro del instrumento. Todo esto permite que las frecuencias de ondas sean determinadas con una elevada precisión, de $\pm 0.01 \text{ cm}^{-1}$ (Smith, 2011).

A pesar de las virtudes, los FT-MIR no son instrumentos perfectos. Por eso los FT-MIR también tienen algunas desventajas. La principal desventaja es que en el espectro de una muestra pueden aparecer artefactos, o dicho de otro modo, características que no son de la muestra pero que están presentes en el espectro. Los ejemplos más comunes se deben, como se ha comentado, a la interferencia del agua y el dióxido de carbono que pueda haber en el ambiente. Dado que los espectros (tanto de absorbancia como de % de transmitancia) se calculan relacionando el espectro de referencia (*background*) y el espectro de la muestra, si la contribución del vapor de agua y del CO₂ ambientales es la misma esto no supone ningún problema. Sin embargo, cuando se utiliza un FT-MIR, los espectros de referencia y de la muestra se miden en diferentes momentos. Cuando se usa un FT-MIR, se debe tener cuidado de no interpretar estos picos como provenientes de la muestra (Smith, 2011).

Otro inconveniente es que el FT-MIR no es capaz de detectar algunas moléculas, porque estas no tienen espectros medibles en el infrarrojo medio. Dado que la absorbancia de la radiación infrarroja excita las vibraciones de los enlaces que forman una molécula, las especies químicas sin vibraciones no tienen espectro infrarrojo. Por eso las especies a analizar deben tener enlaces químicos que sean activos por IR. De este modo los átomos individuales, como por ejemplo los gases nobles que no están unidos químicamente a nada, no tienen vibraciones, y por lo tanto, no tienen un espectro infrarrojo. Esto mismo les ocurre a los iones y especies monoatómicas. Algo similar les ocurre a las moléculas diatómicas homonucleares, las cuales contienen solo dos átomos y ambos son iguales (gases O₂ y N₂). Estas moléculas sí que poseen una vibración, pero esta es simétrica y el resultado final es 0, por lo que no tienen picos en el infrarrojo medio. Probablemente esto sea una ventaja, ya que estos dos gases constituyen más del 99% de la atmósfera de la Tierra, y si absorbieran en el infrarrojo medio, interferirían fuertemente con los espectros de las muestras.

Al igual que se comentó en el caso del NIR, las matrices a analizar son muy complejas, ya que la composición química de las mismas es el resultado de la presencia de multitud de compuestos. Esto obliga a utilizar técnicas quimiométricas para su análisis.

Aunque de todo ellos, el mayor inconveniente del uso de esta técnica es que inicialmente depende de otras para poder relacionar las variables cuantificadas con los espectros y así construir los modelos de predicción. Además, dichos modelos deben ser bastante amplios y deben de actualizarse de forma continua para mejorarlos (Franca y Oliveira 2011; Smith 2011; Bureau et al. 2019).

7.2.4. Partes del equipo

Un instrumento FT-MIR se basa en la interferencia de varias frecuencias de radiación para recopilar un espectro. Un espectrómetro FT-MIR básico consta de una fuente de radiación, un divisor de haz (*beamsplitter*), dos espejos (uno fijo y otro móvil), un láser y un detector. El divisor de haz junto con los espejos constituyen el interferómetro (Sun, 2009; Smith, 2011). El conjunto de todos ellos se muestra en la Figura 9.

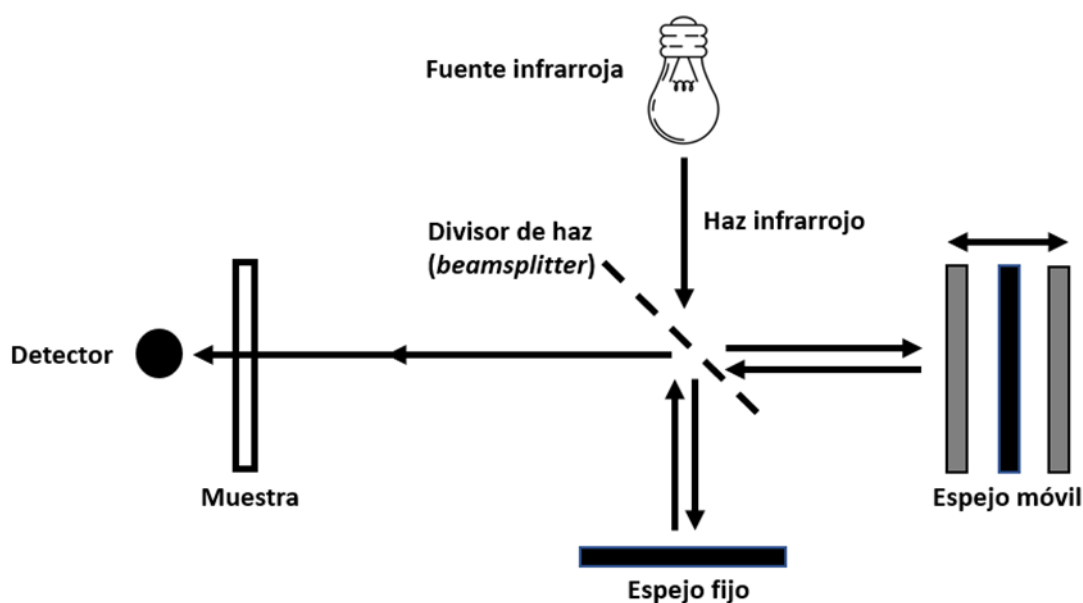


Figura 9. Partes de un FT-MIR (modificado de Smith 2011).

De forma resumida, la radiación IR de la fuente incide en el divisor de haz, que produce dos haces de aproximadamente la misma intensidad, los cuales viajan por dos vías diferentes antes de ser recombinados. Un haz golpea al espejo fijo y regresa, mientras que el otro haz golpea al espejo móvil. Un láser paralelo a la radiación IR también pasa por el interferómetro. El espejo móvil oscila a una velocidad constante, cronometrada usando la frecuencia del láser. Los dos haces se reflejan en los espejos y se recombinan en el divisor de haz. Si la distancia que recorren los dos haces es la misma, entonces las ondas de retorno están en fase y la interferencia es constructiva. Sin embargo, si el haz del espejo móvil ha recorrido una distancia diferente (mayor o menor) que el haz del espejo fijo, la recombinación resultará en una interferencia destructiva. El movimiento del espejo genera así un patrón de interferencia durante el movimiento (Smith, 2011, Bureau et al., 2019).

A continuación, el haz de infrarrojos recombinado pasa a través de la muestra antes de llegar al detector, donde se absorbe y transmite parte de la energía según la naturaleza y la concentración de las especies presentes en la muestra. Finalmente, la parte transmitida llega al detector, que registra la intensidad total. La respuesta del detector en bruto produce un

interferograma. El patrón de interferencia contiene información sobre todas las longitudes de onda que se transmiten a la vez, que es una función de la fuente, el divisor de haz, los espejos y la muestra. Esta señal es digitalizada y procesada usando un ordenador. El “desenredado” de las frecuencias de un espectro se realiza mediante el algoritmo de transformada de Fourier que le da el nombre a todo el espectrómetro.

Se obtiene así un espectro único para la muestra. Pero para ello es necesario haber obtenido previamente un espectro de referencia o *background*, el cual se obtiene sin la muestra. La relación entre estos dos proporciona el espectro propio de cada muestra. El espectro final se puede presentar como transmitancia (% T) o absorbancia.

FUENTE INFRARROJA

La fuente de radiación del espectrómetro es la que proporciona la radiación con la cual medir un espectro. Recordemos que la radiación infrarroja y el calor son lo mismo. Entonces necesitamos una fuente que esté caliente, ya que las cosas calientes emiten más radiación infrarroja que las cosas frías. La fuente utilizada en muchos FT-MIR se denomina fuente enfriada por aire (*air-cooled*) ya que regula su temperatura emitiendo calor a la atmósfera.

Las fuentes refrigeradas por aire consisten en una bobina o cinta de alambre de nicrom. El nicrom es una aleación de níquel y cromo y tiene una alta resistencia al flujo eléctrico. Como resultado, se calienta y brilla en el infrarrojo medio cuando la electricidad pasa a través de él. Otra ventaja del nicrom es que resiste la oxidación, lo cual es importante ya que este alambre caliente está expuesto a la atmósfera. Las principales ventajas de las fuentes enfriadas por aire son que son resistentes, sencillas y baratas.

INTERFERÓMETRO

En el interior de cada FT-MIR se encuentra un dispositivo óptico llamado interferómetro el cual puede medir el patrón de interferencia entre dos haces de radiación. La radiación de una fuente de infrarrojos llega al divisor de haz y se descompone en dos haces de radiación que viajan por caminos diferentes (uno hacia el espejo fijo y otro hacia el espejo móvil). Una vez que los dos haces de radiación han recorrido sus diferentes caminos, se vuelven a combinar en un único haz, y luego este sale del interferómetro hacia la muestra.

Existen varios diseños de interferómetros, pero quizás el más antiguo y más común hoy en día es el interferómetro de Michelson. Lleva el nombre de Albert Abraham Michelson quien construyó su interferómetro en la década de 1880 (Livingston, 1973) y ganó un Premio Nobel de Física por los descubrimientos que hizo con él.

Dentro del interferómetro hay un dispositivo óptico llamado divisor de haz (*beam splitter*). El divisor de haz está diseñado para transmitir parte de la radiación que incide sobre él y reflejar parte de la radiación que incide sobre él. La radiación transmitida por el divisor de haz se desplaza hacia el espejo fijo, y la radiación reflejada por el divisor de haz se desplaza hacia el espejo móvil. Una vez que los rayos de radiación se reflejan en estos espejos, regresan

al divisor de rayos, donde se combinan en un solo haz de radiación que sale del interferómetro, interactúa con la muestra y golpea el detector.

Cuando los dos haces de radiación interfieren entre sí, el interferómetro mide su patrón de interferencia, de ahí el significado de la palabra interferómetro. La adquisición de datos da como resultado un interferograma que se convierte en un espectro mediante la operación matemática denominada Transformada de Fourier.

DIVISOR DE HAZ (*BEAMSPLITTER*)

El divisor de haz está en el corazón del interferómetro. Hay que recordar que la función del divisor de haz es coger un rayo infrarrojo, dividirlo en dos y luego combinar estos haces en uno solo.

El divisor de haz en la mayoría de los FT-MIR consiste en una película delgada de germanio intercalada entre dos ventanas transparentes infrarrojas. El germanio tiene el grosor correcto para transmitir algo de radiación infrarroja y reflejar algo de radiación infrarroja. Por lo tanto, funciona como un espejo de dos vías que contiene una capa delgada de plata que es lo suficientemente gruesa como para reflejar algo de radiación, pero lo suficientemente delgada como para transmitir algo de radiación.

El propósito de las ventanas transparentes infrarrojas en un divisor de haz es apoyar y proteger la película de germanio. Muchos FT-MIR contienen divisores de haz con ventanas de bromuro de potasio (KBr). El KBr es útil porque es transparente en un amplio rango espectral, desde 400 cm^{-1} hasta el infrarrojo cercano. La razón por la que la mayoría de los FT-MIR no miden espectros por debajo de 400 cm^{-1} es porque las ventanas de KBr en el divisor de haz comienzan a absorber fuertemente por debajo de ese punto. Una desventaja del KBr es que es higroscópico, lo que significa que absorbe agua de la atmósfera. Con el tiempo, se acumulará una capa de agua adsorbida en la superficie de las ventanas de KBr, que absorberá la radiación infrarroja y reducirá la cantidad de radiación que llega al detector. Por esta razón, la humedad debe mantenerse baja dentro de un FT-MIR. Esto se puede lograr a través de un gas de purga seco o sellando y desecando el interferómetro.

En algunas aplicaciones, como en campo o en ambientes húmedos, el KBr es demasiado sensible a la humedad para ser utilizado como una ventana de divisor de haz. Una alternativa es el seleniuro de zinc (ZnSe). Este material es transparente a los rayos infrarrojos y no es higroscópico, por lo que se usa con frecuencia en FT-MIR que se usan al aire libre, en fábricas, fuera del laboratorio, etc. Sin embargo, hay dos problemas con los divisores de haz ZnSe. Primero, el ZnSe absorbe fuertemente alrededor de 700 cm^{-1} , y cualquier característica espectral debajo de esto se perderá. En segundo lugar, un divisor de haz de ZnSe encarece bastante el coste del instrumento. Otro material disponible es el yoduro de cesio (CsI). Este material es transparente hasta 200 cm^{-1} en el infrarrojo lejano y se puede usar si las muestras tienen características importantes entre 400 y 200 cm^{-1} . A pesar de ello, el CsI es muy higroscópico, y las ventanas hechas de este material deben reemplazarse con bastante frecuencia debido a la absorción excesiva de humedad.

DETECTOR

El trabajo de cualquier detector de infrarrojos es convertir la intensidad de la radiación en una señal eléctrica, generalmente un voltaje. Idealmente, los cambios en la intensidad de la radiación conducirán finalmente a cambios proporcionales en la señal eléctrica que sale del detector. En esta tarea, el detector de infrarrojos actúa como un transductor, convirtiendo una forma de energía (radiación) en otra forma de energía (impulsos eléctricos). Dado que la radiación infrarroja es lo mismo que el calor, un detector de infrarrojo puede responder a los cambios de temperatura. Por lo tanto, los materiales cuyas propiedades cambian con la temperatura son candidatos para actuar como detectores de infrarrojos.

El tipo detector determina muchas de sus propiedades importantes, incluyendo su rango de número de uso, su velocidad de respuesta y su nivel de ruido.

Los elementos del detector deben estar protegidos del entorno para que funcionen bien. Para este fin, se coloca una ventana transparente infrarroja, frecuentemente hecha del mismo material que la ventana del divisor de haz, justo enfrente del detector. Los materiales de ventana de uso común incluyen KBr y ZnSe. Hay cables conectados al elemento detector que lo conectan a la electrónica del instrumento. La señal del elemento detector pasa a través de estos cables y puede amplificarse, digitalizarse y luego enviarse al ordenador para la transformación de Fourier.

El tipo de detector más común es el que está hecho a base del material piroeléctrico sulfato de triglicina deuterado (DTGS: *Deuterated Triglycine Sulfate*). La propiedad única del DTGS es que su polarización eléctrica (la distribución de las cargas) varía con la temperatura, causando un flujo de corriente cuando cambia su temperatura. Este impulso eléctrico se mide por los contactos eléctricos colocados en la superficie del elemento DTGS. Cuando están equipados con una ventana de KBr, los detectores DTGS son sensibles desde 400 cm^{-1} hasta más de 4000 cm^{-1} y por lo tanto hacen un buen trabajo cubriendo el infrarrojo medio. También son relativamente baratos, resistentes y no requieren ningún tratamiento especial.

LÁSER

Prácticamente todos los FT-MIR contienen un láser cuya luz sigue el haz infrarrojo a través del interferómetro. Esta luz láser NO es la fuente de infrarrojos. Recordemos que un láser emite radiación en una única longitud de onda. Para medir un espectro, se requieren muchas longitudes de onda, por lo que los láseres no pueden utilizarse como fuentes FT-MIR. En su lugar, miden la diferencia de trayectoria óptica del interferómetro. La mayoría de los FT-MIR utilizan un láser de helio-neón (He-Ne) para este propósito. Después de que la luz láser sigue el rayo infrarrojo a través del interferómetro, es detectado por un detector de luz láser. Parte del rayo láser puede pasar del detector al compartimiento de la muestra, donde su apariencia se puede usar para alinear accesorios o dar una idea de dónde se encuentra el haz infrarrojo, ya que el ojo humano no puede ver en el infrarrojo medio.

Dado que el láser mide la diferencia de trayectoria óptica del interferómetro, un FT-MIR no puede medir nada sin un láser funcional. Al igual que otras fuentes de luz, los láseres se

desgastan, y por lo general, duran de 3 a 5 años. Las fuentes de alimentación del láser también se desgastan después de varios años y se reemplazan con frecuencia al mismo tiempo que el láser.

7.3. Quimiometría aplicada a la espectroscopía del infrarrojo

Como se ha comentado, tanto la espectroscopía NIR como la MIR son técnicas de cuantificación indirecta, en la que es necesario disponer de un modelo que permita relacionar el espectro medido con la concentración esperada de los analitos objetivo del estudio. Aquí por tanto juegan un papel fundamental los estudios quimiométricos. Por definición, “la quimiometría es la disciplina química que utiliza métodos matemáticos y estadísticos para diseñar o seleccionar procedimientos de medida y experimentos óptimos, y para proporcionar la máxima información química mediante el análisis de datos químicos” (Hibbert, 2016). Esta disciplina tiene su origen en el ámbito de la química, aunque también se utiliza en la biología, metabolómica, ingeniería, etc., debido a que permite trabajar con gran cantidad de datos, como ocurre en el caso de los espectros de infrarrojo o como veremos más adelante en las señales de los sensores electrónicos que se obtienen en las narices electrónicas.

En el caso de la espectroscopía infrarroja, el primer paso en el estudio quimiométrico reside en el pretratamiento de los espectros para eliminar cualquier tipo de interferencia que pueda distorsionar los datos espectrales para luego poder relacionar dichos espectros con los contenidos de los compuestos de interés, y construir de este modo los modelos. Normalmente durante el desarrollo de los modelos o justo antes se tratará de identificar la presencia de datos anómalos (*outliers*) que puedan comprometer seriamente la eficiencia de los modelos obtenidos. Su eliminación lógicamente requiere de un análisis estadístico que realmente permita identificar que se trata de datos anómalos debidos a causas incontroladas durante las evaluaciones de las muestras. Finalmente se desarrollarán los modelos de predicción a partir de una población de datos que se llama de calibrado. Con estos datos se calcula un modelo que relaciona los espectros IR con el compuesto a predecir. Para afinar este modelo de calibrado y poder determinar los errores que comete y otros parámetros de bondad de ajuste, se procede a recalcularlo remuestreando en los datos del modelo para lo que se pueden utilizar diferentes metodologías de remuestreo. Esto nos permitirá realizar la validación cruzada del mismo. No obstante, en los casos en que se disponga de bastantes muestras es mucho mejor realizar la validación del modelo de predicción con muestras no incluidas en el cálculo del modelo (ni en el calibrado ni en la validación cruzada con remuestreo).

7.3.1. Pretratamiento de datos

Cuando se obtienen los espectros de absorción de las muestras puede ocurrir que se registren ciertas distorsiones, las cuales han de reducirse o eliminarse para trabajar de forma adecuada con los espectros. Tales efectos son debidos, principalmente, a la interacción existente

entre los enlaces químicos de los diferentes compuestos de la muestra (por ejemplo, debido a los enlaces de hidrógeno intermoleculares), a la propia dispersión de la radiación sobre la muestra o distorsiones espectrales causadas por el propio equipo, como la deriva de la línea base, cambios en las longitudes de onda, ruido generado por el detector, etc. (Siesler et al., 2002; Naes et al., 2002).

De este modo, antes de la modelización, los datos espectrales a menudo pasan por diferentes pasos de preprocesamiento para minimizar la influencia de alguno de los efectos incontrolables (por ejemplo, correcciones de dispersión o de línea de base, cálculos de primera o segunda derivada con suavizado espectral o sustracción de línea recta, corrección de los efectos multiplicativos, normalización, centrado, etc.) y así poder comparar la señal de muestras disímiles.

Así pues, el objetivo de las técnicas de pretratamiento de la señal espectral es reducir, eliminar o estandarizar cualquier información irrelevante que no pueda ser manejada adecuadamente por las técnicas de regresión que veremos más adelante, sin influir en la información espectroscópica necesaria para la calibración y posterior predicción.

La elección del método de pretratamiento más apropiado depende en gran medida de la muestra, el instrumento y el propósito del análisis, así como de su disponibilidad en el software estadístico con el que se trabaje. Existe una amplia gama de métodos de preprocesamiento disponibles para este objetivo: aplicación de filtros locales a ciertas longitudes de onda, suavizado (*smoothing*) de los espectros para eliminar el ruido de fondo, estandarización dividiendo cada longitud de onda del espectro entre la desviación estándar del espectro para esa misma longitud de onda, etc. Todos ellos se explican con más detalle en los trabajos de Siesler et al. (2002), Naes et al. (2002), Nicolaï et al. (2007) y Smith (2011). Pero sin duda los más utilizados, tanto para los espectros NIR como para los espectros FT-MIR, son las transformaciones mediante el uso de las derivadas y la normalización mediante las correcciones multiplicativas.

DERIVADAS

Un método de pretratamiento previo ampliamente utilizado es el uso de la primera y la segunda derivadas, que se aplican para eliminar la deriva y la dispersión, respectivamente, de los datos espectrales. Pueden eliminar o suprimir las interferencias de fondo constantes, distinguir picos superpuestos y mejorar la resolución y sensibilidad espectral. Existen dos tipos comunes de derivadas espectrales: la diferencia finita directa y las derivadas de Savitzky-Golay.

En el primer caso, las derivadas de primer orden reducen el orden polinomial en uno, por lo que se elimina un desplazamiento constante. Transforma el término lineal en uno constante, eliminando así la inclinación lineal de la gráfica y así sucesivamente. Las segundas derivadas lo que hacen es transferir los máximos a mínimos y viceversa. Además de mejorar la resolución, el uso de las derivadas permite identificar picos débiles que no son visibles en el espectro original.

Otra forma de calcular las derivadas es mediante el método Savitzky-Golay. En este caso el algoritmo de derivatización Savitzky-Golay requiere la selección del tamaño de la ventana (ancho del filtro), el orden del polinomio y el orden de la ventana. Una forma intuitiva de entender esto es sobre la base de que la ecuación del polinomio ajustado se diferencia por el cálculo ordinario. Se pueden construir filtros adecuados a partir de los diversos coeficientes polinomiales. Sin embargo, existen algunos efectos secundarios del uso de las derivadas sobre los datos espectroscópicos, como son la pérdida de la forma original de los espectros y las reducciones de la relación señal/ruido (Siesler et al., 2002).

CORRECCIONES MULTIPLICATIVAS

Las principales fuentes de perturbaciones multiplicativas son debidas a cambios en la longitud de onda, en la sensibilidad del detector y el amplificador. Además, la dispersión de la radiación producida por la propia muestra produce desviaciones multiplicativas que dependen de la longitud de onda (Siesler et al., 2002). Existen dos algoritmos para corregir dichas perturbaciones de los espectros: la corrección de dispersión multiplicativa (*Multiplicative Scatter Correction*, MSC) y la varianza normal estándar (SNV: *Standard Normal Variate*). En ambos casos se trata de métodos de normalización.

La técnica MSC fue propuesta por primera vez por Ilari et al. (1988), para compensar el efecto de la dispersión no uniforme inducida por los diferentes tamaños de partículas, la distribución desigual y otros efectos físicos en los datos espectrales. La MSC se realiza corrigiendo cada espectro con respecto a un espectro "ideal", que se corresponde con el espectro promedio del conjunto de calibrado. La relación lineal entre cada espectro y el espectro promedio se ajusta a través del método de mínimos cuadrados. Esto sugiere que el MSC es capaz de eliminar la dispersión lineal "ideal" y tiene un buen efecto cuando la relación lineal entre la absorbancia y la concentración de la muestra es buena.

Al igual que el MSC, el objetivo de SNV es eliminar las desviaciones causadas por el tamaño de partícula y la dispersión (Barnes et al., 1989). El método supone que la absorbancia de cada punto de longitud de onda en el espectro cumple con cierta distribución, como la distribución de Gauss. Con base a esta hipótesis se calibra cada espectro. El método SNV centra cada espectro alrededor de cero al restar la media y luego divide cada valor de señal por la desviación estándar de todo el espectro.

En general, la capacidad de corrección del SNV suele ser similar a la del MSC. La única diferencia práctica entre ambas técnicas es que la SNV estandariza cada banda del espectro utilizando solo los datos de esa banda, mientras que la MSC utiliza el promedio del conjunto de todo el espectro. La elección entre una u otra técnica dependerá del instrumento y de su disponibilidad en el software (Siesler et al., 2002).

7.3.2. Modelización

Una vez pretratado el espectro, el paso siguiente es desarrollar un modelo de calibrado que permita relacionar el espectro IR con las variables analíticas de la muestra (Esbensen, 2002; Brereton, 2007). Para desarrollar el calibrado es necesario seleccionar de entre las muestras disponibles aquellas que se emplearán en el desarrollo del modelo (calibrado y validación cruzada) y las que se emplearán para validar el modelo realizando predicciones con muestras no incluidas en la primera fase. La selección de muestras es la parte más subestimada de la calibración, pero es la que tiene un mayor efecto. Cualquier modelo robusto implica la selección cuidadosa de las muestras en el conjunto de calibración y la selección de muestras para validar el modelo de calibración (Murray, 1999; Murray y Cowe, 2004; Cozzolino, 2015).

Es importante tener en cuenta que el modelo solo funcionará con precisión si las muestras, tanto del calibrado como de la predicción, pertenecen a la misma “población”. Las muestras seleccionadas para la calibración, por lo tanto, deben abarcar el mayor rango de variabilidad posible y deben de procesarse con los mismos pretratamientos (Murray y Cowe, 2004; Cozzolino, 2015).

Además, si los modelos de calibrado van a utilizarse de forma rutinaria en el futuro, lo mejor es que estos se construyan en base a cientos (incluso miles) de muestras de diferentes variedades, estadios de madurez, localizaciones y campañas (Cadet y Offmann, 1997; Bureau et al., 2009, 2013; Scibisz et al., 2011; Fragoso et al., 2011; Wilkerson et al., 2013; Rasines-Perea et al., 2015; Ayvaz et al., 2016; Aleixandre-Tudo et al., 2018).

Es cierto que existen algunos trabajos en los cuales se han desarrollado los modelos de calibrado mediante el uso de estándares sintéticos para muestras líquidas (Duarte et al., 2002; Irudayaraj y Tewari, 2003; Clark, 2016). Sin embargo, cuando lo que se pretende es analizar muestras reales de composición compleja (el patrón sintético es solo agua con algunos de los compuestos que se quieren predecir) su aplicación no es del todo efectiva, cometiéndose mayores errores.

En cualquier caso, en el desarrollo de los modelos de calibrado es necesario emplear métodos de regresión complejos.

7.3.3. Métodos de regresión

Las técnicas de regresión multivariante intentan establecer una relación entre los valores de respuesta observados, vector o matriz Y (variables Y ; atributos de interés a cuantificar) y la matriz X de datos espectrales (variables X ; espectros medidos). Existen varios algoritmos para el desarrollo de los modelos de regresión. Dentro de los modelos de regresión lineales, los más habitualmente empleados han sido la regresión lineal múltiple (*Multiple Linear Regression*, MLR), la regresión de componentes principales (*Principal Component Regression*, PCR) y la regresión parcial por mínimos cuadrados (*Partial Least Squares*, PLS). Entre ellos la metodología más popular en el desarrollo de modelos NIR y FT-MIR es la regresión PLS, ya que

los compuestos a predecir suelen encontrarse en las muestras en concentraciones muchísimo más bajas que el agua, la cual en muchos productos agrícolas representa más del 90% del peso del producto, y que también absorbe radiación IR. Por ello, una metodología que recurra a realizar regresiones de solo parte de la señal del espectro medido en cada banda con la concentración del compuesto a determinar es mucho más eficaz que las regresiones que relacionan toda la señal del espectro IR con la concentración del compuesto de interés. Además, en el caso de la MLR los modelos no funcionan bien debido a problemas por relaciones de colinealidad de los espectros que da lugar a un sobreajuste (*overfitting*). En el caso de las regresiones PCR, el método que se usa para determinar que parte de la señal del espectro se relaciona con el contenido del analito de interés es por el cálculo de variables subyacentes que expliquen la máxima variabilidad del espectro IR medido. No obstante, el hecho de que las primeras componentes expliquen la mayor parte de la variación no implica que sean las más informativas respecto a las concentraciones de los analitos objetivo de estudio (Nicolai et al., 2007) ya que, como se ha indicado, las muestras suelen tener altos contenidos en agua y además están presentes también otros compuestos que también absorben radiación IR. En el caso de las regresiones PLS, los algoritmos de cálculo seleccionan en cada banda del espectro la parte de información útil para relacionarla con el compuesto a determinar en base a la mayor covariación entre señal espectral y concentración presente del compuesto de interés.

También se han empleado métodos de regresión no lineales empleando redes neuronales artificiales (*Artificial Neural Network*, ANN) y máquinas de vectores soporte que utilizan el ajuste por mínimos cuadrados (*Least Squares Support Vector Machine*, LS-SVM). El uso de estas técnicas es mucho más reducido, pero puede considerarse cuando los datos siguen una distribución curvilínea. Las ANN en la mayor parte de los casos se han empleado con el objetivo de clasificar más que cuantificar (Guyer y Yang, 2000; Kim et al., 2000; Hahn et al., 2004). Aun así, las ANN se han empleado satisfactoriamente para predecir contenidos en muestras sólidas, como el contenido en nitrógeno en arroz (Afandi et al., 2016) o el contenido de aleurona en polvo perlado de cebada (Wold et al., 2017)

En el caso de la LS-SVM, el uso de este método semiparamétrico se ha enfocado a hacer frente a algunos de los problemas básicos de la espectroscopía IR, incluyendo el efecto de variaciones ambientales en la medición (temperatura, iluminación externa, etc.), en el instrumento (horas de funcionamiento de la lámpara, etc.) y de los cambios matriciales de la muestra, por ejemplo, en la predicción de la acidez en uva mediante NIR (Chauchard et al., 2004). Sin embargo, su aplicación en los estudios de espectroscopia en alimentos es mucho más limitada y fundamentalmente orientada a procesos de identificación. En este sentido, se dispone de modelos en pomelo (Li et al., 2016) o caqui (Khanmohammadi et al., 2014). No obstante, su uso se está popularizando en el entorno de objetos no lineales, como por ejemplo en el análisis NIR de combustibles, en el que puede presentar ventajas en aplicaciones prácticas en comparación con el uso de ANN (Balabin y Lomakina, 2011).

7.3.4. Eliminación de puntos anómalos (*outliers*)

Tras el pretratamiento y antes de la modelización o a la vez que se modeliza se debe proceder a la identificación y, en su caso, eliminación de los puntos anómalos que pueden comprometer la eficiencia de los modelos desarrollados. Estos puntos anómalos se pueden originar por diversas razones, en general no controladas, y afectan tanto a la matriz de espectros como a la matriz de valores analíticos.

Lo más habitual es que se identifiquen estos puntos durante el desarrollo del modelo para que una vez identificados y eliminados se compruebe si su presencia realmente compromete los resultados. Es bastante común identificar los puntos anómalos en la matriz de espectros empleando el estadístico T^2 de Hotelling y los residuos Q , mientras que en la matriz de valores analíticos se recurre a identificar aquellos casos en que los valores de los residuos normalizados supera el tres en valor absoluto o considerando parámetros de apalancamiento (*leverage*). En cualquier caso, siempre se debe limitar la eliminación de puntos anómalos y sólo si realmente tiene un peso muy importante en el desarrollo de la calibración del modelo de predicción.

7.3.5. Evaluación de la precisión de los modelos

Para evaluar la precisión del modelo de calibración y evitar el sobreajuste del mismo, deben aplicarse procedimientos de validación, ya que un modelo de calibración sin su posterior validación no tiene ningún sentido. Es decir, siempre podemos desarrollar un muy buen modelo, pero eso no quiere decir que lo podamos aplicar a muestras no incluidas en su desarrollo. Por esta razón, el software de desarrollo de modelos suele incluir una validación cruzada. En este caso, parte de los puntos empleados en el modelado se usan para el calibrado, pero una parte se reserva para ver cómo se comporta el modelo cuando se aplica a una muestra no incluida en el desarrollo. De esta forma, el software permite elegir las alternativas que minimizan el error cometido en la validación cruzada y permiten seleccionar el número más adecuado de variables latentes para el modelo.

El método más utilizado para la validación cruzada de los datos es el que se conoce como dejar uno fuera (*leave-one-out*). Consiste en quitar una muestra, la cual se elimina del conjunto de datos y se construye un modelo de calibración para el subconjunto restante. Las muestras extraídas se utilizan para calcular la predicción residual. El proceso se repite con otros subconjuntos hasta que cada muestra se ha omitido una vez, y al final se estima la varianza de todos los residuales de predicción. Otro de los métodos más empleados es el denominado persianas venecianas (*venetian blinds*). En este caso se construyen pequeños subgrupos del conjunto de datos, dentro de los cuales se van eliminando ordenadamente muestras. De esta manera se consiguen muchos submodelos similares con los que se puede evaluar la validez del modelo (Naes et al. 2002; Franca y Nollet, 2017). En cualquier caso, existen otras alternativas como el uso de bloques contiguos (*contiguous blocks*), que se diferencia de las persianas venecianas en que las muestras se agrupan en bloques de forma ordenada. Lógicamente, no

tiene sentido emplear este sistema si existe un orden específico en la matriz de datos, ya que los resultados se verían muy sesgados.

Con los métodos de validación cruzada, el modelo final se ha seleccionado tratando de minimizar el error cometido en las muestras de validación cruzada. Por tanto, estas muestras no dejan de haber participado en el proceso de construcción del modelo. En este sentido para evaluar realmente la eficiencia del modelo desarrollado, este se pone a prueba con un nuevo conjunto de muestras, llamado de validación o de predicción, que no han participado ni en el calibrado ni en la validación cruzada (Nicolai et al., 2007; Walsh y Kawano, 2009; Westad y Marini, 2015).

En general, el conjunto de muestras disponible se divide en dos bloques: el de calibrado y el de validación o predicción. El de calibrado, que incluye las muestras de calibrado y validación cruzada será el más numeroso, ya que el desarrollo de buenos modelos requiere el máximo número de muestras posible. El de validación o predicción será menos numeroso, pero lo suficientemente grande como para dar una buena estima del error cometido al predecir los contenidos de nuevas muestras. Suele ser habitual que alrededor del 75% de las muestras formen parte del grupo de calibrado, y el 25% restante constituyan el grupo de predicción (Murray y Cowe, 2004; Cozzolino, 2015).

Todavía se puede someter el modelo a un nivel adicional de comprobación. Se trata del uso de muestras externas. Como se ha comentado, el grupo de muestras de validación o predicción proviene del mismo ensayo del que se han obtenido las muestras empleadas en el desarrollo del modelo. ¿Pero, cómo se comportaría el modelo si se usa para predecir los contenidos de un ensayo completamente distinto? Realmente hay pocos estudios que respondan a esta pregunta porque suponen poner al modelo frente a un nivel de prueba muy elevado. En cualquier caso, es habitual que, si se lleva a cabo, los modelos se comporten mejor cuanto más parecidas son las muestras a aquellas empleadas para la construcción del modelo (Ciaccheri et al., 2018). En cualquier caso, es esperable que los errores de predicción sean mayores que los obtenidos en el grupo de predicción del ensayo empleado en el desarrollo del modelo (Scibisz et al., 2011).

Una vez establecidos los distintos grupos de muestras empleados en la construcción y validación del modelo conviene detenerse en los estadísticos empleados para comprobar la eficiencia del modelo.

En primer lugar, suele emplearse para cada grupo del coeficiente de determinación (r^2) obtenido al relacionar los contenidos reales con los predichos por el modelo. Encontraremos en este caso tres o cuatro valores, correspondientes al grupo de calibrado (r_{cal}^2), validación cruzada (r_{CV}^2) y predicción (r_P^2), y que según el estudio se complementarán con el de predicción de las muestras externas. Lógicamente se trata de maximizar estos coeficientes. Hay que tener en cuenta que un buen ajuste en el modelo de calibrado no implica que el modelo sea bueno, ya que los valores que mejor definen la eficiencia del modelo serán siempre los del grupo de predicción.

En segundo lugar, se obtienen las raíces cuadradas de los errores cuadráticos promedios (*Root Mean Squared error*, RMSE). Del mismo modo que en el caso de los coeficientes de

correlación, al comparar los datos de contenidos reales con los predichos obtendremos valores de raíz cuadrada del error cuadrático medio para el calibrado (RMSEC), la validación cruzada (RMSECV) y la predicción (RMSEP), ya sea sólo interna o interna y externa.

Este estadístico, que viene dado en las mismas unidades de medida de la variable original, proporciona una estimación del error promedio que se espera cometer en las predicciones futuras. Dichos errores se calculan promediando el resultado entre el valor predicho y el valor medido para cada muestra.

$$\text{RMSE} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_p} (\hat{y}_i - y_i)^2}{n_p}}$$

donde n_p son el número de muestras, $\hat{y}_i - y_i$ son la diferencia entre el valor predicho y el medido para cada muestra, respectivamente.

Para estos estadísticos es recomendable que los valores obtenidos sean lo más pequeños posible, pues eso significará que el modelo es más preciso, y por lo tanto, se cometerán errores más pequeños. Lógicamente la situación ideal implica de nuevo obtener el valor de RMSE más bajo posible.

En algunos estudios, en vez de emplear la raíz del error cuadrático medio se emplea el error estándar (SE). De forma general ambas medidas se relacionan en tanto que el valor de SE al cuadrado es muy próximo al valor del RMSE al cuadrado menos el sesgo (*bias*) al cuadrado, donde el sesgo representa la diferencia promedio.

Para poder contextualizar el error, ya sea expresado como RMSE o SE, es habitual calcular cuánto representa respecto a la media (%RMSE y %SE). De esta forma se pueden comparar mejor los valores obtenidos cuando el grupo de muestras empleado es distinto.

También con el objetivo de contextualizar el error, otro estadístico muy utilizado para evaluar la capacidad predictiva de un modelo es el valor del ratio de la eficiencia frente a la desviación (*Residual Prediction Deviation* o *Ratio of Standard error of Performance to Standard Deviation*, RPD). Este parámetro se define como la relación entre la desviación estándar de la variable respuesta y el SEP (Williams, 2001; Fearn, 2002).

$$\text{RPD} = \frac{\text{SD}}{\text{SEP}}$$

donde SD es la desviación estándar del grupo de muestras de validación y SEP el error estándar de predicción.

Una alternativa de uso del RPD es sustituir el SEP por RMSEP, obteniendo una visión más conservadora, pues como se ha comentado el RMSEP es necesariamente menor que el SEP.

El cualquier caso el objetivo del RPD como se ha comentado es contextualizar el error. Es decir, si el %RMSEP o %SEP es bajo no necesariamente implica que el modelo sea bueno si es parecido a la variación existente en la muestra, ya que implicaría que el poder de discriminación del modelo sería muy bajo. Por otro lado, estos valores sirven para comparar modelos obtenidos con muestras distintas.

En general se entiende que un buen modelo debería tener un valor de RPD por encima de 2 (Fearn, 2002; Vermeir et al., 2009).

De forma alternativa, también se puede calcular el ratio error a rango (*Range Error Ratio*, RER), calculado como el ratio entre el rango de los contenidos de la variable analizada en el grupo de muestras de validación o predicción y el SEP.

$$\text{RER} = \frac{\max(\text{pred}) - \min(\text{pred})}{\text{SEP}}$$

De nuevo, el SEP se puede sustituir por el RMSEP como una aproximación más conservadora. El estadístico RER suele emplearse con menos frecuencia que el RPD, ya que es muy sensible a la existencia de valores anormalmente altos o bajos en las muestras de validación. Según Williams y Norris (1987) valores de RER por encima de 10 implican muy buenos modelos, mientras que valores entre 10 y 3 representarían modelos de aplicabilidad entre buena y limitada.

Habitualmente el desarrollo de modelos PLS se basa en estudiar a la vez el calibrado y la validación cruzada, seleccionando aquellos modelos que minimizan los errores cometidos. Para ello, el cálculo de SECV o RMSECV juega un papel fundamental a la hora de seleccionar el número de variables latentes que se emplearán finalmente en el desarrollo del modelo definitivo. El objetivo siempre es reducir estos valores al mínimo, aunque siempre que no haya una sustancial mejora en el error cometido es preferible mantener al mínimo el número de variables latentes para minimizar un sobreajuste (*overfitting*) que dé lugar a modelos menos generalizables (Ballabio y Consonni, 2013).

7.4. Aplicabilidad de la espectroscopía infrarroja al estudio de la calidad en tomate

La espectroscopía NIR se ha empleado en la predicción de parámetros de calidad en numerosas especies vegetales, incluyendo la pera (Li et al., 2016), manzana (Eisenstecken et al., 2015; Liu et al., 2006; Bobelyn et al., 2010; Fan et al., 2016), pimiento (Toledo-Martín et al., 2016), sandía (Flores et al., 2008; Tamburini et al., 2017), melón (Guthrie et al., 2006; Flores et

al., 2008; Zhang et al., 2019), naranja (Wang et al., 2014; Ncama et al., 2017), fruta de la pasión (de Oliveira et al., 2014b), albaricoque (Berardinelli et al., 2010), mango (Marques et al., 2016).

La ventaja de la técnica como se ha comentado reside en poder hacer análisis no destructivos en campo empleando equipos portátiles, de forma que se puede predecir los valores de variables básicas relacionadas por ejemplo con el proceso de maduración, con el objetivo de seleccionar el momento idóneo para la cosecha.

En este sentido, la mayor parte de estudios en tomate se han concentrado en la cuantificación de parámetros básicos como el CSS o la acidez (Slaughter et al., 1996; Hong and Tsou, 1998; He et al., 2005; Shao et al., 2007; Camps et al., 2012, 2016; Deak et al., 2014; Flores et al., 2009; Clément et al., 2008 a y b; García-Martínez et al., 2012; Ecartot et al., 2013; de Oliveira et al., 2014a; Saad et al., 2016). En pocos casos se ha ido más allá para cuantificar el contenido en azúcares o ácidos individuales, como sí se hizo en el estudio de Torres et al. (2015). Por tanto, esta es una asignatura pendiente si se quiere emplear este tipo de tecnología en los programas de mejora actuales en los que el foco ya no se pone tanto en medidas globales como el CSS, sino en matices de sabor condicionados por compuestos individuales.

De forma adicional, la mayor parte de los estudios desarrollados se enfocan en la evaluación de muy poco material, con un número muy limitado de variedades, desarrollando modelos muy específicos (Arendse et al., 2018). Como se ha comentado antes, uno de los principales inconvenientes del uso de reflectancia difusa NIR en tomate radica en que, si los frutos tienen una estructura interna variable, es difícil que los modelos sean generalizables. Como apuntaba de Oliveira et al. (2014a), esta es una de las principales trabas en el caso del tomate frente a otras especies como el albaricoque.

La extensión del uso de la espectroscopía FT-MIR ha sido mucho más tardía. De nuevo, se ha aplicado al estudio de parámetros de calidad en numerosas especies, más de 40 géneros, tanto en producto fresco como procesado, y es más frecuente encontrar su uso para la cuantificación de compuestos específicos (revisado por Bureau et al., 2019).

Entre los parámetros estudiados, se ha incluido la acumulación específica de azúcares y ácidos. En los pocos casos en los que se ha comparado la eficiencia de la espectroscopía NIR y MIR con este propósito, el ajuste de los modelos MIR ha sido mejor y el error cometido más reducido (de Oliveira et al. 2014b).

En el caso del tomate la espectroscopía MIR también se ha empleado tanto para el análisis de variables básicas como los CSS, pero en este caso es más frecuente disponer de estudios sobre el contenido específico en azúcares y ácidos. En el estudio de Vermeir et al. (2009) los modelos se restringieron a 6 variedades, pero los estudios de Scibisz et al. (2011), Wilkerson et al., (2013), Ayvaz et al. (2016) y Bureau et al. (2017) se hicieron sobre la base de una gran diversidad en tomate para consumo fresco (el primero) o procesado (los últimos).

Pero entre ellos, el único estudio que aborda el uso de muestras externas para comprobar la eficiencia del modelo es el de Scibisz et al. (2011), y en este caso no lo hace para el contenido específico de azúcares y ácidos. Por otro lado, aunque Bureau et al. (2017) expresaron el interés y necesidad de contar con una validación externa, lo cierto es que no pudieron incorporar los resultados en su estudio.

8. Posibilidades de uso de los sistemas multisensor para el fenotipado rápido de características de calidad relacionadas con el aroma

El aroma juega un papel fundamental en el sabor del tomate, no sólo por su participación directa en la conformación del sabor, sino por los matices que introduce en la percepción del gusto. Descartadas las evaluaciones sensoriales en un programa de mejora, la alternativa ya se ha dicho que sería la cuantificación directa de los compuestos volátiles mediante cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG-EM). Pero de nuevo esta posibilidad quedaba descartada por el elevado coste y la imposibilidad de aplicarse a la evaluación de grandes cantidades de muestras.

Sin embargo, el aroma juega un papel fundamental en la calidad del tomate, y por tanto, este ha de tenerse en cuenta en el desarrollo de programas de mejora. En este sentido, se ha comprobado que el efecto tan negativo de introgresiones como los genes larga vida *rin* y *nor* en tomate sobre el sabor no se debe a efectos en la acumulación de azúcares y ácidos, sino que está condicionado por sus consecuencias sobre el perfil de compuestos volátiles (McGlasson et al., 1987; Baldwin et al., 2000; Kovács et al., 2009). Por otro lado, la pérdida de sabor de los materiales modernos en comparación con las variedades tradicionales se ha comprobado que está íntimamente relacionada, además de con otros factores, con la fijación de alelos con efecto negativo en la síntesis de volátiles, como consecuencia de no incluir la valoración del aroma en el desarrollo de los programas de mejora (Tieman et al., 2017).

La posibilidad de desarrollar métodos indirectos en la evaluación del aroma necesariamente se basa en la simplificación de los procesos de extracción, pero sobre todo en evitar los procesos de separación que alargan los tiempos de análisis. En este caso, uno de los problemas que conllevaría el uso de la espectroscopía es que se aplicaría en la mayor parte de equipos sobre muestra sólida o líquida, en la que los volátiles no se han formado todavía o se han escapado a la fase de vapor. Como método indirecto con más opciones destacan por tanto los sistemas multisensor, más conocidos como narices electrónicas o *e-nose*.

8.1. Aspectos generales

Los primeros estudios para medir compuestos volátiles empleando sensores fueron llevados a cabo en los años 1920 por Zwaardemaker y Hogewing (1920) midiendo la corriente eléctrica a través de una capa fina de agua. Al añadir sustancias volátiles al agua vieron como aumentaba la corriente, lo cual podría utilizarse para detectar la presencia de pequeñas cantidades de compuestos aromáticos evitando el uso del olfato. Posteriormente, en el año 1954 Hartman (1954) desarrolló el que se podría considerar el primer equipo real para medir volátiles, formado por un microelectrodo y un alambre de platino que media el flujo de corriente mediante un milivoltímetro. También fue el primero en proponer la idea de que se podrían usar conjuntamente múltiples sensores recubiertos con diferentes materiales, para así obtener diferentes respuestas a los diferentes compuestos.

Unos años más tarde, Moncrieff (1961) estudio diferentes materiales de recubrimiento, como el cloruro de polivinilo, las gelatinas y las grasas vegetales, que fueran capaces de obtener señales diferentes y complementarias para discriminar volátiles. Finalmente, dos décadas más tarde, gracias a los avances en los ordenadores y en los sensores electrónicos, Persaud y Dodd (1982) e Ikegami y Kaneyasu (1985) llevaron a cabo la construcción de las primeras narices electrónicas formadas por un conjunto heterogéneo de sensores químicos que respondían a los gases y permitían clasificar el aroma.

El término nariz electrónica se estableció poco después en el año 1988 por Gardner y Bartlett, quienes más tarde lo definieron como “un instrumento compuesto por un conjunto de sensores electrónico-químicos con especificidad parcial y un sistema de reconocimiento de patrones capaz de reconocer olores simples o complejos” (Gardner y Bartlett, 1994). Esto implica que los dispositivos de detección que tienen un solo sensor o que pueden detectar solo un compuesto o aroma no pueden, por definición, considerarse narices electrónicas.

El funcionamiento de los sistemas multisensor es similar al proceso olfativo en sí. Básicamente se trata de extraer los volátiles de una muestra y conducirlos a una cámara en la que estimularán sensores con distintas propiedades. Estas señales se compararán con las obtenidas en otras muestras dentro de una base de datos, para lo que se emplearán métodos quimiométricos. De esta forma el instrumento realizaría el papel de la nariz, la base de datos el papel de la memoria y el procedimiento quimiométrico el cerebro comparando sensaciones actuales con las ya experimentadas (Figura 10).

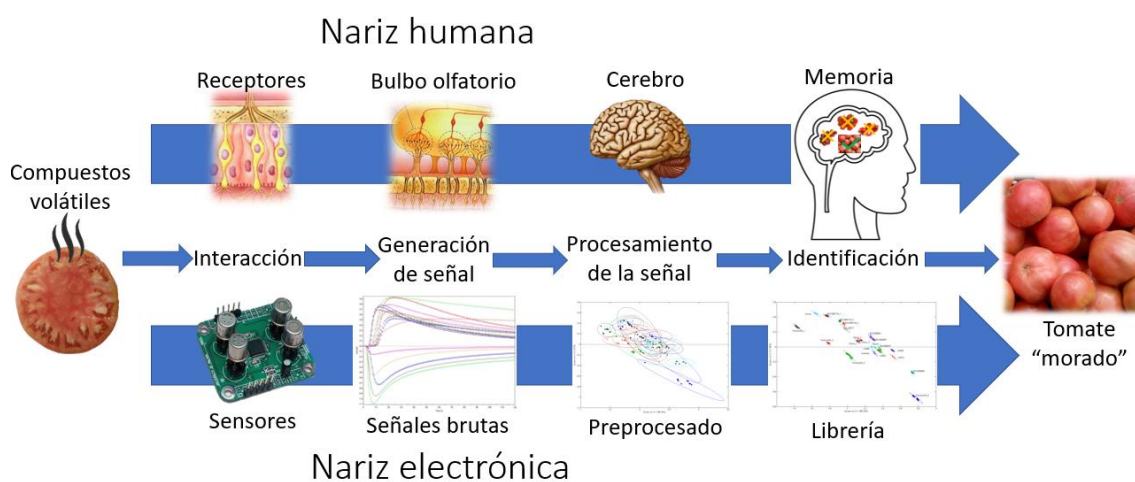


Figura 10. Esquema de similitudes entre la nariz humana y la nariz electrónica (modificado de Santos et al., 2017 y Jia et al., 2019).

Del funcionamiento de estos sistemas se deduce la importancia de contar con una base de datos lo suficientemente extensa para poder comparar muestras nuevas con las ya evaluadas y, por otra parte, la necesidad de contar con métodos quimiométricos robustos. Se trataría en este caso de métodos multivariantes que implican procedimientos similares a los descritos en el caso de espectrometría. Sólo que en este caso en lugar de un espectro completo se dispone de

la señal de un conjunto de sensores y que, en vez de relacionar con la concentración de un compuesto concreto, lo que se busca es definir la similitud con los perfiles volátiles de muestras ya conocidas de forma previa.

Desde principios de los años 90 existen estudios comparativos entre paneles de cata y la respuesta de la nariz electrónica. Esto es así, porque es necesario relacionar el perfil electrónico de una muestra nueva con el perfil electrónico evaluado en muestras anteriores que ya habían sido evaluadas sensorialmente. La similitud de un nuevo perfil electrónico con los perfiles ya existentes permitiría dar una idea del tipo de descriptores aromáticos que se podrían aplicar a la muestra evaluada.

Este proceso es en realidad extremadamente complejo y la falta de aplicabilidad del uso de los sistemas multisensor en la industria sin duda se relaciona con las dificultades de encontrar sensores robustos, selectivos y de respuesta reproducible, y en el desarrollo de algoritmos de reconocimiento de patrón que sean realmente eficaces (Loutfi et al., 2015).

8.2. Tipos de equipos

8.2.1 Sistemas tradicionales

En los sistemas tradicionales se muestrea el espacio de cabeza de un vial, que se transfiere directamente a la cámara en la que los volátiles entran en contacto con una serie de sensores (Majchrzak et al., 2018). En estos casos, por tanto, no existe separación y los sensores quedan expuestos a una mezcla compleja de volátiles. Por tanto, no es posible determinar como un compuesto determinado influye sobre un cierto sensor, lo que hace muy difícil desarrollar métodos semicuantitativos orientados a la cuantificación de compuestos individuales. Por otro lado, presentan muchos problemas de reconocimiento de patrón y de deriva electrónica. Como se comentará más adelante, la corrección de deriva es uno de los caballos de batalla de este tipo de equipos a los que se ha prestado mayor atención, ya que limita su aplicabilidad real.

8.2.2. Sistemas híbridos

Para intentar corregir los problemas de reconocimiento de patrón, a finales de los años 90 aparecieron las primeras narices electrónicas híbridas que combinan el uso de los sensores electrónicos con la espectrometría de masas y/o la cromatografía de gases ultra rápida (Loutfi et al., 2015; Majchrzak et al., 2018). Estos equipos se caracterizan por una mayor estabilidad y sensibilidad y además son capaces de separar la mezcla de la muestra, comparado con las narices electrónicas basadas en sensores únicamente (Mielle et al., 2000). Sin embargo, estas son mucho más complejas, más caras de fabricar y mantener y de mayor tamaño. Y en cualquier caso, el hecho de “perder tiempo” en la separación reduce unos de los principales atractivos de las narices electrónicas.

8.3. Ventajas e inconvenientes

La principal ventaja de los sistemas multisensor es que permiten evaluar de forma muy simple y rápida la fracción volátil de la muestra, proporcionando una “huella electrónica” única para cada muestra, de forma similar a como lo haría el panel de cata, pero de forma más objetiva y sensible, pudiendo analizar gran cantidad de muestras de forma continua y posteriormente elaborar librerías de perfiles volátiles que permitan comparar muestras.

Pero también existen una serie de inconvenientes como la necesidad de recurrir a algoritmos que permitan interpretar las complejas señales obtenidas a través de los sensores, la dificultad de analizar matrices complejas debido a la insuficiente estabilidad en las mediciones, y el alto consumo energético de algunos tipos de sensores. Pero sin duda, el mayor obstáculo para el uso rutinario de estos equipos se debe a los efectos de la deriva en los sensores.

La deriva se define como “el cambio temporal de la respuesta de los sensores cuando estos son expuestos al mismo analito bajo las mismas condiciones” (Holmberg et al., 1997). Los principales factores responsables de la deriva de los sensores son el envejecimiento, el “envenenamiento” de la superficie de los sensores y factores ambientales, incluyendo temperatura, humedad y presión atmosférica (Di Carlo y Falasconi, 2012).

En cuanto a los problemas relacionados con la deriva de los sensores de las narices electrónicas tradicionales existen diferentes métodos para corregirla, los cuales se explicarán en detalle más adelante.

8.4. Partes del equipo

Según la definición de Gardner y Bartlett (1994) cualquier sistema de nariz electrónica debe estar formado por una serie de componentes:

- un sistema de muestreo que transfiere los compuestos volátiles desde la muestra hacia el conjunto de sensores.

- una cámara donde se alojan los diferentes sensores: esta generalmente tiene una temperatura y humedad fijas, que de otra manera afectarían la adsorción de las moléculas de aroma.

- un transistor electrónico que convierte la señal química en una señal eléctrica.

- un convertidor digital que convierte la señal de eléctrica (analógica) a digital.

- un programa informático que procesa la señal digital y realiza el análisis estadístico para la clasificación o reconocimiento de la muestra.

Sistemas de muestreo en nariz electrónica

El muestreo de la fracción volátil y su transporte hasta los sensores son una parte crucial en las narices electrónicas. Las técnicas de muestreo más comunes son las de espacio de cabeza, tanto estático (SHS: *static headspace*) como dinámico (DHS: *dynamic headspace*).

La primera es la más básica ya que consiste en introducir la muestra en un vial sellado para luego extraer una pequeña parte del espacio de cabeza con una jeringa (Haddi et al., 2011), tanto de forma manual como mediante un brazo robótico automatizado. El espacio de cabeza muestreado se introduce en la cámara de sensores y cuando ya se han obtenido las diferentes lecturas de los sensores estos se purgan mediante un gas de referencia limpio (Ghosh et al., 2016; Melucci et al., 2016). En algunos casos resulta necesario incubar la muestra para que se liberen los compuestos volátiles y de este modo se enriquezca el espacio de cabeza con los analitos y así aumentar la sensibilidad. Sin embargo, tener que calentar la muestra implica más tiempo, por lo que hay que buscar un equilibrio entre este parámetro y la sensibilidad para no perder la principal ventaja del uso de la olfatometría electrónica: el análisis rápido de múltiples muestras. El único inconveniente que presenta es que solo una pequeña fracción del espacio de cabeza se puede muestrear.

La segunda, a diferencia de la anterior, permite analizar una mayor cantidad de muestra al utilizar un flujo constante de gas portador que pasa a través del espacio de cabeza de la muestra y se dirige hacia la cámara de sensores de forma continua o derivando la muestra directamente hacia los sensores (González Martín et al., 2001; Cimato et al., 2006). Este último tipo se asemeja a los sistemas de purga y trampa usados en cromatografía de gases.

Otra opción es recurrir a la microextracción en fase sólida (SPME) aunque no es típico acoplarlo a las narices electrónicas porque requiere de accesorios sofisticados y caros, y se requiere de mucho más tiempo para analizar una única muestra (Majchrzak et al., 2018).

Sensores

El conjunto de sensores de la nariz electrónica son una de las partes más importantes ya que realizan de forma equivalente las funciones de los nervios olfativos humanos. El funcionamiento de dichos sensores se basa en las interacciones que se producen cuando las moléculas gaseosas reaccionan con los materiales de recubrimiento de los diferentes sensores provocando cambios en la corriente eléctrica (Gardner y Bartlett, 1999). Además, los datos obtenidos mediante la matriz de sensores proporcionan una huella digital específica única para cada muestra (Wilson y Baietto, 2009; Shi et al., 2018). El resultado final de la detección no solo se ve afectado por el tipo de sensor sino también por la cantidad de sensores.

Hay muchos tipos diferentes de sensores y muchos tipos diferentes de materiales de revestimiento. De forma general estos se pueden clasificar en los siguientes tipos.

Tipos de sensores

La clase más utilizada de sensores son los **semiconductores de óxidos metálicos (MOS)**. Se usaron por primera vez de forma comercial en Japón en la década de 1960 en las alarmas de las viviendas para detectar gases (Schaller et al., 1998). Estos sensores están formados por un soporte cerámico en forma de tubo que contiene una resistencia de platino en espiral y están recubiertos con un óxido metálico, siendo el más utilizado el dióxido de estaño (SnO_2). La absorción de los volátiles sobre la superficie de los sensores provoca cambios en la conductividad eléctrica debido a las reacciones de combustión con las especies de oxígeno presentes en la superficie.

Existen una gran variedad de modelos comerciales disponibles siendo su coste relativamente bajo. Además, su sensibilidad es elevada (ppm) y su respuesta y recuperación es rápida. Sin embargo, estos sensores por necesidad funcionan a altas temperaturas (entre 300 y 500°C), lo cual implica un consumo de energía muy alto. También son sensibles a la humedad, lo cual afecta a la señal, y presentan deriva.

Otro tipo de sensores son los **semiconductores de óxidos metálicos basados en efecto de campo (MOSFET)**. Se descubrieron en el año 1975, cuando Lundström et al. (1975 a y b) observaron que el paladio era capaz de adsorber y disolver el hidrógeno.

Estos sensores están compuestos por tres capas: un semiconductor de silicio, un aislante de óxido de silicio y un metal catalítico a través del cual la tensión aplicada crea un campo eléctrico. Cuando los compuestos polares interactúan con el metal, el campo eléctrico cambia y este es registrado por el transistor (Schaller et al., 1998).

Las principales ventajas son su bajo coste y su tamaño pequeño, junto con su alta sensibilidad y selectividad al poder cambiar el tipo de material, su grosor y la temperatura de funcionamiento. Pero al igual que los sensores MOS, presentan problemas de deriva.

Los sensores denominados **polímeros conductores** funcionan en función de los cambios en la resistencia eléctrica causados por la adsorción de gases en la superficie del sensor, pero a diferencia de los anteriores, el material que los recubre es un monómero, siendo los más utilizados el polipirrol, la polianilina y el politiofeno (Gardner y Bartlett, 1999).

Su construcción se basa en un sustrato, generalmente silicio, un par de electrodos bañados en oro y un recubrimiento con un polímero conductor (Schaller et al., 1998).

Son interesantes debido a su alta sensibilidad, tiempos de respuesta rápidos, se sintetizan fácilmente, tienen buenas propiedades mecánicas, sus respuestas son reversibles y funcionan a temperatura ambiente. Sin embargo, una de sus principales debilidades es su alta susceptibilidad a la humedad ambiental y a la temperatura.

Los sensores de **onda acústica** utilizan como mecanismo de detección, tal y como indica su nombre, los cambios que se producen en las ondas acústicas. De ahí que su uso se remonte

hace más de 70 años en la industria de las telecomunicaciones y su primer uso para detectar compuestos químicos data del año 1979 (Wohltjen y Dessy, 1979). Estos sensores están compuestos por un sustrato piezoeléctrico, generalmente óxido de silicio (SiO_2), niobato de litio (LiNbO_3), tantalato de litio (LiTaO_3), recubierto con un material de absorción adecuado. A medida que la onda acústica se propaga a través o sobre la superficie del material de recubrimiento del sensor, cualquier cambio en las características de la trayectoria de propagación debido a la absorción de los compuestos volátiles, afecta la velocidad y/o la amplitud de la onda.

Los sensores piezoeléctricos de microbalanza de cuarzo (QMB) son los más conocidos, más antiguos y más simples (Draft, 2001). Están constituidos por un cristal de cuarzo y unos electrodos metálicos. Si mientras se aplica un voltaje a través de los dos electrodos la frecuencia de resonancia disminuye, esto será debido a que las moléculas volátiles se han absorbido sobre la superficie del sensor. Normalmente, la frecuencia de resonancia del dispositivo está en el rango de 5 a 20 MHz.

Además, existen otros dos tipos de sensores de onda acústica, cuyo funcionamiento es muy similar al anterior: los basados en dispositivos de onda acústica en masa (BAW) y los basados en dispositivos de onda acústica de superficie (SAW). En los dispositivos BAW, la onda se propaga a través del sustrato, mientras que en los dispositivos SAW, la onda se propaga sobre la superficie del sustrato (Draft, 2001). En ambos casos, las ondas están en frecuencias ultrasónicas, normalmente de 1 a 500 MHz (Gardner y Bartlett, 1999).

Todos ellos destacan por su tamaño reducido, alta sensibilidad y selectividad, tiempos de respuesta cortos y la multitud de recubrimientos distintos. A pesar de ello siguen siendo sensibles a la humedad y la temperatura, lo cual dificulta su reproducibilidad. Además, su coste de fabricación es elevado y los circuitos electrónicos necesarios para su funcionamiento son mucho más complejos, lo cual explica su baja disponibilidad comercial.

Los **sensores electroquímicos** están formados por una capa de metal precioso (como el oro combinado con carbón) cubierto sobre una membrana hidrofóbica. Su metodología de detección se basa en la oxidación o reducción electroquímica de moléculas volátiles en la superficie de un electrodo catalítico (Hobs et al., 1991). De este modo la concentración del gas se determina midiendo la corriente que fluye en los sensores. Estos son interesantes cuando se busca detectar y medir gases electroquímicamente activos (por ejemplo, para medir las concentraciones de gases tóxicos en las minas), pero no son muy sensibles al resto de compuestos volátiles, especialmente a los hidrocarburos aromáticos. Además, su disponibilidad es baja y suelen ser bastante voluminosos (Strike et al., 1999; Kiesele y Wittich, 2000). En cuanto a las ventajas decir que estos funcionan a temperatura ambiente, tienen un bajo consumo de energía, son muy sensibles y robustos, su duración es alta y además apenas se ven influenciados por la humedad (Gardner y Bartlett, 1999).

Los **sensores ópticos**, a diferencia de los anteriores, funcionan mediante medidas de modulación de la luz mediante el uso de diversas fuentes de luz como las fibras ópticas o los

fotodiodos y fotodetectores sensibles a la luz. Se han desarrollado varios tipos que miden los cambios en la absorbancia, reflectancia, la fluorescencia o la quimioluminiscencia. Estos sensores son baratos y fáciles de fabricar, y además presentan una alta sensibilidad y no se ven afectados por interferencias electrónicas. Sin embargo, su complejidad encarece su uso y el tiempo de vida de estos es muy limitado (Wilson y Baietto, 2009; Zhao et al., 2016).

Los **sensores calorimétricos o de perlas catalíticas** están compuestos por dos bobinas de platino encapsuladas en un material cerámico de alúmina, conectadas en un circuito de puente de Wheatstone. Una de estas bobinas está recubierta con un catalizador especial que promueve la oxidación (normalmente paladio, que causa y acelera la oxidación) y la otra no está recubierta, inhibiendo la oxidación y actuando como elemento de referencia. Así la corriente pasa a través de las bobinas para calentar la bobina hasta que se produce la oxidación del gas a 500-550°C. La combustión del gas eleva aún más la temperatura y aumenta la resistencia de la bobina de platino, lo que provoca un desequilibrio del puente. Este tipo de sensores presentan una respuesta y recuperación muy rápida, y una alta especificidad para los compuestos oxidados. Sin embargo, las altas temperaturas de trabajo aumentan el consumo energético y además solo son sensibles a compuestos volátiles que contienen al menos un 12% de oxígeno para la oxidación (Wilson y Baietto, 2009).

8.5. Quimiometría aplicada a los sistemas multisensor

Al igual que ocurría con los datos obtenidos mediante las técnicas de infrarrojo, los datos de salida de los sensores electrónicos de una nariz electrónica son abundantes y complejos, lo cual obliga a utilizar de nuevo la quimiometría. Además, la respuesta dada por cada uno de los sensores es diferente y las diferencias entre muestras particulares pueden ser mínimas. Por lo tanto, es necesario realizar un preprocesado a las señales y usar métodos de análisis de datos (métodos quimiométricos) adecuados para interpretar dichas señales (Dymerski et al., 2011).

Ahora el principal objetivo de los métodos de análisis de datos no es predecir el contenido de uno o varios compuestos como era el caso de las técnicas de infrarrojo. Lo que se pretende es buscar las similitudes y diferencias entre los componentes del conjunto de datos reduciendo la dimensionalidad. Esto se consigue transformando la señal de salida realizando primero un pretratamiento, y luego evaluando los datos mediante alguna metodología de análisis multivariante.

Adicionalmente, dados los problemas de deriva que sufren los sensores electrónicos, son muy importantes los métodos estadísticos de corrección de deriva.

8.5.1. Métodos para la corrección de deriva

Las diferentes soluciones propuestas para la corrección de la deriva pueden agruparse en 4 categorías, revisadas en profundidad por Di Carlo y Falasconi (2012):

a) Preprocesado de la señal de los sensores

i. Manipulación de la línea base

El método más simple para compensar la deriva, y que también se utiliza como técnica de preprocesado, consiste en transformar la señal individual de cada sensor según el valor inicial de estos (Gardner y Bartlett, 1999). Existen tres tipos de transformaciones: diferencial, relativa y fraccional. La primera resta a la señal total la línea base de cada sensor, mientras que la segunda la divide entre la línea base. La última es una combinación de las dos anteriores, pero proporcionando medidas sin dimensiones y dando una respuesta de los sensores normalizada. Sin embargo, se trata de transformaciones muy simples que no se adaptan a la realidad, ya que la deriva suele ser de tipo multiplicativo y no del tipo aditivo, con lo cual no son capaces de corregir correctamente la deriva. Y en el caso de combinar ambas transformaciones lo que ocurre es que no es capaz de corregir la deriva aditiva y en algunos casos puede aumentarla.

ii. Filtrado de dominio de frecuencia

Estos métodos se basan en eliminar aquellas partes de la señal que contienen la deriva. Para ello se presupone que la deriva de los sensores se encuentra en las bajas frecuencias, mientras que la señal de los analitos se da en las altas frecuencias. Así la señal de los sensores se descompone en las componentes de bajas y altas frecuencias, eliminando únicamente las bajas y reconstruyendo la señal resultante. Esto se consigue utilizando la transformada discreta de onda (*Discrete Wavelet Transform, DWT*) (Zuppa et al., 2007).

b) Calibraciones periódicas

Estos métodos se basan en la estimación del efecto de la deriva para posteriormente eliminarla. Esta estimación se puede realizar midiendo a lo largo del experimento el cambio que se produce en la respuesta de los sensores frente a uno o varios gases de referencia. Esta estrategia se puede aplicar tanto de forma univariada (sensor por sensor) como multivariada. Y aunque las diferentes técnicas basadas en la recalibración usando un gas de referencia pueden dar buenos resultados, es crítico elegir de forma adecuada dicho gas.

i. *Multiplicative drift correction* (MDC)

El método más sencillo de calibración univariada consiste en utilizar las respuestas de un gas de referencia para corregir la señal de las muestras. Fryder et al. (1995) y Haugen et al. (2000) propusieron modelizar las variaciones temporales de los sensores con un factor de corrección MDC obtenido al medir el gas de referencia y luego aplicando la misma corrección a las muestras reales.

Concretamente, Haugen et al. (2000) propusieron un método de recalibración en dos pasos: dentro de cada secuencia de medición para compensar la deriva a corto plazo y entre las secuencias de medición para compensar la deriva a largo plazo. Esta estrategia proporciona muy buenos resultados y actualmente se usa en algunas narices electrónicas comerciales.

Sin embargo, este método supone que la deriva es multiplicativa, lo que significa que la perturbación es proporcional al nivel de la señal, y que la respuesta de cada sensor frente al gas de referencia es lineal.

ii. Corrección de componentes

Un primer intento para corregir la deriva de forma multivariante fue el de corrección de componentes (CC) propuesto por Artursson et al. (2000). Para llevarla a cabo se pueden utilizar tanto el análisis de componentes principales, como la regresión parcial mínimo cuadrática (Artursson et al., 2000; Gutierrez-Osuna, 2000). Ambos métodos suponen que el conjunto de los sensores tiene un comportamiento similar con respecto a la deriva, y que esta tiene una dirección específica y es la misma para todas las muestras y gases de referencia. De este modo, conociendo la dirección de la deriva esta puede restarse a las muestras.

iii. *Multivariate Component deflation*

Gutierrez-Osuna (2000) propuso otra forma de corregir la deriva de forma multivariable introduciendo un conjunto de variables definidas por un vector, cuya varianza se puede atribuir a la deriva. Dichas variables puede ser el tiempo, la temperatura, la presión o la humedad. Es decir, se trata de medir la respuesta del conjunto de sensores frente al gas de referencia para eliminar la varianza que puede explicarse mediante las diferentes variables. Esto se consigue aplicando el análisis de correlación canónica o la regresión parcial mínimo cuadrática.

c) Métodos de “sintonía” (*attuning*)

Estos métodos corrigen la deriva sin utilizar muestras de calibrado/gas de referencia, basándose directamente en los datos de entrenamiento, mejorando las clasificaciones durante un período de tiempo fijo.

i. *Independent component analysis (ICA)*

Otro método para compensar la deriva que es el análisis de componentes independientes (ICA) (Di Natale et al., 2002; Kermit y Tomic, 2003; Tian et al., 2012). De manera similar al PCA, el ICA descompone la señal de los sensores en dos matrices: una de mezcla y otra independiente (Hyvärinen y Oja, 2000). Pero a diferencia del PCA, las variables latentes extraídas son estadísticamente independientes, es decir, la información contenida en un componente independiente no puede inferirse de las otras. En la práctica, esto significa que la matriz de las señales de la matriz de sensores se puede descomponer en una serie de componentes, algunos de los cuales se correlacionan con la señal analítica y otros con la deriva. Por lo tanto, los componentes independientes en su mayoría correlacionados con la deriva pueden eliminarse. Sin embargo, seleccionar las componentes a eliminar puede resultar complejo y en algunos casos imposible.

ii. *Orthogonal signal correction (OSC)*

Padilla et al. (2010) propusieron un método de “sintonización” de deriva basado en la OSC. La idea principal de OSC consiste en eliminar la varianza no correlacionada con un vector de etiqueta de clase/concentración, el cual representa un conjunto de variables dependientes. Esto se hace eliminando la información no relevante (deriva) de las señales de los sensores (matriz de variables independientes), de tal manera que solo se elimine la información ortogonal al vector (Wold et al., 1998).

No obstante, este método requiere de gran cantidad de muestras de entrenamiento que contengan una deriva significativa para poder modelarla de forma precisa. Y en cuanto se introduzcan nuevas muestras puede ocurrir que la deriva no se comporte del mismo modo, pudiendo identificar de forma incorrecta a las nuevas muestras.

d) *Métodos adaptativos*

Los métodos adaptativos para la corrección de la deriva se basan en la idea de la actualización continua de la librería de datos al ir introduciendo muestras a lo largo del tiempo. Este enfoque es muy atractivo para su uso en aplicaciones prácticas, ya que no requiere muestras de referencia más allá del conjunto de datos de calibración y no requiere mediciones a largo plazo para modelizar la deriva. De este modo, inicialmente se realiza un calibrado mediante un conjunto de muestras cuyas clases son conocidas, para calcular y optimizar el modelo de clasificación. A continuación, se utilizan nuevas muestras desconocidas para la corrección del modelo de clasificación después de que se hayan asignado a la clase correspondiente.

i. *Neural networks*

La mayoría de los métodos de corrección de deriva basados en las redes neuronales aprovechan los mapas de autoorganización de Kohonen (SOM) (Kohonen, 1990). Aunque también existe una variante ligeramente diferente que utiliza una arquitectura de red distinta que permite crear nuevas clases: la red neuronal de Teoría de la Resonancia Adaptativa (ART) (Carpenter et al., 1991).

Independientemente del tipo y la arquitectura específica de la red neuronal, todos los métodos consiguen corregir la deriva imitando el funcionamiento de las redes neuronales. Como es común en el reconocimiento de patrones, se usa una fase de entrenamiento previa para entrenar a la red neuronal, donde cada muestra cambia ligeramente la forma en que se comportan los nodos de la red. Este “aprendizaje” puede ser de forma supervisada (las clases de las muestras de entrenamiento están definidas) como no supervisada (las muestras de entrenamiento no están etiquetadas y son clasificadas por la propia red).

Cuando el entrenamiento ha sido completado ya se puede utilizar de forma rutinaria para clasificar, ya que durante el uso normal de la red esta sigue “aprendiendo” y de este modo puede corregir la deriva. La velocidad de aprendizaje debe mantenerse en un nivel bajo para evitar el ajuste excesivo del modelo (Di Carlo y Falasconi, 2012).

El uso de las redes neuronales presenta las ventajas de que son métodos autoadaptativos que dependen exclusivamente de los datos; los modelos son no lineales, lo que otorga flexibilidad para modelar las relaciones complejas que se presentan en los sensores; y por último, las redes neuronales son capaces de predecir las clasificaciones futuras.

Pero a pesar de todas estas virtudes existen varios inconvenientes como que la corrección de la deriva solo es posible si esta se produce de forma lenta, porque si hubiera una discontinuidad en la respuesta de los sensores entre exposiciones consecutivas, quedaría automáticamente el modelo de clasificación invalidado y no se produciría la adaptación. También resulta difícil y complejo establecer una velocidad de aprendizaje adecuada para mantener un nivel de aprendizaje mínimo sin sobredimensionar el modelo. Por último, el mayor impedimento es la necesidad de utilizar gran cantidad de muestras en el entrenamiento.

ii. *Evolutionary algorithms*

Se trata de otro método de corrección adaptativa de la deriva basado en el uso de algoritmos evolutivos que permite superar el problema de la discontinuidad en los datos (Di Carlo et al., 2010; 2011). La idea general es explotar las capacidades de aprendizaje de los algoritmos evolutivos para calcular un factor de corrección multiplicativo utilizado para corregir las nuevas muestras, suponiendo que a muy corto plazo la variación introducida por la deriva puede considerarse lineal en el tiempo. Este factor de corrección no es una cantidad fija, sino que se adapta continuamente para seguir la variación provocada por la deriva. Por lo tanto, la hipótesis de linealidad se asume solo dentro de una ventana de tiempo restringido (o número de mediciones).

8.5.2. Pretratamiento de la señal

Antes de realizar cualquier análisis estadístico las señales obtenidas por los sensores necesitan ser pretratadas para extraer aquella información irrelevante. Esto se consigue reduciendo la dimensionalidad, el ruido y la deriva, lo cual mejorará la posterior clasificación. Sin embargo, escoger el algoritmo adecuado de preprocesado depende de los sensores empleados (Gardner y Yinon, 2004).

En general se siguen 3 etapas de preprocesado (Gutierrez-Osuna et al., 2002):

- Manipulación de la línea base: antes que nada, hay que ajustar la señal de los sensores con respecto a la línea base. Esto se consigue restando (diferencial), dividiendo (relativa) o combinando las dos anteriores (fraccional).
- Compresión: esta segunda etapa del preprocesado busca eliminar toda aquella información irrelevante para de este modo reducir el número de datos con los que se va a trabajar. Habitualmente esto se consigue empleando un único parámetro de cada sensor, como por ejemplo la respuesta máxima.
- Normalización: es el último paso antes del análisis multivariante/reconocimiento de patrones. Su función es compensar/estandarizar las variaciones entre las muestras y entre las respuestas de los diferentes sensores.

8.5.3. Técnicas de reconocimiento de patrón

Una vez que los datos han sido recogidos por cada uno de los sensores del sistema de la nariz electrónica y estos han sido preprocesados, se necesita de algún procedimiento de postprocesado para analizar y clasificar dichos datos.

En general, los métodos de análisis de datos se suelen clasificar en métodos supervisados y métodos no supervisados, según la forma en cómo se han construido. La principal diferencia radica en que los primeros necesitan de un “entrenamiento” mediante el uso de muestras conocidas previo a su uso como técnica de clasificación.

La principal ventaja de los no supervisados es que, al no precisar una etapa previa de aprendizaje, se necesitan menos datos de entrada para obtener información significativa. Sin embargo, estos no pueden utilizarse en algoritmos de clasificación automática.

Al final escoger un método de análisis estadístico adecuado dependerá del número de objetos y sus variables, la complejidad del problema y de las capacidades computacionales del software.

Así pues, de entre la multitud de métodos para el análisis de los datos procedentes de las narices electrónicas, los más comunes son los siguientes (revisado por Majchrzak et al., 2018):

Métodos supervisados: **SVM, ANN, LDA, PLS-DA** SIMCA, k-NN, PLS, QDA, DFA

Para entrenar al modelo se necesitan los datos de entrenamiento propiamente dichos y los datos a analizar. Después se asignan clases particulares a los datos iniciales. Se suelen usar para clasificar y discriminar entre muestras al comparar las nuevas muestras con las muestras de referencia con características deseables.

Existen gran cantidad de métodos supervisados la clasificación de las muestras, de los cuales únicamente nos centraremos en los más utilizados.

LDA (*linear discriminant analysis*): técnica de clasificación probabilística donde el espacio de datos se orienta de tal manera que se maximiza la varianza entre clases y al mismo tiempo se minimiza la varianza dentro de las clases (Hai y Wang, 2006). Esto se consigue transponiendo los puntos de datos a un espacio de dimensionalidad reducida. Las clases tienen una distribución normal y una dispersión igual (González Martín et al., 2001). Las clases se determinan en base a los datos de entrenamiento (Melucci et al., 2016).

ANN (*artificial neural networks*): técnica basada en unidades computacionales interconectadas (nodos) que transforman los datos de entrada en conjuntos de valores de salida. Los nodos trabajan de forma paralela y se pueden “comunicar” entre ellos. Para clasificar los puntos de datos, la red construye un modelo basado en el conjunto de datos de entrenamiento cuyos resultados son conocidos. En esta etapa, el peso se asigna a cada conexión entre dos nodos de forma que se corresponda lo mejor posible los datos conocidos con los

objetivo (Hai y Wang, 2006). Finalmente, los datos desconocidos se introducen en la red para analizarlos con el modelo construido previamente.

SVM (*support vector machines*): técnica de aprendizaje supervisado usada para desarrollar clasificadores (Bougrini et al., 2014). Se definió por primera vez en la *Conference on Computational Learning Theory* en 1992 (Boser et al., 1992) lo que la convierte en una técnica de clasificación y predicción muy reciente. Está basada en algoritmos conocidos como “kernel methods” (Cristianini y Scholkopf, 2002). Los datos se colocan en un espacio multidimensional y se separan en clases mediante un hiperplano. La fuerza con la que dicho hiperplano separa las clases depende del margen, que es la distancia entre el hiperplano y los puntos más cercanos a él (El Barbri et al., 2008).

PLS-DA (*partial least squares discriminant analysis*): técnica de clasificación lineal fundamentada en la PLS que vimos para realizar modelos de predicción del contenido en diferentes compuestos mediante técnicas de infrarrojo. En este caso se trata de una combinación del algoritmo de regresión PLS1 (para una única variable Y dependiente) o PLS2 (para varias variables Y dependientes) junto con el análisis discriminante (DA), lo cual permite su uso como herramienta de clasificación (Ballabio y Consonni, 2013). Si en el caso de los modelos PLS de predicción mediante técnicas de infrarrojo se buscaba relacionar la variable cuantificada (Y) con los espectros (X), ahora se intenta relacionar los datos obtenidos por los sensores (X) con una etiqueta que identifica a que clase/categoría (Y) pertenece cada muestra (Brereton, 2009). La principal ventaja del PLS-DA es que la información relevante de los datos se transforma mediante las denominadas variables latentes (LV), las cuales son combinaciones lineales de las variables originales.

Métodos no supervisados: **PCA, CA**, k-Means, ICA, NMF, SVD

Estos no requieren de los datos de salida durante la etapa de aprendizaje. Trabajan construyendo grupos basándose en las propiedades estadísticas de los datos de entrada y se utilizan para reducir la dimensionalidad de los conjuntos de datos, clasificar y detectar las diferentes subclases.

Al igual que vimos para los métodos supervisados solamente veremos con detalle los métodos no supervisados más habituales.

PCA (*principal component analysis*): potente técnica de reconocimiento de patrones que representa los resultados gráficamente con las diferencias y similitudes entre los conjuntos de datos (Hai y Wang, 2006). El espacio de datos original se transforma en un sistema de coordenadas nuevo donde los vectores, o componentes principales, están alineados de tal manera que estos explican la mayor varianza y al mismo tiempo mantienen al máximo los datos iniciales (Mildner-Szkudlarz et al., 2008). La primera componente principal explica la mayor parte de la varianza entre los datos y el resto de componentes principales de forma perpendicular, las cuales cada vez contienen menos información. La PCA puede usarse para analizar, clasificar y reducir la dimensionalidad de un conjunto de datos numéricos, así como para eliminar datos redundantes. También suele usarse durante la fase de preprocesado para detectar los *outliers* (Aparicio et al., 2000).

CA (*cluster analysis*): técnica que realiza una clasificación de todo el conjunto de datos según las similitudes o distancias entre los puntos. El resultado suele representarse con un dendrograma (Haddi et al., 2013). Las distancias entre los puntos de datos individuales y el centro de cada grupo se calcula usando una matriz de covarianza agrupada dentro del grupo (Xu et al., 2016) donde cada objeto se clasifica como perteneciente al grupo más cercano a él (Huang et al., 2007). Al principio, cada objeto se asigna a su propio clúster y luego, para determinar cuándo dos o más objetos pertenecen a un solo clúster más alto, el umbral se reduce gradualmente. De esta manera, los agregados de grupos comienzan a formarse, y las diferencias entre los componentes individuales de cada grupo se hacen cada vez más pronunciadas. En ocasiones puede ocurrir que todos los objetos se fusionen en un solo grupo. Su principal aplicación es identificar subclases en grupos de objetos (Melucci et al., 2016).

8.6. Aplicabilidad de los sistemas multisensor al estudio de la calidad en tomate

Hoy en día existen multitud de aplicaciones de los sistemas multisensor o nariz electrónica para evaluar la calidad de diferentes productos agrícolas, pudiéndose citar estudios recientes aplicados a diferentes frutos. Por ejemplo, en manzanas se han utilizado las narices electrónicas para determinar el grado de daños mecánicos debidos a los golpes durante el manipulado (Ren et al., 2018); predecir cuanto tiempo llevan almacenadas, pudiendo distinguir entre frescas, semimaduras y maduras (Guohua et al., 2013); monitorizar la frescura de estas cuando son cortadas y envasadas en diferentes atmósferas (Cortellino et al., 2016) o determinar la presencia de patógenos (Ezhilan et al., 2018). Del mismo modo esta tecnología ha sido aplicada a los frutos de kiwi para determinar la calidad de estos cuando son almacenados a bajas temperaturas (Song et al., 2014; Wei y Guohua, 2015) o determinar la procedencia geográfica de estos (Ma et al., 2014). En fresas se ha estudiado la variación de la calidad al ser almacenadas a temperatura ambiente y a bajas temperaturas (Zhao et al., 2014), se ha determinado la frescura (Xu et al., 2016) y se han detectado hongos patogénicos (Pan et al., 2014). Se ha conseguido identificar 4 tipos varietales de bayas según la zona de origen (Cheng et al., 2015) y se ha determinado la calidad de las mismas (Li et al., 2015). También se ha determinado el estado de madurez de las bananas (Sanaeifar et al., 2014) y de las uvas blancas y rojas para la elaboración de mostos (Aleixandre et al., 2015). Se ha determinado la frescura el lichis (Ying et al., 2015), diferenciado entre fechas de recolección y predecir el contenido en sólidos solubles presentes en caquis del tipo persimon (Zhang et al., 2016), detectado y clasificado frutos de cítricos infestados por una plaga (Wen et al., 2019), establecido el origen geográfico de naranjas (Centonze et al., 2019) y cerezas (Longobardi et al., 2015), determinado en tiempo real del deterioro de los melocotones en la cadena de frío (Wei et al., 2018), evaluado el sabor del café (Dong et al., 2019) y clasificado fresas, limones, cerezas y sandías (Adak y Yumusak 2016).

En tomate, los sistemas multisensor han sido utilizados fundamentalmente en procesos de clasificación. En general, los estudios desarrollados hasta el momento son muy básicos y se han elaborado a partir de una diversidad vegetal muy restringida. Parte de las investigaciones

se han dedicado simplemente a clasificar las muestras en función de los tratamientos recibidos, mientras que otros tratan de comparar los resultados de las huellas de nariz electrónica con evaluaciones sensoriales, cuantificaciones CG-EM o el uso de narices híbridas con espectrometría de masas (EM).

Respecto al primer tipo de clasificaciones, Feng et al. (2018) establecieron un método para predecir la calidad postcosecha de frutos de tomate cherry almacenados a bajas temperaturas. Gómez et al. (2006) consiguieron clasificar el estado de maduración de frutos de una única variedad obtenida en una sola campaña. El mismo grupo más adelante empleó el mismo sistema para determinar el tiempo de almacenamiento, aunque con eficiencia limitada y dependiente del sistema de almacenamiento (Gómez et al., 2008).

Las evaluaciones se han realizado también en muestras procesadas, por ejemplo, validando zumos de tomate. En este marco, Mohammed-Razdari et al. (2019) utilizaron una nariz electrónica para determinar el grado de adulteración con calabaza, patata y almidón de la pasta de tomate, obteniendo las mejores clasificaciones usando los métodos PLS y PCA. Hong et al. (2015) evaluaron la frescura del zumo obtenido de una única variedad de tomate cherry mediante sistemas semi-supervisados, logrando clasificaciones del nivel de calidad del zumo bastante buenas, empleando una cantidad limitada de muestras de entrenamiento del sistema. Aunque pusieron en evidencia la mayor eficiencia que implica disponer de más muestras en el calibrado. También utilizando zumo de tomate cherry, Hong y Wang (2014) concluyeron que para la identificación de contaminación del zumo por extractos sobremaduros era necesario complementar los datos de la huella electrónica de la nariz con los procedentes de una lengua electrónica. La mayor eficiencia de los sistemas de datos combinados, en este caso fisicoquímicos y de nariz, también fue puesta de relieve por Xu et al. (2018) al evaluar el efecto de diferentes tratamientos postcosecha. Por su parte, Concina et al. (2009) consiguieron detectar la presencia de contaminación microbiológica en tomates pelados enlatados, aunque sin poder diferenciar entre el tipo de contaminación (bacterias, levaduras u hongos).

Respecto al segundo tipo de estudios, más complejo en los que se relacionan los datos obtenidos a partir de distintos sistemas, de nuevo la diversidad vegetal evaluada ha sido limitada. En este sentido, Huang et al. (2018) evaluaron la calidad de un cultivar de tomate durante el almacenamiento, pudiendo reconocer diferentes estados de madurez y predecir su dureza, aunque los mejores resultados se obtuvieron al combinar los datos de la nariz electrónica con los de la visión por ordenador. Sinesio et al. (2000) partieron de un único material vegetal, pero obtenido en sistemas de cultivo convencional o ecológico y en diferentes estados de conservación, incluyendo frutos afectados por enfermedades. En él se obtuvieron ciertas similitudes entre los patrones de reconocimiento sensoriales y los basados en nariz electrónica, elaborados mediante PCA. Otras investigaciones han estudiado la correlación entre patrones de reconocimiento de nariz electrónica con o sin espectrometría de masas y de cuantificación mediante cromatografía de gases. Berna et al. (2004), empleando dos cultivares y distintos tipos de almacenamiento, reconocieron problemas para clasificar muestras de cada variedad atendiendo solo a dos dimensiones, siendo el sistema híbrido el más eficiente.

Maul et al. (2000) también compararon datos de cromatografía con el perfil electrónico y con panel de catas, a partir de muestras de dos cultivares. En este caso se analizaba el efecto

de la temperatura de conservación sobre el perfil aromático y se observaron ciertas relaciones entre las evaluaciones sensoriales y las huellas electrónicas, observándose un efecto negativo del almacenamiento a baja temperatura (10°C) sobre el perfil aromático de los frutos. Pero hasta el momento, uno de los estudios que abarcó el uso de máxima diversidad fue el desarrollado por Berna et al. (2005) que incluyó ocho variedades de tomate evaluadas a distintos tiempos de conservación. Para ello compararon los resultados de evaluación sensorial, CG con los de una nariz electrónica estándar o híbrida. En este caso el panel sensorial fue capaz de discriminar cultivares pero no fechas de almacenamiento, la nariz electrónica estándar no discriminó cultivares pero si días de almacenamiento, mientras que con los datos de CG-EM y nariz híbrida sí que se obtuvieron buenas clasificaciones en ambos factores.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abuajah, C. I., Ogbonna, A. C., & Osuji, C. M. (2015). Functional components and medicinal properties of food: a review. *Journal of food science and technology*, 52(5), 2522-2529.
- Adak, M., & Yumusak, N. (2016). Classification of E-nose aroma data of four fruit types by ABC-based neural network. *Sensors*, 16(3), 304.
- Adalid, A. M., Herrero-Martínez, J. M., Roselló, S., Maquieira, A., & Nuez, F. (2007). Fast determination of prominent carotenoids in tomato fruits by CEC using methacrylate ester-based monolithic columns. *Electrophoresis*, 28(22), 4120-4127.
- Afandi, S. D., Herdiyeni, Y., Prasetyo, L. B., Hasbi, W., Arai, K., & Okumura, H. (2016). Nitrogen content estimation of rice crop based on Near Infrared (NIR) reflectance using Artificial Neural Network (ANN). *Procedia Environmental Sciences*, 33, 63-69.
- Agius, C., von Tucher, S., Poppenberger, B., & Rozhon, W. (2018). Quantification of sugars and organic acids in tomato fruits. *MethodsX*, 5, 537-550.
- Aleixandre, M., Santos, J., Sayago, I., Cabellos, J., Arroyo, T., & Horrillo, M. (2015). A wireless and portable electronic nose to differentiate musts of different ripeness degree and grape varieties. *Sensors*, 15(4), 8429-8443.
- Aleixandre-Tudo, J. L., Nieuwoudt, H., Aleixandre, J. L., & du Toit, W. (2018). Chemometric compositional analysis of phenolic compounds in fermenting samples and wines using different infrared spectroscopy techniques. *Talanta*, 176, 526-536.
- Aparicio, R., Rocha, S. M., Delgadillo, I., & Morales, M. T. (2000). Detection of rancid defect in virgin olive oil by the electronic nose. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(3), 853-860.
- Arendse, E., Fawole, O. A., Magwaza, L. S., & Opara, U. L. (2018). Non-destructive prediction of internal and external quality attributes of fruit with thick rind: A review. *Journal of Food Engineering*, 217, 11-23.
- Artursson, T., Eklöv, T., Lundström, I., Mårtensson, P., Sjöström, M., & Holmberg, M. (2000). Drift correction for gas sensors using multivariate methods. *Journal of chemometrics*, 14(5-6), 711-723.
- Averett L. A., Griffiths, P. R., & Nishikida, K. (2008). Effective path length in attenuated total reflection spectroscopy. *Analytical chemistry*, 80(8), 3045-3049.
- Ayvaz, H., Sierra-Cadavid, A., Aykas, D. P., Mulqueeny, B., Sullivan, S., & Rodriguez-Saona, L. E. (2016). Monitoring multicomponent quality traits in tomato juice using portable mid-infrared (MIR) spectroscopy and multivariate analysis. *Food Control*, 66, 79-86.
- Balabin, R. M., & Lomakina, E. I. (2011). Support vector machine regression (SVR/LS-SVM)—an alternative to neural networks (ANN) for analytical chemistry? Comparison of nonlinear methods on near infrared (NIR) spectroscopy data. *Analyt*, 136(8), 1703-1712.
- Baldwin, E. A., Scott, J. W., Shewmaker, C. K., & Schuch, W. (2000). Flavor trivia and tomato aroma: biochemistry and possible mechanisms for control of important aroma components. *HortScience*, 35(6), 1013-1022.

- Ballabio, D., & Consonni, V. (2013). Classification tools in chemistry. Part 1: linear models. PLS-DA. *Analytical Methods*, 5(16), 3790-3798.
- Barnes, R. J., Dhanoa, M. S., & Lister, S. J. (1989). Standard normal variate transformation and de-trending of near-infrared diffuse reflectance spectra. *Applied spectroscopy*, 43(5), 772-777.
- Barrantes, W., López-Casado, G., García-Martínez, S., Alonso, A., Rubio, F., Ruiz, J. J., ... & Monforte, A. J. (2016). Exploring new alleles involved in tomato fruit quality in an introgression line library of *Solanum pimpinellifolium*. *Frontiers in plant science*, 7, 1172.
- Barrett, D. M., Beaulieu, J. C., & Shewfelt, R. (2010). Color, flavor, texture, and nutritional quality of fresh-cut fruits and vegetables: desirable levels, instrumental and sensory measurement, and the effects of processing. *Critical reviews in food science and nutrition*, 50(5), 369-389.
- Bartoszewski, G., Niedziela, A., Szwacka, M., & Niemirowicz-Szczytt, K. (2003). Modification of tomato taste in transgenic plants carrying a thaumatin gene from *Thaumatococcus daniellii* Benth. *Plant Breeding*, 122(4), 347-351.
- Bauer, R., Nieuwoudt, H., Bauer, F. F., Kossman, J., Koch, K. R., & Esbensen, K. H. (2008). FTIR spectroscopy for grape and wine analysis. *Analytical Chemistry*, 80, 1371-1379.
- Baxter, C. J., Carrari, F., Bauke, A., Overy, S., Hill, S. A., Quick, P. W., ... & Sweetlove, L. J. (2005). Fruit carbohydrate metabolism in an introgression line of tomato with increased fruit soluble solids. *Plant and Cell Physiology*, 46(3), 425-437.
- Beckmann, M. Z., Duarte, G. R. B., Paula, V. A. D., Mendez, M. E. G., & Peil, R. M. N. (2006). Solar radiation measured in protected ambient with tomato culture in summer-autumn seasons in Rio Grande do Sul State. *Ciência Rural*, 36(1), 86-92.
- Beltran, J., Serrano, E., López, F. J., Peruga, A., Valcarcel, M., & Rosello, S. (2006). Comparison of two quantitative GC-MS methods for analysis of tomato aroma based on purge-and-trap and on solid-phase microextraction. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 385(7), 1255.
- Benard, C., Gautier, H., Bourgaud, F., Grasselly, D., Navez, B., Caris-Veyrat, C., ... & Genard, M. (2009). Effects of low nitrogen supply on tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit yield and quality with special emphasis on sugars, acids, ascorbate, carotenoids, and phenolic compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(10), 4112-4123.
- Berardinelli, A., Cevoli, C., Silaghi, F. A., Fabbri, A., Ragni, L., Giunchi, A., & Bassi, D. (2010). FT-NIR Spectroscopy for the Quality Characterization of Apricots (*Prunus Armeniaca* L.). *Journal of food science*, 75(7), E462-E468.
- Berna, A. Z., Buysens, S., Di Natale, C., Grün, I. U., Lammertyn, J., & Nicolai, B. M. (2005). Relating sensory analysis with electronic nose and headspace fingerprint MS for tomato aroma profiling. *Postharvest biology and technology*, 36(2), 143-155.
- Berna, A. Z., Lammertyn, J., Saevels, S., Di Natale, C., & Nicolai, B. M. (2004). Electronic nose systems to study shelf life and cultivar effect on tomato aroma profile. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 97(2-3), 324-333.

- Blaesing, D., Murray, A., Schulz, M., & Stewart, M. (2004, November). Nutrient management for high soluble solids production in Australian processing tomatoes. In *IX International Symposium on the Processing Tomato 724* (pp. 75-83).
- Blanco, M., & Villarroya, I. N. I. R. (2002). NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *21*(4), 240-250.
- Bobelyn, E., Serban, A. S., Nicu, M., Lammertyn, J., Nicolai, B. M., & Saeys, W. (2010). Postharvest quality of apple predicted by NIR-spectroscopy: Study of the effect of biological variability on spectra and model performance. *Postharvest biology and technology*, *55*(3), 133-143.
- Boser, B. E., Guyon, I. M., & Vapnik, V. N. (2003). A training algorithm for optimal margin classifiers. In *Proceedings of the 5th Annual ACM Workshop on Computational Learning Theory* (pp. 144-152).
- Bougrini, M., Tahri, K., Haddi, Z., Saidi, T., El Bari, N., & Bouchikhi, B. (2014). Detection of adulteration in argan oil by using an electronic nose and a voltammetric electronic tongue. *Journal of Sensors*, 2014.
- Brauss, M. S., Linforth, R. S., & Taylor, A. J. (1998). Effect of variety, time of eating, and fruit-to-fruit variation on volatile release during eating of tomato fruits (*Lycopersicon esculentum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*(6), 2287-2292.
- Brereton, R. G. (2007). *Applied chemometrics for scientists*. John Wiley & Sons.
- Brereton, R. G. (2009). *Chemometrics for pattern recognition*. John Wiley & Sons.
- Bruhn, C. M., Feldman, N., Garlitz, C., Harwood, J., Ivans, E., Marshall, M., ... & Williamson, E. (1991). Consumer perceptions of quality: apricots, cantaloupes, peaches, pears, strawberries, and tomatoes. *Journal of Food Quality*, *14*(3), 187-195.
- Bucheli, P., Lopez, J., Voirol, E., Petiard, V., Fulton, T. M., & Tanksley, S. D. (2001). Analysis of quantitative trait loci for flavor and compositional and technological parameters linked to tomato quality in advanced backcrosses of wild tomato species to the cultivated tomato. *Acta horticulturae*.
- Bucheli, P., Voirol, E., de la Torre, R., López, J., Rytz, A., Tanksley, S. D., & Pétiard, V. (1999). Definition of nonvolatile markers for flavor of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as tools in selection and breeding. *Journal of agricultural and food chemistry*, *47*(2), 659-664.
- Bureau, S., Cozzolino, D., & Clark, C. J. (2019). Contributions of Fourier-transform mid infrared (FT-MIR) spectroscopy to the study of fruit and vegetables: A review. *Postharvest biology and technology*, *148*, 1-14.
- Bureau, S., Quilot-Turion, B., Signoret, V., Renaud, C., Maucourt, M., Bancel, D., & Renard, C. M. (2013). Determination of the composition in sugars and organic acids in peach using mid infrared spectroscopy: comparison of prediction results according to data sets and different reference methods. *Analytical chemistry*, *85*(23), 11312-11318.
- Bureau, S., Reling, P., Bogé, M., Garcia, C., Renard, C. M. G. C., Giovanazzo, R., & Page, D. (2017). Rapid characterization of industry-type tomato using mid-infrared spectroscopy. In *XIV International Symposium on Processing Tomato 1159* (pp. 183-188).

- Bureau, S., Ruiz, D., Reich, M., Gouble, B., Bertrand, D., Audergon, J. M., & Renard, C. M. (2009). Application of ATR-FTIR for a rapid and simultaneous determination of sugars and organic acids in apricot fruit. *Food Chemistry*, 115(3), 1133-1140.
- Bureau, S., Ścibisz, I., Le Bourvellec, C., & Renard, C. M. (2012). Effect of sample preparation on the measurement of sugars, organic acids, and polyphenols in apple fruit by mid-infrared spectroscopy. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(14), 3551-3563.
- Burns, D. A., & Ciurczak, E. W. (Eds.). (2007). *Handbook of near-infrared analysis*. CRC press.
- Buttery, R. G., & Ling, L. C. (1993). Volatile components of tomato fruit and plant parts. *Bioactive volatile compounds from plants*, 525, 23-34.
- Cadet, F., & Offmann, B. (1997). Direct spectroscopic sucrose determination of raw sugar cane juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(1), 166-171.
- Caliman, F. R. B., Silva, D. J. H. D., Stringheta, P. C., Fontes, P. C. R., Moreira, G. R., & Mantovani, E. C. (2010). Quality of tomatoes grown under a protected environment and field conditions. *Idesia*, 28(2).
- Camps, C., Deltheil, L., Gilli, C., & Carlen, C. (2016). Using the soluble solids accumulation in tomatoes from fruit setting until harvest for the construction of a predictive model by hand-held NIR Spectroscopy. In *XXIX International Horticultural Congress on Horticulture: Sustaining Lives, Livelihoods and Landscapes (IHC2014): 1119* (pp. 321-328).
- Camps, C., Simone, C., & Gilli, C. (2012). Assessment of tomato quality using portable NIR spectroscopy and PLSR with wavelengths selection. In *XXVIII International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People (IHC2010): International Symposium on 936* (pp. 437-442).
- Canene-Adams, K., Campbell, J. K., Zaripheh, S., Jeffery, E. H., & Erdman Jr, J. W. (2005). The tomato as a functional food. *The Journal of nutrition*, 135(5), 1226-1230.
- Capel, C., Del Carmen, A. F., Alba, J. M., Lima-Silva, V., Hernández-Gras, F., Salinas, M., ... & Granell, A. (2015). Wide-genome QTL mapping of fruit quality traits in a tomato RIL population derived from the wild-relative species *Solanum pimpinellifolium* L. *Theoretical and applied genetics*, 128(10), 2019-2035.
- Carpenter, G. A., Grossberg, S., & Reynolds, J. H. (1991). ARTMAP: Supervised real-time learning and classification of nonstationary data by a self-organizing neural network. *Neural networks*, 4(5), 565-588.
- Casals, J., Pascual, L., Cañizares, J., Cebolla-Cornejo, J., Casañas, F., & Nuez, F. (2011). The risks of success in quality vegetable markets: Possible genetic erosion in Marmande tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) and consumer dissatisfaction. *Scientia Horticulturae*, 130(1), 78-84.
- Causse, M., Damidaux, R., & Rousselle, P. (2006). Traditional and enhanced breeding for quality traits in tomato. *Genetic improvement of Solanaceous crops*, 2, 153-192.
- Causse, M., Friguet, C., Coiret, C., Lépicier, M., Navez, B., Lee, M., ... & Grandillo, S. (2010). Consumer preferences for fresh tomato at the European scale: a common segmentation on taste and firmness. *Journal of Food Science*, 75(9), S531-S541.

- Causse, M., Saliba-Colombani, V., Lecomte, L., Duffe, P., Rousselle, P., & Buret, M. (2002). QTL analysis of fruit quality in fresh market tomato: a few chromosome regions control the variation of sensory and instrumental traits. *Journal of experimental botany*, 53(377), 2089-2098.
- Causse, M., Saliba-Colombani, V., Lesschaeve, I., & Buret, M. (2001). Genetic analysis of organoleptic quality in fresh market tomato. 2. Mapping QTLs for sensory attributes. *Theoretical and Applied Genetics*, 102(2-3), 273-283.
- Cebolla, J. y Nuez, F. (2005). Mejora genética de variedades tradicionales de tomate: un paso hacia la recuperación de su cultivo. *Actas Portuguesas de Horticultura* 4: 62-68.
- Cebolla-Cornejo, J., Roselló, S., & Nuez, F. (2013). Selection of tomato rich in nutritional terpenes. *Natural products: phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes*, 2853-2881.
- Cebolla-Cornejo, J., Roselló, S., Valcárcel, M., Serrano, E., Beltrán, J., & Nuez, F. (2011). Evaluation of genotype and environment effects on taste and aroma flavor components of Spanish fresh tomato varieties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(6), 2440-2450.
- Cebolla-Cornejo, J., Soler, S., & Nuez, F. (2012). Genetic erosion of traditional varieties of vegetable crops in Europe: tomato cultivation in Valencia (Spain) as a case study. *International Journal of Plant Production*, 1(2), 113-128.
- Cebolla-Cornejo, J., Valcárcel, M., Herrero-Martínez, J. M., Roselló, S., & Nuez, F. (2012). High efficiency joint CZE determination of sugars and acids in vegetables and fruits. *Electrophoresis*, 33(15), 2416-2423.
- Cen, H., & He, Y. (2007). Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. *Trends in Food Science & Technology*, 18(2), 72-83.
- Centonze, V., Lippolis, V., Cervellieri, S., Damascelli, A., Casiello, G., Pascale, M., ... & Longobardi, F. (2019). Discrimination of geographical origin of oranges (*Citrus sinensis* L. Osbeck) by mass spectrometry-based electronic nose and characterization of volatile compounds. *Food chemistry*, 277, 25-30.
- Chassy, A. W., Bui, L., Renaud, E. N., Van Horn, M., & Mitchell, A. E. (2006). Three-year comparison of the content of antioxidant microconstituents and several quality characteristics in organic and conventionally managed tomatoes and bell peppers. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(21), 8244-8252.
- Chauchard, F., Cogdill, R., Roussel, S., Roger, J. M., & Bellon-Maurel, V. (2004). Application of LS-SVM to non-linear phenomena in NIR spectroscopy: development of a robust and portable sensor for acidity prediction in grapes. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 71(2), 141-150.
- Chen, G. P., Wilson, I. D., Kim, S. H., & Grierson, D. (2001). Inhibiting expression of a tomato ripening-associated membrane protein increases organic acids and reduces sugar levels of fruit. *Planta*, 212(5-6), 799-807.
- Cheng, H., Chen, J., Chen, S., Wu, D., Liu, D., & Ye, X. (2015). Characterization of aroma-active volatiles in three Chinese bayberry (*Myrica rubra*) cultivars using GC-MS-olfactometry

- and an electronic nose combined with principal component analysis. *Food Research International*, 72, 8-15.
- Chengappa, S., Guilleroux, M., Phillips, W., & Shields, R. (1999). Transgenic tomato plants with decreased sucrose synthase are unaltered in starch and sugar accumulation in the fruit. *Plant molecular biology*, 40(2), 213-221.
- Chetelat, R. T., DeVerna, J. W., & Bennett, A. B. (1995a). Introgression into tomato (*Lycopersicon esculentum*) of the *L. chmielewskii* sucrose accumulator gene (*sucr*) controlling fruit sugar composition. *Theoretical and applied genetics*, 91(2), 327-333.
- Chetelat, R. T., DeVerna, J. W., & Bennett, A. B. (1995b). Effects of the *Lycopersicon chmielewskii* sucrose accumulator gene (*sucr*) on fruit yield and quality parameters following introgression into tomato. *Theoretical and applied genetics*, 91(2), 334-339.
- Chetelat, R. T., Klann, E., DeVerna, J. W., Yelle, S., & Bennett, A. B. (1993). Inheritance and genetic mapping of fruit sucrose accumulation in *Lycopersicon chmielewskii*. *The Plant Journal*, 4(4), 643-650.
- Chong, M. F. F., Macdonald, R., & Lovegrove, J. A. (2010). Fruit polyphenols and CVD risk: a review of human intervention studies. *British Journal of Nutrition*, 104(S3), S28-S39.
- Ciaccheri, L., Tuccio, L., Mencaglia, A. A., Sikorska-Zimny, K., Hallmann, E., Kowalski, A., ... & Agati, G. (2018). Prediction Models for Assessing Lycopene in Open-Field Cultivated Tomatoes by Means of a Portable Reflectance Sensor: Cultivar and Growing-Season Effects. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(18), 4748-4757.
- Cimato, A., Monaco, D. D., Distante, C., Epifani, M., Siciliano, P., Taurino, A. M., ... & Sani, G. (2006). Analysis of single-cultivar extra virgin olive oils by means of an Electronic Nose and HS-SPME/GC/MS methods. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 114(2), 674-680.
- Clark, C. J. (2016). Fast determination by Fourier-transform infrared spectroscopy of sugar-acid composition of citrus juices for determination of industry maturity standards. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 44(1), 69-82.
- Clément, A., Dorais, M., & Vernon, M. (2008a). Multivariate approach to the measurement of tomato maturity and gustatory attributes and their rapid assessment by Vis-NIR Spectroscopy. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(5), 1538-1544.
- Clément, A., Dorais, M., & Vernon, M. (2008b). Nondestructive measurement of fresh tomato lycopene content and other physicochemical characteristics using visible-NIR spectroscopy. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(21), 9813-9818.
- Colla, G., Battistelli, A., Moscatello, S., Proietti, S., Casa, R., Cascio, B. L., & Leoni, C. (2001). Effects of reduced irrigation and nitrogen fertigation rate on yield, carbohydrate accumulation, and quality of processing tomatoes. *Acta Horticulturae*, 187-196.
- Concina, I., Falasconi, M., Gobbi, E., Bianchi, F., Musci, M., Mattarozzi, M., ... & Sberveglieri, G. (2009). Early detection of microbial contamination in processed tomatoes by electronic nose. *Food Control*, 20(10), 873-880.
- Cortellino, G., Gobbi, S., & Rizzolo, A. (2016). Monitoring shelf life of fresh-cut apples packed in different atmospheres by electronic nose. *Acta Horticulturae*, 1120, 71-78.

- Cozzolino, D. (2015). Sample presentation, sources of error and future perspectives on the application of vibrational spectroscopy in the wine industry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(5), 861-868.
- Cristianini, N., & Shawe-Taylor, J. (2000). *An introduction to support vector machines and other kernel-based learning methods*. Cambridge university press.
- Davidovich-Rikanati, R., Sitrit, Y., Tadmor, Y., Iijima, Y., Bilenko, N., Bar, E., ... & Pichersky, E. (2007). Enrichment of tomato flavor by diversion of the early plastidial terpenoid pathway. *Nature biotechnology*, 25(8), 899.
- Davies, A. M. C. (2000). William Herschel and the discovery of near infrared energy. *NIR news*, 11(2), 3-5.
- Davies, J. N. (1966a). Occurrence of sucrose in the fruit of some species of *Lycopersicon*. *Nature*, 209, 640-641.
- Davies, J. N. (1966b). Changes in the non-volatile organic acids of tomato fruit during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 17(9), 396-400.
- Davies, J. N., & Kempton, R. J. (1975). Changes in the individual sugars of tomato fruit during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 26(8), 1103-1110.
- Davies, J. N., Hobson, G. E. (1981). The constituents of tomato fruit—the influence of environment, nutrition, and genotype. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 15(3), 205-280.
- de Oliveira, G. A., Bureau, S., Renard, C. M. G. C., Pereira-Netto, A. B., & de Castilhos, F. (2014a). Comparison of NIRS approach for prediction of internal quality traits in three fruit species. *Food Chemistry*, 143, 223-230.
- de Oliveira, G. A., de Castilhos, F., Renard, C. M. G. C., & Bureau, S. (2014b). Comparison of NIR and MIR spectroscopic methods for determination of individual sugars, organic acids and carotenoids in passion fruit. *Food research international*, 60, 154-162.
- Deak, K. J., Szigedi, T., Palotas, G., Daood, H. G., & Helyes, L. (2014, June). Determination of Brix, lycopene, β -carotene and total carotenoid content of processing tomatoes using near infrared spectroscopy. In *XIII International Symposium on Processing Tomato 1081* (pp. 253-258).
- Di Carlo, S., & Falasconi, M. (2012). Drift correction methods for gas chemical sensors in artificial olfaction systems: techniques and challenges. In *Advances in Chemical Sensors*. IntechOpen.
- Di Carlo, S., Falasconi, M., Sánchez, E., Scionti, A., Squillero, G., & Tonda, A. (2010, April). Exploiting evolution for an adaptive drift-robust classifier in chemical sensing. In *European Conference on the Applications of Evolutionary Computation* (pp. 412-421). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Di Carlo, S., Falasconi, M., Sánchez, E., Scionti, A., Squillero, G., & Tonda, A. (2011). Increasing pattern recognition accuracy for chemical sensing by evolutionary based drift compensation. *Pattern Recognition Letters*, 32(13), 1594-1603.

- Di Natale, C., Martinelli, E., & D'Amico, A. (2002). Counteraction of environmental disturbances of electronic nose data by independent component analysis. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 82(2-3), 158-165.
- Dinar, M. (1981). The relationship between starch accumulation and soluble solids content in tomato fruits. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 106, 415-416.
- Dong, W., Hu, R., Long, Y., Li, H., Zhang, Y., Zhu, K., & Chu, Z. (2019). Comparative evaluation of the volatile profiles and taste properties of roasted coffee beans as affected by drying method and detected by electronic nose, electronic tongue, and HS-SPME-GC-MS. *Food chemistry*, 272, 723-731.
- Dorais, M., Ehret, D. L., & Papadopoulos, A. P. (2008). Tomato (*Solanum lycopersicum*) health components: from the seed to the consumer. *Phytochemistry Reviews*, 7(2), 231.
- Dorais, M., Papadopoulos, A. P., & Gosselin, A. (2002). Greenhouse tomato fruit quality: the influence of environmental and cultural factors. *Hortic. Rev*, 26, 239-319.
- Dorais, M., Papadopoulos, A.P., Gosselin, A., (2001). Greenhouse tomato fruit quality: the influence of environmental and cultural factors. *Hortic. Rev.* 26, 239-319.
- Dorst, J.C.E.A. (1946). Een en twintigste beschrijvende rassenlijst voor landbouwgewassen. Wageningen: Rijkscommissie voor de samenstelling van de rassenlijst voor landbouwgewassen, Wageningen, 221 pp.
- Drafts, B. (2001). Acoustic wave technology sensors. *IEEE Transactions on microwave theory and techniques*, 49(4), 795-802.
- Duarte, I. F., Barros, A., Delgadillo, I., Almeida, C., & Gil, A. M. (2002). Application of FTIR spectroscopy for the quantification of sugars in mango juice as a function of ripening. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(11), 3104-3111.
- Dudareva, N., & Pichersky, E. (2008). Metabolic engineering of plant volatiles. *Current opinion in biotechnology*, 19(2), 181-189.
- Dymerski, T. M., Chmiel, T. M., & Wardencki, W. (2011). Invited Review Article: An odor-sensing system—powerful technique for foodstuff studies. *Review of Scientific Instruments*, 82(11), 111101.
- Ecarnot, M., Bączyk, P., Tessarotto, L., & Chervin, C. (2013). Rapid phenotyping of the tomato fruit model, Micro-Tom, with a portable VIS–NIR spectrometer. *Plant physiology and biochemistry*, 70, 159-163.
- Eisenstecken, D., Panarese, A., Robatscher, P., Huck, C., Zanella, A., & Oberhuber, M. (2015). A near infrared spectroscopy (NIRS) and chemometric approach to improve apple fruit quality management: a case study on the cultivars “cripps pink” and “braeburn”. *Molecules*, 20(8), 13603-13619.
- El Barbri, N., Llobet, E., El Bari, N., Correig, X., & Bouchikhi, B. (2008). Application of a portable electronic nose system to assess the freshness of Moroccan sardines. *Materials Science and Engineering: C*, 28(5-6), 666-670.

- El-Azazy, M. (2018). Introductory Chapter: Infrared Spectroscopy-A Synopsis of the Fundamentals and Applications. In *Infrared Spectroscopy-Principles, Advances, and Applications*. IntechOpen.
- Eldin, A. B. (2011). Near infra red spectroscopy. In *Wide spectra of quality control*. IntechOpen.
- Esbensen, K. H., Guyot, D., Westad, F., & Houmoller, L. P. (2002). *Multivariate data analysis: in practice: an introduction to multivariate data analysis and experimental design*. Multivariate Data Analysis.
- Eshed, Y., & Zamir, D. (1995). An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield-associated QTL. *Genetics*, *141*(3), 1147-1162.
- Ezhilan, M., Nesakumar, N., Babu, K. J., Srinandan, C. S., & Rayappan, J. B. B. (2018). An Electronic Nose for Royal Delicious Apple Quality Assessment—A Tri-layer Approach. *Food research international*, *109*, 44-51.
- Fan, S., Zhang, B., Li, J., Huang, W., & Wang, C. (2016). Effect of spectrum measurement position variation on the robustness of NIR spectroscopy models for soluble solids content of apple. *Biosystems engineering*, *143*, 9-19.
- Fanasca, S., Martino, A., Heuvelink, E., & Stanghellini, C. (2007). Effect of electrical conductivity, fruit pruning, and truss position on quality in greenhouse tomato fruit. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, *82*(3), 488-494.
- Fandi, M., Muhtaseb, J., & Hussein, M. (2010). Effect of N, P, K concentrations on yield and fruit quality of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in tuff culture. *Journal of Central European Agriculture*, *11*(2), 179-184.
- FAO (2019). FAOSTAT. <http://www.fao.org/faostat/es/#data> (accedido el 31/07/2019).
- Favati, F., Lovelli, S., Galgano, F., Miccolis, V., Di Tommaso, T., & Candido, V. (2009). Processing tomato quality as affected by irrigation scheduling. *Scientia Horticulturae*, *122*(4), 562-571.
- Fearn, T. (2002). Assessing calibrations: Sep, Rpd, Rer and R 2. *NIR news*, *13*(6), 12-13.
- Fernandez Cornejo, J. (2004). The seed industry in U.S. agriculture. United States Department of Agriculture, Washington, 81 pp.
- Fernández, K., & Agosin, E. (2007). Quantitative analysis of red wine tannins using Fourier-transform mid-infrared spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(18), 7294-7300.
- Flores, K., Sanchez, M. T., Perez-Marin, D. C., Lopez, M. D., Guerrero, J. E., & Garrido-Varo, A. (2008). Prediction of total soluble solid content in intact and cut melons and watermelons using near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, *16*(2), 91-98.
- Flores, K., Sánchez, M. T., Pérez-Marín, D., Guerrero, J. E., & Garrido-Varo, A. (2009). Feasibility in NIRS instruments for predicting internal quality in intact tomato. *Journal of Food Engineering*, *91*(2), 311-318.

- Folta, K. M., & Klee, H. J. (2016). Sensory sacrifices when we mass-produce mass produce. *Horticulture research*, 3, 16032.
- Fragoso, S., Acena, L., Guasch, J., Mestres, M., & Busto, O. (2011). Quantification of phenolic compounds during red winemaking using FT-MIR spectroscopy and PLS-regression. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(20), 10795-10802.
- Franca, A. S., & Nollet, L. M. (Eds.). (2017). *Spectroscopic methods in food analysis*. CRC press.
- Franca, A. S., & Oliveira, L. S. (2011). Potential uses of fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) in food processing and engineering. *Food Engineering; Siegler, BC, Ed.; Nova Science Publishers Inc.: Hauppauge, NY, USA*.
- Fridman, E., & Zamir, D. (2003). Functional divergence of a syntenic invertase gene family in tomato, potato, and Arabidopsis. *Plant Physiology*, 131(2), 603-609.
- Fridman, E., Carrari, F., Liu, Y. S., Fernie, A. R., & Zamir, D. (2004). Zooming in on a quantitative trait for tomato yield using interspecific introgressions. *Science*, 305(5691), 1786-1789.
- Fridman, E., Pleban, T., & Zamir, D. (2000). A recombination hotspot delimits a wild-species quantitative trait locus for tomato sugar content to 484 bp within an invertase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(9), 4718-4723.
- Fryder, M., Holmberg, M., Winqvist, F., & Lundstrom, I. (1995, June). A calibration technique for an electronic nose. In *Proceedings of the International Solid-State Sensors and Actuators Conference-TRANSDUCERS'95* (Vol. 1, pp. 683-686). IEEE.
- Fulton, T. M., Bucheli, P., Voirol, E., Lopez, J., Petiard, V., & Tanksley, S. D. (2002). Quantitative trait loci (QTL) affecting sugars, organic acids and other biochemical properties possibly contributing to flavor, identified in four advanced backcross populations of tomato. *Euphytica*, 127(2), 163-177.
- Gabarra, R., Arnó, J., Lara, L., Verdú, M. J., Ribes, A., Beitia, F., ... & Riudavets, J. (2014). Native parasitoids associated with *Tuta absoluta* in the tomato production areas of the Spanish Mediterranean Coast. *BioControl*, 59(1), 45-54.
- Galiana-Balaguer, L., Ibáñez, G., Cebolla-Cornejo, J., & Rosello, S. (2018). Evaluation of germplasm in *Solanum* section *Lycopersicon* for tomato taste improvement. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 42(5), 309-321.
- Galiana-Balaguer, L., Roselló, S., Herrero-Martinez, J. M., Maquieira, A., & Nuez, F. (2001). Determination of L-ascorbic acid in *Lycopersicon* fruits by capillary zone electrophoresis. *Analytical biochemistry*, 296(2), 218-224.
- Gao, L., Gonda, I., Sun, H., Ma, Q., Bao, K., Tieman, D. M., ... & Thannhauser, T. W. (2019). The tomato pan-genome uncovers new genes and a rare allele regulating fruit flavor. *Nature genetics*, 51(6), 1044.
- García-Martínez, S., Gálvez-Sola, L. N., Alonso, A., Agulló, E., Rubio, F., Ruiz, J. J., & Moral, R. (2012). Quality assessment of tomato landraces and virus-resistant breeding lines: quick estimation by near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(6), 1178-1185.

- Gardner, J. W., & Yinon, J. (Eds.). (2004). *Electronic noses & sensors for the detection of explosives* (pp. 01-28). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Gardner, J.W.; Bartlett, P.N. (1994). A brief history of electronic noses. *Sens. Actuat. B: Chem*, *18*, 211-220.
- Gardner, J.W.; Bartlett, P.N. (1999). *Electronic Noses. Principles and Applications*; Oxford University Press: Oxford, UK, pp. 221-245.
- Gardner, R. G. (1993a). 'Mountain Gold'tomato. *HortScience* *28*(4): 348-349.
- Gardner, R. G. (1993b). 'Mountain Belle'cherry tomato: NC 1C and NC 2C cherry tomato breeding lines. *HortScience* *28*(4): 349-350.
- Gardner, R. G. (2006a). 'Mountain Crest'hybrid tomato and its parent, NC 1 rinEC. *HortScience*, *41*(1), 261-262.
- Gardner, R. G. (2006b). Plum Crimson'Fresh-Market Plum Tomato Hybrid and its Parents, NC EBR-7 and NC EBR-8. *HortScience*, *41*(1), 259-260.
- Garvey, T. C., & Hewitt, J. D. (1992). Use of molecular markers to locate quantitative trait loci linked to high soluble solids content in a hybrid of *Lycopersicon cheesmanii*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *117*(3), 497-499.
- Gautier, H., Diakou-Verdin, V., Bénard, C., Reich, M., Buret, M., Bourgaud, F., ... & Génard, M. (2008). How does tomato quality (sugar, acid, and nutritional quality) vary with ripening stage, temperature, and irradiance?. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(4), 1241-1250.
- Ghosh, P. K., Chatterjee, S., Bhattacharjee, P., & Bhattacharyya, N. (2016). Removal of rancid-acid odor of expeller-pressed virgin coconut oil by gamma irradiation: evaluation by sensory and electronic nose technology. *Food and bioprocess technology*, *9*(10), 1724-1734.
- Godt, D. E., & Roitsch, T. (1997). Regulation and tissue-specific distribution of mRNAs for three extracellular invertase isoenzymes of tomato suggests an important function in establishing and maintaining sink metabolism. *Plant physiology*, *115*(1), 273-282.
- Goldman, I. L., Paran, I., & Zamir, D. (1995). Quantitative trait locus analysis of a recombinant inbred line population derived from a *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon cheesmanii* cross. *Theoretical and Applied Genetics*, *90*(7-8), 925-932.
- Gómez, A. H., Hu, G., Wang, J., & Pereira, A. G. (2006). Evaluation of tomato maturity by electronic nose. *Computers and electronics in agriculture*, *54*(1), 44-52.
- Gómez, A. H., Wang, J., Hu, G., & Pereira, A. G. (2008). Monitoring storage shelf life of tomato using electronic nose technique. *Journal of Food Engineering*, *85*(4), 625-631.
- Gonzalez-Martín, Y. G., Oliveros, M. C. C., Pavón, J. L. P., Pinto, C. G., & Cordero, B. M. (2001). Electronic nose based on metal oxide semiconductor sensors and pattern recognition techniques: characterisation of vegetable oils. *Analytica Chimica Acta*, *449*(1-2), 69-80.
- Grandillo, S., & Tanksley, S. D. (1996). QTL analysis of horticultural traits differentiating the cultivated tomato from the closely related species *Lycopersicon pimpinellifolium*. *Theoretical and Applied Genetics*, *92*(8), 935-951.

- Greensill, C. V., Wolfs, P. J., Spiegelman, C. H., & Walsh, K. B. (2001). Calibration transfer between PDA-based NIR spectrometers in the NIR assessment of melon soluble solids content. *Applied spectroscopy*, 55(5), 647-653.
- Griffiths, A., Prestage, S., Linforth, R., Zhang, J., Taylor, A., & Grierson, D. (1999). Fruit-specific lipoxygenase suppression in antisense-transgenic tomatoes. *Postharvest Biology and Technology*, 17(3), 163-173.
- Guohua, H., Yuling, W., Dandan, Y., & Wenwen, D. (2013). Fuji apple storage time predictive method using electronic nose. *Food analytical methods*, 6(1), 82-88.
- Guthrie, J. A., Liebenberg, C. J., & Walsh, K. B. (2006). NIR model development and robustness in prediction of melon fruit total soluble solids. *Australian Journal of Agricultural Research*, 57(4), 411-418.
- Gutierrez-Osuna, R. (2000). Drift reduction for metal-oxide sensor arrays using canonical correlation regression and partial least squares. *Electronic Noses and Olfaction*, 147-152.
- Gutierrez-Osuna, R., Nagle, H. T., Kermani, B., & Schiffman, S. S. (2002). Signal conditioning and preprocessing. *Handbook of Machine Olfaction: Electronic Nose Technology*, 105-132.
- Guyer, D., & Yang, X. (2000). Use of genetic artificial neural networks and spectral imaging for defect detection on cherries. *Computers and electronics in agriculture*, 29(3), 179-194.
- Guzman, G.; González de Molina, M. y Sevilla, E. (2000). Introducción a la agroecología como desarrollo rural sostenible. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.
- Haddi, Z., Alami, H., El Bari, N., Tounsi, M., Barhoumi, H., Maaref, A., ... & Bouchikhi, B. E. N. A. C. H. I. R. (2013). Electronic nose and tongue combination for improved classification of Moroccan virgin olive oil profiles. *Food Research International*, 54(2), 1488-1498.
- Haddi, Z., Amari, A., Ali, A. O., Bari, N. E., Barhoumi, H., Maaref, A., ... & Bouchikhi, B. E. N. A. C. H. I. R. (2011). Discrimination and identification of geographical origin virgin olive oil by an e-nose based on MOS sensors and pattern recognition techniques. *Procedia Engineering*, 25, 1137-1140.
- Hahn, F., Lopez, I., & Hernandez, G. (2004). Spectral detection and neural network discrimination of *Rhizopus stolonifer* spores on red tomatoes. *Biosystems Engineering*, 89(1), 93-99.
- Hai, Z., & Wang, J. (2006). Detection of adulteration in camellia seed oil and sesame oil using an electronic nose. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108(2), 116-124.
- Hartman, J.D. (1954). A possible method for the rapid estimation of flavours in vegetables. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 64, 335-342.
- Haugen, J. E., Tomic, O., & Kvaal, K. (2000). A calibration method for handling the temporal drift of solid state gas-sensors. *Analytica chimica acta*, 407(1-2), 23-39.
- He, Y., Zhang, Y., Pereira, A. G., Gómez, A. H., & Wang, J. (2005). Nondestructive determination of tomato fruit quality characteristics using VIS/NIR spectroscopy technique. *International Journal of Information Technology*, 11(11), 97-108.
- Hedrick, U. P., Booth, N. O. (1907). Mendelian characters in tomato. *Proceedings of the American Society for Horticultural Sciences*, 5 : 19-24.

- Hewitt J.D., Garvey T.C. 1987. Wild sources of high soluble solids. In: "Nevins, D.J.; Jones, R.A. (Eds.) Plant Biology, vol. 4: Tomato biotechnology. Liss, New York": 45-54.
- Hibbert, D. B. (2016). Vocabulary of concepts and terms in chemometrics (IUPAC Recommendations 2016). *Pure and Applied Chemistry*, 88(4), 407-443.
- Hirai, T., Kim, Y. W., Kato, K., Hiwasa-Tanase, K., & Ezura, H. (2011). Uniform accumulation of recombinant miraculin protein in transgenic tomato fruit using a fruit-ripening-specific E8 promoter. *Transgenic research*, 20(6), 1285-1292.
- Ho, L. C. (1996). The mechanism of assimilate partitioning and carbohydrate compartmentation in fruit in relation to the quality and yield of tomato. *Journal of Experimental Botany*, 1239-1243.
- Hobbs, B. S., Tantram, A. D., & Chan-Henry, R. (1991). Liquid electrolyte fuel cells. *Techniques and Mechanisms in Gas Sensing*, 161-188.
- Hobson, G. (1988). How the tomato lost its taste. *New Scientist*, 119, 46-50.
- Holmberg, M., Davide, F. A., Di Natale, C., D'Amico, A., Winqvist, F., & Lundström, I. (1997). Drift counteraction in odour recognition applications: lifelong calibration method. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 42(3), 185-194.
- Hong, T. L., & Tsou, S. C. (1998). Determination of tomato quality by near infrared spectroscopy. *Journal of near infrared spectroscopy*, 6(201), A321-A324.
- Hong, X., & Wang, J. (2014). Detection of adulteration in cherry tomato juices based on electronic nose and tongue: Comparison of different data fusion approaches. *Journal of Food Engineering*, 126, 89-97.
- Hong, X., Wang, J., & Qi, G. (2015). E-nose combined with chemometrics to trace tomato-juice quality. *Journal of Food Engineering*, 149, 38-43.
- Howard, P. H. (2015). Intellectual property and consolidation in the seed industry. *Crop Science*, 55(6), 2489-2495.
- Huang, J. Y., Guo, X. P., Qiu, Y. B., & Chen, Z. Y. (2007). Cluster and discriminant analysis of electrochemical noise data. *Electrochimica Acta*, 53(2), 680-687.
- Huang, X. Y., Pan, S. H., Sun, Z. Y., Ye, W. T., & Aheto, J. H. (2018). Evaluating quality of tomato during storage using fusion information of computer vision and electronic nose. *Journal of food process engineering*, 41(6), e12832.
- Huang, Y., Rasco, B.A., Cavinato, A.G. (2009). Fruit juices. *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 355–375.
- Hyvärinen, A., & Oja, E. (2000). Independent component analysis: algorithms and applications. *Neural networks*, 13(4-5), 411-430.
- Ibarbia, E. A., & Lambeth, V. N. (1969). Inheritance of tomato fruit weight. *J Amer Soc Hort Sci*.
- Ikegami, A.; Kaneyasu, M. (1985) Olfactory detection using integrated sensors. In *Proceedings of the 3rd international conference on solid-state sensors and actuators*, New York, NY, USA, pp. 136-139.

- Ilari, J. L., Martens, H., & Isaksson, T. (1988). Determination of particle size in powders by scatter correction in diffuse near-infrared reflectance. *Applied spectroscopy*, 42(5), 722-728.
- Ilic, Z. S., Milenkovic, L., Šunic, L., Stanojevic, L., Bodroza-Solarov, M., & Marinkovic, D. (2012). Tomato fruits quality as affected by light intensity using color shade nets. In *Proceedings. 47th Croatian and 7th International Symposium on Agriculture. Opatija, Croatia* (Vol. 414, p. 418).
- Irudayaraj, J., & Tewari, J. (2003). Simultaneous monitoring of organic acids and sugars in fresh and processed apple juice by Fourier transform infrared–attenuated total reflection spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, 57(12), 1599-1604.
- Jha, S. N., & Matsuoka, T. (2004). Non-destructive determination of acid–brix ratio of tomato juice using near infrared spectroscopy. *International journal of food science & technology*, 39(4), 425-430.
- Jia, W., Liang, G., Jiang, Z., & Wang, J. (2019). Advances in Electronic Nose Development for Application to Agricultural Products. *Food Analytical Methods*, 1-15.
- Jin, Y., Ni, D. A., & Ruan, Y. L. (2009). Posttranslational elevation of cell wall invertase activity by silencing its inhibitor in tomato delays leaf senescence and increases seed weight and fruit hexose level. *The Plant Cell*, 21(7), 2072-2089.
- Jones, D. R. (2003). Plant viruses transmitted by whiteflies. *European Journal of Plant Pathology*, 109(3), 195-219.
- Julián, O., Herráiz, J., Corella, S., Di-Lolli, I., Soler, S., Díez, M. J., & Pérez-de-Castro, A. (2013). Initial development of a set of introgression lines from *Solanum peruvianum* PI 126944 into tomato: exploitation of resistance to viruses. *Euphytica*, 193(2), 183-196.
- Kader, A. A. (1985). Postharvest biology and technology: an overview. *Postharvest technology of horticultural crops*. Capítulo 2, pp. 3-7.
- Kavanaugh, C. J., Trumbo, P. R., & Ellwood, K. C. (2007). The US Food and Drug Administration's evidence-based review for qualified health claims: tomatoes, lycopene, and cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 99(14), 1074-1085.
- Kermit, M., & Tomic, O. (2003). Independent component analysis applied on gas sensor array measurement data. *IEEE Sensors Journal*, 3(2), 218-228.
- Khanmohammadi, M., Karami, F., Mir-Marqués, A., Garmarudi, A. B., Garrigues, S., & De La Guardia, M. (2014). Classification of persimmon fruit origin by near infrared spectrometry and least squares-support vector machines. *Journal of food engineering*, 142, 17-22.
- Kiesele, H., & Wittich, M. H. (2000). Electrochemical gas sensors for use under extreme climatic conditions. *Dräger Rev*, 85, 10-13.
- Kim, J., Mowat, A., Poole, P., & Kasabov, N. (2000). Linear and non-linear pattern recognition models for classification of fruit from visible–near infrared spectra. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, 51(2), 201-216.

- Kisaka, H., & Kida, T. (2003). Transgenic tomato plant carrying a gene for NADP-dependent glutamate dehydrogenase (gdhA) from *Aspergillus nidulans*. *Plant Science*, *164*(1), 35-42.
- Klann, E. M., Chetelat, R. T., & Bennett, A. B. (1993). Expression of acid invertase gene controls sugar composition in tomato (*Lycopersicon*) fruit. *Plant physiology*, *103*(3), 863-870.
- Klann, E. M., Hall, B., & Bennett, A. B. (1996). Antisense acid invertase (TIV1) gene alters soluble sugar composition and size in transgenic tomato fruit. *Plant Physiology*, *112*(3), 1321-1330.
- Klee, H. J. (2010). Improving the flavor of fresh fruits: genomics, biochemistry, and biotechnology. *New Phytologist*, *187*(1), 44-56.
- Klee, H. J., & Tieman, D. M. (2013). Genetic challenges of flavor improvement in tomato. *Trends in Genetics*, *29*(4), 257-262.
- Klee, H. J., & Tieman, D. M. (2018). The genetics of fruit flavour preferences. *Nature Reviews Genetics*, *19*(6), 347.
- Koehler, P. E., & Kays, S. J. (1991). Sweet potato flavor: Quantitative and qualitative assessment of optimum sweetness. *Journal of food quality*, *14*(3), 241-249.
- Kohonen, T. (1990). The self-organizing map, *Proceedings of the IEEE* *78*(9): 1464–1480
- Kovács K, Rupert CF, Tikunov Y, Graham N, Bradley G, Seymour GB, Bovy AG, Grierson D (2009) Effect of pleiotropic
- Kramer, A. (1965). Evaluation of quality of fruits and vegetables, In: Food Quality, G. W. Irving, Jr. and S. R. Hoover, Eds. American Association for the Advancement
- Kuscu, H., Turhan, A., Ozmen, N., Aydinol, P., & Demir, A. O. (2014). Optimizing levels of water and nitrogen applied through drip irrigation for yield, quality, and water productivity of processing tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, *55*(2), 103-114.
- Kyriacou, M. C., & Roupheal, Y. (2018). Towards a new definition of quality for fresh fruits and vegetables. *Scientia Horticulturae*, *234*, 463-469.
- Lahoz, I., Leiva-Brondo, M., Martí, R., Macua, J. I., Campillo, C., Roselló, S., & Cebolla-Cornejo, J. (2016b). Influence of high lycopene varieties and organic farming on the production and quality of processing tomato. *Scientia horticulturae*, *204*, 128-137.
- Lahoz, I., Pérez-de-Castro, A., Valcárcel, M., Macua, J. I., Beltrán, J., Roselló, S., & Cebolla-Cornejo, J. (2016a). Effect of water deficit on the agronomical performance and quality of processing tomato. *Scientia horticulturae*, *200*, 55-65.
- Lambeth, V. N., Straten, E. F., & Fields, M. L. (1966). Fruit quality attributes of 250 foreign and domestic tomato accessions.
- Lammertyn, J., Peirs, A., De Baerdemaeker, J., & Nicolai, B. (2000). Light penetration properties of NIR radiation in fruit with respect to non-destructive quality assessment. *Postharvest Biology and Technology*, *18*(2), 121-132.

- Laporte, M. M., Galagan, J. A., Prasch, A. L., Vanderveer, P. J., Hanson, D. T., Shewmaker, C. K., & Sharkey, T. D. (2001). Promoter strength and tissue specificity effects on growth of tomato plants transformed with maize sucrose-phosphate synthase. *Planta*, *212*(5-6), 817-822.
- Laporte, M. M., Galagan, J. A., Shapiro, J. A., Boersig, M. R., Shewmaker, C. K., & Sharkey, T. D. (1997). Sucrose-phosphate synthase activity and yield analysis of tomato plants transformed with maize sucrose-phosphate synthase. *Planta*, *203*(2), 253-259.
- Larkin, P.J. (2018). *Infrared and Raman Spectroscopy: Principles and Spectral Interpretation*, 2 edn. Elsevier, Amsterdam, Netherlands.
- Levin, I., Gilboa, N., Yeselson, E., Shen, S., & Schaffer, A. A. (2000). Fgr, a major locus that modulates the fructose to glucose ratio in mature tomato fruits. *Theoretical and Applied Genetics*, *100*(2), 256-262.
- Levin, I., Lalazar, A., Bar, M., & Schaffer, A. A. (2004). Non GMO fruit factories: strategies for modulating metabolic pathways in the tomato fruit. *Industrial Crops and Products*, *20*(1), 29-36.
- Levin, I., Gilboa, N., Cincarevsky, F., Oguz, I., Petreikov, M., Yeselson, Y., ... & Schaffer, A. A. (2006). Epistatic interaction between two unlinked loci derived from introgressions from *Lycopersicon hirsutum* further modulates the fructose-to-glucose ratio in the mature tomato fruit. *Israel journal of plant sciences*, *54*(3), 215-222.
- Lewinsohn, E., Schalechet, F., Wilkinson, J., Matsui, K., Tadmor, Y., Nam, K. H., ... & Hiatt, W. (2001). Enhanced levels of the aroma and flavor compound S-linalool by metabolic engineering of the terpenoid pathway in tomato fruits. *Plant Physiology*, *127*(3), 1256-1265.
- Li, J., Tian, X., Huang, W., Zhang, B., & Fan, S. (2016). Application of long-wave near infrared hyperspectral imaging for measurement of soluble solid content (SSC) in pear. *Food analytical methods*, *9*(11), 3087-3098.
- Li, J., Zheng, F., Jiang, J., Lin, H., & Hui, G. (2015). Chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) quality determination based on an electronic nose and non-linear dynamic model. *Analytical Methods*, *7*(23), 9928-9939.
- Li, X. L., Yi, S. L., He, S. L., Lv, Q., Xie, R. J., Zheng, Y. Q., & Deng, L. (2016). Identification of pummelo cultivars by using Vis/NIR spectra and pattern recognition methods. *Precision agriculture*, *17*(3), 365-374.
- Li, Y. S., & Church, J. S. (2014). Raman spectroscopy in the analysis of food and pharmaceutical nanomaterials. *Journal of food and drug analysis*, *22*(1), 29-48.
- Lima, I. P., Resende, J. T. V., Oliveira, J. R. F., Faria, M. V., Resende, N. C. V., & Lima Filho, R. B. (2015). Indirect selection of industrial tomato genotypes rich in zingiberene and resistant to *Tuta absoluta* Meyrick. *Genetics and Molecular Research*, *14*(4), 15081-15089.
- Liu, K., Zhang, T. Q., Tan, C. S., & Astatkie, T. (2011). Responses of fruit yield and quality of processing tomato to drip-irrigation and fertilizers phosphorus and potassium. *Agronomy Journal*, *103*(5), 1339-1345.

- Liu, Y., Ying, Y., Yu, H., & Fu, X. (2006). Comparison of the HPLC method and FT-NIR analysis for quantification of glucose, fructose, and sucrose in intact apple fruits. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(8), 2810-2815.
- Livingston, D. M. (1973). *The Master of Light: A Biography of Albert A. Michelson* (p. 322). University of Chicago Press.
- Longobardi, F., Casiello, G., Ventrella, A., Mazzilli, V., Nardelli, A., Sacco, D., ... & Agostiano, A. (2015). Electronic nose and isotope ratio mass spectrometry in combination with chemometrics for the characterization of the geographical origin of Italian sweet cherries. *Food chemistry*, 170, 90-96.
- López Camelo, A. F. (2004). *Manual for the preparation and sale of fruits and vegetables: From field to market* (Vol. 151). Food & Agriculture Org.
- Loutfi, A., Coradeschi, S., Mani, G. K., Shankar, P., & Rayappan, J. B. B. (2015). Electronic noses for food quality: A review. *Journal of Food Engineering*, 144, 103-111.
- Lu, R. (2004). Multispectral imaging for predicting firmness and soluble solids content of apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 31(2), 147-157.
- Lu, W. (2010). *Near-Infrared Instruments*. Beijing, China: Chemical Industry Press.
- Lu, X., & Rasco, B. A. (2012). Determination of antioxidant content and antioxidant activity in foods using infrared spectroscopy and chemometrics: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 52(10), 853-875.
- Lundström, I., Shivaraman, S., Svensson, C., & Lundkvist, L. (1975b). A hydrogen-sensitive MOS field-effect transistor. *Applied Physics Letters*, 26(2), 55-57.
- Lundström, K. I., Shivaraman, M. S., & Svensson, C. M. (1975a). A hydrogen-sensitive Pd-gate MOS transistor. *Journal of Applied Physics*, 46(9), 3876-3881.
- Lunn, J. E., Gillespie, V. J., & Furbank, R. T. (2003). Expression of a cyanobacterial sucrose-phosphate synthase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 in transgenic plants. *Journal of Experimental Botany*, 54(381), 223-237.
- Ma, Y., Guo, B., Wei, Y., Wei, S., & Zhao, H. (2014). The feasibility and stability of distinguishing the kiwi fruit geographical origin based on electronic nose analysis. *Food Science and Technology Research*, 20(6), 1173-1181.
- Majchrzak, T., Wojnowski, W., Dymerski, T., Gębicki, J., & Namieśnik, J. (2018). Electronic noses in classification and quality control of edible oils: A review. *Food chemistry*, 246, 192-201.
- Malundo, T. M. M., Shewfelt, R. L., & Scott, J. W. (1995). Flavor quality of fresh tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as affected by sugar and acid levels. *Postharvest Biology and Technology*, 6(1-2), 103-110.
- Malyska, A., Bolla, R., & Twardowski, T. (2016). The role of public opinion in shaping trajectories of agricultural biotechnology. *Trends in biotechnology*, 34(7), 530-534.
- MAPA (2019). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. URL <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas->

agrarias/agricultura/superficies-producciones-anauales-cultivos/ (accedido el 31/07/2019).

- Marchoux, G., Gebre-Selassie, K., & Gognalons, P. (2001). Three factors contribute to the emergence of new viruses, ie adaptative evolution, intensification and globalization. Tomato and pepper crops as examples. *Phytoma. La Défense des Végétaux (France)*.
- Marques, E. J. N., de Freitas, S. T., Pimentel, M. F., & Pasquini, C. (2016). Rapid and non-destructive determination of quality parameters in the 'Tommy Atkins' mango using a novel handheld near infrared spectrometer. *Food chemistry, 197*, 1207-1214.
- Martí, R., Leiva-Brondo, M., Lahoz, I., Campillo, C., Cebolla-Cornejo, J., & Roselló, S. (2018a). Polyphenol and L-ascorbic acid content in tomato as influenced by high lycopene genotypes and organic farming at different environments. *Food chemistry, 239*, 148-156.
- Martí, R., Roselló, S., & Cebolla-Cornejo, J. (2016). Tomato as a source of carotenoids and polyphenols targeted to cancer prevention. *Cancers, 8*(6), 58.
- Martí, R., Valcárcel, M., Herrero-Martínez, J. M., Cebolla-Cornejo, J., & Roselló, S. (2017). Simultaneous determination of main phenolic acids and flavonoids in tomato by micellar electrokinetic capillary electrophoresis. *Food chemistry, 221*, 439-446.
- Martí, R., Valcárcel, M., Leiva-Brondo, M., Lahoz, I., Campillo, C., Roselló, S., & Cebolla-Cornejo, J. (2018b). Influence of controlled deficit irrigation on tomato functional value. *Food chemistry, 252*, 250-257.
- Martí, R., Valcárcel, M., Roselló, S., & Cebolla-Cornejo, J. (2019). Functional and Health-promoting Properties of Tomatoes: It's Not Just Lycopene. In *Tomato Chemistry, Industrial Processing and Product Development* (pp. 285-303).
- Matsukura, C. (2016). Sugar accumulation in tomato fruit and its modification using molecular breeding techniques. In *Functional Genomics and Biotechnology in Solanaceae and Cucurbitaceae Crops* (pp. 141-154). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Maul, F., Sargent, S. A., Sims, C. A., Baldwin, E. A., Balaban, M. O., & Huber, D. J. (2000). Tomato flavor and aroma quality as affected by storage temperature. *Journal of Food Science, 65*(7), 1228-1237.
- McGlasson, W. B., Last, J. H., Shaw, K. J., & Meldrum, S. K. (1987). Influence of the non-ripening mutants rin and nor on the aroma of tomato fruit. *HortScience 22*: 632-634.
- Meilgaard M.C., Carr B.T., Vance C. (2006). *Sensory Evaluation Techniques*. Boca Raton, FL: CRC Press. 464 pp. Fourth ed.
- Melucci, D., Bendini, A., Tesini, F., Barbieri, S., Zappi, A., Vichi, S., ... & Toschi, T. G. (2016). Rapid direct analysis to discriminate geographic origin of extra virgin olive oils by flash gas chromatography electronic nose and chemometrics. *Food chemistry, 204*, 263-273.
- Mielle, P., Marquis, F., & Latrasse, C. (2000). Electronic noses: specify or disappear. *Sensors and Actuators B: Chemical, 69*(3), 287-294.

- Mildner-Szkudlarz, S., Jeleń, H. H., & Zawirska-Wojtasiak, R. (2008). The use of electronic and human nose for monitoring rapeseed oil autoxidation. *European journal of lipid science and technology*, 110(1), 61-72.
- Milosevic, M. (2013). On the nature of the evanescent wave. *Applied spectroscopy*, 67(2), 126-131.
- Mitcham, B., Cantwell, M., & Kader, A. (1996). Methods for determining quality of fresh commodities. *Perishables handling newsletter*, 85, 1-5.
- Mohammad-Razdari, A., Ghasemi-Varnamkhasti, M., Yoosefian, S. H., Izadi, Z., & Siadat, M. (2019). Potential application of electronic nose coupled with chemometric tools for authentication assessment in tomato paste. *Journal of Food Process Engineering*, e13119.
- Mollazade, K., Omid, M., Tab, F. A., & Mohtasebi, S. S. (2012). Principles and applications of light backscattering imaging in quality evaluation of agro-food products: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 5(5), 1465-1485.
- Moncrieff, R.W. (1961). An instrument for measuring and classifying odours. *J. Appl. Physiol.* 16, 742-749.
- Morgan, M. J., Osorio, S., Gehl, B., Baxter, C. J., Kruger, N. J., Ratcliffe, R. G., ... & Sweetlove, L. J. (2013). Metabolic engineering of tomato fruit organic acid content guided by biochemical analysis of an introgression line. *Plant physiology*, 161(1), 397-407.
- Morvai, M., & Molnár-Perl, I. (1992). Simultaneous gas chromatographic quantitation of sugars and acids in citrus fruits, pears, bananas, grapes, apples and tomatoes. *Chromatographia*, 34(9-10), 502-504.
- Murray, I. (1999). NIR spectroscopy of food: simple things, subtle things and spectra. *NIR news*, 10(2), 10-12.
- Murray, I., & Cowe, I. (2004). Sample preparation In Near Infrared Spectroscopy in Agriculture. *Agronomy; Roberts, CA, Workman, J., Reeves, JB, Eds*, 75-115.
- Næs, T., Isaksson, T., Fearn, T., & Davies, T. (2002). *A user friendly guide to multivariate calibration and classification*. NIR publications.
- Nature Editorial (2015) Seeds of change. *Nature News* 520, 131-132. DOI: 10.1038/520131b
- Ncama, K., Opara, U. L., Tesfay, S. Z., Fawole, O. A., & Magwaza, L. S. (2017). Application of Vis/NIR spectroscopy for predicting sweetness and flavour parameters of 'Valencia'orange (*Citrus sinensis*) and 'Star Ruby'grapefruit (*Citrus x paradisi* Macfad). *Journal of Food Engineering*, 193, 86-94.
- Nicolai, B. M., Beullens, K., Bobelyn, E., Peirs, A., Saeys, W., Theron, K. I., & Lammertyn, J. (2007). Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review. *Postharvest biology and technology*, 46(2), 99-118.
- Nicolai, B. M., Defraeye, T., De Ketelaere, B., Herremans, E., Hertog, M. L., Saeys, W., ... & Verboven, P. (2014). Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality. *Annual review of food science and technology*, 5, 285-312.

- Nikbakht, A. M., Tavakkoli, H. T., Malekfar, R., & Gobadian, B. (2011). Nondestructive determination of tomato fruit quality parameters using Raman spectroscopy. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 13, 517-526.
- Nørgaard, L., Saudland, A., Wagner, J., Nielsen, J. P., Munck, L., & Engelsen, S. B. (2000). Interval Partial Least-Squares Regression (i PLS): A Comparative Chemometric Study with an Example from Near-Infrared Spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, 54(3), 413-419.
- Norris, K. H. (1964). Design and development of a new moisture meter. *Agric. Eng*, 45(7), 370-372.
- Oke, M., Ahn, T., Schofield, A., & Paliyath, G. (2005). Effects of phosphorus fertilizer supplementation on processing quality and functional food ingredients in tomato. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(5), 1531-1538.
- Oruna-Concha, M. J., Methven, L., Blumenthal, H., Young, C., & Mottram, D. S. (2007). Differences in glutamic acid and 5'-ribonucleotide contents between flesh and pulp of tomatoes and the relationship with umami taste. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(14), 5776-5780.
- Padilla, M., Perera, A., Montoliu, I., Chaudry, A., Persaud, K., & Marco, S. (2010). Drift compensation of gas sensor array data by orthogonal signal correction. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 100(1), 28-35.
- Pan, L., Zhang, W., Zhu, N., Mao, S., & Tu, K. (2014). Early detection and classification of pathogenic fungal disease in post-harvest strawberry fruit by electronic nose and gas chromatography–mass spectrometry. *Food research international*, 62, 162-168.
- Paran, I., & Van Der Knaap, E. (2007). Genetic and molecular regulation of fruit and plant domestication traits in tomato and pepper. *Journal of Experimental Botany*, 58(14), 3841-3852.
- Patanè, C., Tringali, S., & Sortino, O. (2011). Effects of deficit irrigation on biomass, yield, water productivity and fruit quality of processing tomato under semi-arid Mediterranean climate conditions. *Scientia Horticulturae*, 129(4), 590-596.
- Paterson, A. H., Damon, S., Hewitt, J. D., Zamir, D., Rabinowitch, H. D., Lincoln, S. E., ... & Tanksley, S. D. (1991). Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato: comparison across species, generations, and environments. *Genetics*, 127(1), 181-197.
- Paterson, A. H., Lander, E. S., Hewitt, J. D., Peterson, S., Lincoln, S. E., & Tanksley, S. D. (1988). Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature*, 335(6192), 721.
- Pelletier, J. E., Laska, M. N., Neumark-Sztainer, D., & Story, M. (2013). Positive attitudes toward organic, local, and sustainable foods are associated with higher dietary quality among young adults. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 113(1), 127-132.
- Peñarrubia, L., Kim, R., Giovannoni, J., Kim, S. H., & Fischer, R. L. (1992). Production of the sweet protein monellin in transgenic plants. *Bio/technology*, 10(5), 561.
- Peralta, I. E., & Spooner, D. M. (2007). History, origin and early cultivation of tomato (*Solanaceae*). *Genetic improvement of solanaceous crops*, 2, 1-27.

- Persaud, K.C.; Dodd, G. (1982). Analysis of discrimination mechanisms in the mammalian olfactory system using a model nose. *Nature*, 299, 352-355.
- Petro-Turza, M. (1986). Flavor of tomato and tomato products. *Food Reviews International*, 2(3), 309-351.
- Pieper, J. R., & Barrett, D. M. (2009). Effects of organic and conventional production systems on quality and nutritional parameters of processing tomatoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(2), 177-194.
- Pinela, J., Oliveira, M. B. P. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Bioactive compounds of tomatoes as health promoters. *Natural bioactive compounds from fruits and vegetables as health promoters*, 2, 48-91.
- Polshin, E., Lammertyn, J., & Nicolai, B. M. (2006). Vibrational spectroscopy techniques in the quality assessment of fruits and vegetables. *Handbook of Vibrational Spectroscopy*.
- Porep, J. U., Kammerer, D. R., & Carle, R. (2015). On-line application of near infrared (NIR) spectroscopy in food production. *Trends in Food Science & Technology*, 46(2), 211-230.
- Prestage, S., Linforth, R. S., Taylor, A. J., Lee, E., Speirs, J., & Schuch, W. (1999). Volatile production in tomato fruit with modified alcohol dehydrogenase activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(1), 131-136.
- Pyne, A. W., & Wick, E. L. (1965). Volatile components of tomatoes. *Journal of Food Science*, 30(2), 192-200.
- Qin, J., Chao, K., & Kim, M. S. (2012). Nondestructive evaluation of internal maturity of tomatoes using spatially offset Raman spectroscopy. *Postharvest Biology and Technology*, 71, 21-31.
- Raiola, A., Rigano, M. M., Calafiore, R., Frusciante, L., & Barone, A. (2014). Enhancing the health-promoting effects of tomato fruit for biofortified food. *Mediators of inflammation*, 2014.
- Rambla, J. L., Medina, A., Fernández-del-Carmen, A., Barrantes, W., Grandillo, S., Cammareri, M., ... & Primo, J. (2016). Identification, introgression, and validation of fruit volatile QTLs from a red-fruited wild tomato species. *Journal of experimental botany*, 68(3), 429-442.
- Rasines-Perea, Z., Prieto-Perea, N., Romera-Fernández, M., Berrueta, L. A., & Gallo, B. (2015). Fast determination of anthocyanins in red grape musts by Fourier transform mid-infrared spectroscopy and partial least squares regression. *European Food Research and Technology*, 240(5), 897-908.
- Reddy, C. S., Vijayalakshmi, M., Kaul, T., Islam, T., & Reddy, M. K. (2015). Improving flavour and quality of tomatoes by expression of synthetic gene encoding sweet protein monellin. *Molecular biotechnology*, 57(5), 448-453.
- Ren, Y., Ramaswamy, H. S., Li, Y., Yuan, C., & Ren, X. (2018). Classification of impact injury of apples using electronic nose coupled with multivariate statistical analyses. *Journal of food process engineering*, 41(5): 12698–12705

- Rick, C. (1974). High soluble-solids content in large-fruited tomato lines derived from a wild green-fruited species. *Hilgardia*, 42(15), 493-510.
- Saad, A., Jha, S. N., Jaiswal, P., Srivastava, N., & Helyes, L. (2016). Non-destructive quality monitoring of stored tomatoes using VIS-NIR spectroscopy. *Engineering in agriculture, environment and food*, 9(2), 158-164.
- Sagor, G. H. M., Berberich, T., Tanaka, S., Nishiyama, M., Kanayama, Y., Kojima, S., ... & Kusano, T. (2016). A novel strategy to produce sweeter tomato fruits with high sugar contents by fruit-specific expression of a single bZIP transcription factor gene. *Plant biotechnology journal*, 14(4), 1116-1126.
- Saimbhi, M. S., Cheema, D. S., Singh, S., & Nandpuri, K. S. (1995). Physicochemical characteristics of some tomato hybrids. *Tropical Science (United Kingdom)*.
- Sakiyama, R. (1968). Effects of irrigation, temperature and shading on the acidity of tomato fruits. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 37(1), 67-72.
- Saliba-Colombani, V., Causse, M., Philouze, J., Buret, M., Issanchou, S., & Lesschaeve, I. (1999). QTLs for organoleptic quality in fresh market tomato. In *Genetics and Breeding for Crop Quality and Resistance* (pp. 291-299). Springer, Dordrecht.
- Sanaeifar, A., Mohtasebi, S. S., Ghasemi-Varnamkhasti, M., Ahmadi, H., & Lozano, J. (2015). Development and application of a new low cost electronic nose for the ripeness monitoring of banana using computational techniques (PCA, LDA, SIMCA and SVM). *Czech Journal of Food Sciences*, 32(6), 538-548.
- Santos, J. P., Lozano, J., & Aleixandre, M. (2017). Electronic noses applications in beer technology. *Brewing Technology*, 177.
- Schaffer, A. A., Levin, I., Oguz, I., Petreikov, M., Cincarevsky, F., Yeselson, Y., ... & Bar, M. (2000). ADPglucose pyrophosphorylase activity and starch accumulation in immature tomato fruit: the effect of a *Lycopersicon hirsutum*-derived introgression encoding for the large subunit. *Plant Science*, 152(2), 135-144.
- Schaller, E., Bosset, J. O., & Escher, F. (1998). 'Electronic noses' and their application to food. *LWT-Food Science and Technology*, 31(4), 305-316.
- Schmidt, D. B. (2000). Consumer Response to Functional Foods in the 21st century.
- Schreiner, M., Korn, M., Stenger, M., Holzgreve, L., & Altmann, M. (2013). Current understanding and use of quality characteristics of horticulture products. *Scientia horticulturae*, 163, 63-69.
- Ścibisz, I., Reich, M., Bureau, S., Gouble, B., Causse, M., Bertrand, D., & Renard, C. M. (2011). Mid-infrared spectroscopy as a tool for rapid determination of internal quality parameters in tomato. *Food Chemistry*, 125(4), 1390-1397.
- Shao, Y., He, Y., Gómez, A. H., Pereir, A. G., Qiu, Z., & Zhang, Y. (2007). Visible/near infrared spectrometric technique for nondestructive assessment of tomato 'Heatwave' (*Lycopersicon esculentum*) quality characteristics. *Journal of Food Engineering*, 81(4), 672-678.

- Shewfelt, R.L. (2000). Fruits and vegetables quality. In R. L. Shewfelt & B. Bruckner, eds. *Fruits and vegetables quality. An integrated view*. London.: CRC Press., pp. 144–157
- Shi, H., Zhang, M., & Adhikari, B. (2018). Advances of electronic nose and its application in fresh foods: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(16), 2700-2710.
- Siesler, H. W., Ozaki, Y., Kawata, S., & Heise, H. M. (Eds.). (2008). *Near-Infrared Spectroscopy: Principles, Instruments, Applications*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
- Siesler, H. W., Ozaki, Y., Kawata, S., & Heise, H. M. (Eds.). (2002). *Near-infrared spectroscopy: principles, instruments, applications*. John Wiley & Sons.
- Sinesio, F., Di Natale, C., Quaglia, G. B., Bucarelli, F. M., Moneta, E., Macagnano, A., ... & D'Amico, A. (2000). Use of electronic nose and trained sensory panel in the evaluation of tomato quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(1), 63-71.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2017). *Principles of instrumental analysis*. Cengage learning.
- Slaughter, D. C., Barrett, D., & Boersig, M. (1996). Nondestructive determination of soluble solids in tomatoes using near infrared spectroscopy. *Journal of food science*, 61(4), 695-697.
- Slavin, J. L., & Lloyd, B. (2012). Health benefits of fruits and vegetables. *Advances in nutrition*, 3(4), 506-516.
- Sloof, M., Tijssens, L. M. M., & Wilkinson, E. C. (1996). Concepts for modelling the quality of perishable products. *Trends in Food Science & Technology*, 7(5), 165-171.
- Smith, B. C. (2011). *Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy*. CRC press.
- Soler, S., Cebolla-Cornejo, J., & Nuez, F. (2003). Control of diseases induced by tospoviruses in tomato: an update of the genetic approach. *Phytopathologia Mediterranea*, 42(3), 207-219.
- Song, X., Ren, Y., Zhang, Y., Li, Y., PENG, G. Y., & MA, T. (2014). Prediction of kiwifruit quality during cold storage by electronic nose [J]. *Food Sci*, 35(20), 230-235.
- Sorrequieta, A., Ferraro, G., Boggio, S. B., & Valle, E. M. (2010). Free amino acid production during tomato fruit ripening: a focus on L-glutamate. *Amino acids*, 38(5), 1523-1532.
- Speirs, J., Lee, E., Holt, K., Yong-Duk, K., Scott, N. S., Loveys, B., & Schuch, W. (1998). Genetic manipulation of alcohol dehydrogenase levels in ripening tomato fruit affects the balance of some flavor aldehydes and alcohols. *Plant Physiology*, 117(3), 1047-1058.
- Stevens, M. A. (1972). Citrate and malter concentrations in tomato fruits: genetic control and maturational effects. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 97, 655-658.
- Stevens, M. A., Kader, A. A., & Albright, M. (1979). Potential for increasing tomato flavor via increased sugar and acid content. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 104(1), 40-42.
- Stevens, M. A., Kader, A. A., & Albright-Holton, M. (1977). Intercultivar variation in composition of locular and pericarp portions of fresh market tomatoes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 102, 689-692.

- Strike, D. J., Meijerink, M. G. H., & Koudelka-Hep, M. (1999). Electronic noses—A mini-review. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 364(6), 499-505.
- Sun, D. W. (Ed.). (2009). *Infrared spectroscopy for food quality analysis and control*. Academic Press.
- Sun, H. J., Kataoka, H., Yano, M., & Ezura, H. (2007). Genetically stable expression of functional miraculin, a new type of alternative sweetener, in transgenic tomato plants. *Plant biotechnology journal*, 5(6), 768-777.
- Tadmor, Y., Fridman, E., Gur, A., Larkov, O., Lastochkin, E., Ravid, U., ... & Lewinsohn, E. (2002). Identification of malodorous, a wild species allele affecting tomato aroma that was selected against during domestication. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7), 2005-2009.
- Tamburini, E., Costa, S., Rugiero, I., Pedrini, P., & Marchetti, M. (2017). Quantification of lycopene, β -carotene, and Total soluble solids in intact red-flesh watermelon (*Citrullus lanatus*) using on-line Near-Infrared Spectroscopy. *Sensors*, 17(4), 746.
- Tian, F., Yan, J., Xu, S., Feng, J., He, Q., Shen, Y., & Jia, P. (2012). Background interference elimination in wound infection detection by electronic nose based on reference vector-based independent component analysis. *Information Technology Journal*, 11(7), 850.
- Tieman, D. M., Loucas, H. M., Kim, J. Y., Clark, D. G., & Klee, H. J. (2007). Tomato phenylacetaldehyde reductases catalyze the last step in the synthesis of the aroma volatile 2-phenylethanol. *Phytochemistry*, 68(21), 2660-2669.
- Tieman, D., Taylor, M., Schauer, N., Fernie, A. R., Hanson, A. D., & Klee, H. J. (2006). Tomato aromatic amino acid decarboxylases participate in synthesis of the flavor volatiles 2-phenylethanol and 2-phenylacetaldehyde. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(21), 8287-8292.
- Tieman, D., Zeigler, M., Schmelz, E., Taylor, M. G., Rushing, S., Jones, J. B., & Klee, H. J. (2010). Functional analysis of a tomato salicylic acid methyl transferase and its role in synthesis of the flavor volatile methyl salicylate. *The Plant Journal*, 62(1), 113-123.
- Tieman, D., Zhu, G., Resende, M. F., Lin, T., Nguyen, C., Bies, D., ... & Ikeda, H. (2017). A chemical genetic roadmap to improved tomato flavor. *Science*, 355(6323), 391-394.
- Tikunov, Y., Lommen, A., De Vos, C. R., Verhoeven, H. A., Bino, R. J., Hall, R. D., & Bovy, A. G. (2005). A novel approach for nontargeted data analysis for metabolomics. Large-scale profiling of tomato fruit volatiles. *Plant physiology*, 139(3), 1125-1137.
- Toledo-Martín, E. M., García-García, M. C., Font, R., Moreno-Rojas, J. M., Gómez, P., Salinas-Navarro, M., & Del Río-Celestino, M. (2016). Application of visible/near-infrared reflectance spectroscopy for predicting internal and external quality in pepper. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(9), 3114-3125.
- Torres, I., Pérez-Marín, D., De la Haba, M. J., & Sánchez, M. T. (2015). Fast and accurate quality assessment of Raf tomatoes using NIRS technology. *Postharvest Biology and Technology*, 107, 9-15.

- Uriarte, M. C., Baeza, J. A., & de Pablo Valenciano, J. (2017). Analysis of Spain's competitiveness in the European tomato market: An application of the Constant Market Share method. *Spanish journal of agricultural research*, 15(3), 1.
- Vaes-Petignat, S., & Nentwig, W. (2014). Environmental and economic impact of alien terrestrial arthropods in Europe. *NeoBiota*, 22, 23-42.
- Valcárcel, M., Leiva-Brondo, M., Macua, J. I., Lahoz, I., González, A., Campillo, C., ... & Cebolla-Cornejo, J. (2014, June). Effect of deficit irrigation on the sugar and acid profile of processing tomato cultivars. In *XIII International Symposium on Processing Tomato 1081* (pp. 141-146).
- Van Deynze, A., Stoffel, K., Buell, C. R., Kozik, A., Liu, J., van der Knaap, E., & Francis, D. (2007). Diversity in conserved genes in tomato. *Bmc Genomics*, 8(1), 465.
- Vermeir, S., Beullens, K., Mészáros, P., Polshin, E., Nicolai, B. M., & Lammertyn, J. (2009). Sequential injection ATR-FTIR spectroscopy for taste analysis in tomato. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 137(2), 715-721.
- Vinha, A. F., Barreira, S. V., Costa, A. S., Alves, R. C., & Oliveira, M. B. P. (2014). Organic versus conventional tomatoes: Influence on physicochemical parameters, bioactive compounds and sensorial attributes. *Food and chemical toxicology*, 67, 139-144.
- Vogel, J. T., Tan, B. C., McCarty, D. R., & Klee, H. J. (2008). The carotenoid cleavage dioxygenase 1 enzyme has broad substrate specificity, cleaving multiple carotenoids at two different bond positions. *Journal of Biological Chemistry*, 283(17), 11364-11373.
- Walsh, K. B., Guthrie, J. A., & Burney, J. W. (2000). Application of commercially available, low-cost, miniaturised NIR spectrometers to the assessment of the sugar content of intact fruit. *Functional Plant Biology*, 27(12), 1175-1186.
- Walsh, K., Kawano, S. (2009). Near infrared spectroscopy. In: Zude, M. (Ed.), *Optical Monitoring of Fresh and Processed Agricultural Crops*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 192-239. Weldegebreal, B., Redi-Absh
- Wang, A., Hu, D., & Xie, L. (2014). Comparison of detection modes in terms of the necessity of visible region (VIS) and influence of the peel on soluble solids content (SSC) determination of navel orange using VIS-SWNIR spectroscopy. *Journal of food engineering*, 126, 126-132.
- Wang, Y., Huang, T., Liu, J., Lin, Z., Li, S., Wang, R., & Ge, Y. (2015). Soil pH value, organic matter and macronutrients contents prediction using optical diffuse reflectance spectroscopy. *Computers and Electronics in Agriculture*, 111, 69-77.
- Warner, J., Zhang, T. Q., & Hao, X. (2004). Effects of nitrogen fertilization on fruit yield and quality of processing tomatoes. *Canadian Journal of Plant Science*, 84(3), 865-871.
- Wei, L., & Guohua, H. (2015). Kiwi fruit (*Actinidia chinensis*) quality determination based on surface acoustic wave resonator combined with electronic nose. *Bioengineered*, 6(1), 53-61.
- Wei, X., Zhang, Y., Wu, D., Wei, Z., & Chen, K. (2018). Rapid and Non-Destructive Detection of Decay in Peach Fruit at the Cold Environment Using a Self-Developed Handheld Electronic-Nose System. *Food analytical methods*, 11(11), 2990-3004.

- Wen, T., Zheng, L., Dong, S., Gong, Z., Sang, M., Long, X., ... & Peng, H. (2019). Rapid detection and classification of citrus fruits infestation by *Bactrocera dorsalis* (Hendel) based on electronic nose. *Postharvest biology and technology*, *147*, 156-165.
- Westad, F., & Marini, F. (2015). Validation of chemometric models—a tutorial. *Analytica Chimica Acta*, *893*, 14-24.
- Wilkerson, E. D., Anthon, G. E., Barrett, D. M., Sayajon, G. F. G., Santos, A. M., & Rodriguez-Saona, L. E. (2013). Rapid assessment of quality parameters in processing tomatoes using hand-held and benchtop infrared spectrometers and multivariate analysis. *Journal of agricultural and food chemistry*, *61*(9), 2088-2095.
- Williams, P., & Norris, K. (1987). *Near-infrared technology in the agricultural and food industries*. American Association of Cereal Chemists, Inc..
- Williams, P. (2001). Implementation of near-infrared technology. In: Williams, P., Norris, K. (Eds.), *Near Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*. American Association of Cereal Chemists, St Paul, MN, USA, pp. 145–169.
- Wills, R. B. H.; T. H. Lee; D. Grahan; W. B. McGlasson and E. G. Hall. (1981). *Postharvest. An introduction to the physiology and handling of fruits and vegetables*. New South Wales University Press Limited, Kensington, Australia. 150 pp..
- Wilson, A., & Baietto, M. (2009). Applications and advances in electronic-nose technologies. *Sensors*, *9*(7), 5099-5148.
- Wilson, R. H., Slack, P. T., Appleton, G. P., Sun, L., & Belton, P. S. (1993). Determination of the fruit content of jam using Fourier transform infrared spectroscopy. *Food chemistry*, *47*(3), 303-308.
- Wohltjen, H., & Dessy, R. (1979). Surface acoustic wave probe for chemical analysis. I. Introduction and instrument description. *Analytical Chemistry*, *51*(9), 1458-1464.
- Wold, J. P., Airado-Rodríguez, D., Holtekjølen, A. K., Holopainen-Mantila, U., & Sahlstrøm, S. (2017). Rapid and Nondestructive Determination of Aleurone Content in Pearling Fractions of Barley by Near-Infrared (NIR) and Fluorescence Spectroscopies. *Journal of agricultural and food chemistry*, *65*(8), 1813-1821.
- Wold, S., Antti, H., Lindgren, F., & Öhman, J. (1998). Orthogonal signal correction of near-infrared spectra. *Chemometrics and Intelligent laboratory systems*, *44*(1-2), 175-185.
- Xie, L., Wang, A., Xu, H., Fu, X., & Ying, Y. (2016). Applications of near-infrared systems for quality evaluation of fruits: a review. *Transactions of the ASABE*, *59*(2), 399-419.
- Xu J, Zhao X, Sun K, Wang Z, Tu K (2016) Determination on freshness of strawberry based on electronic nose and ethanol sensor. *Food Mach* *32*:117–121.
- Xu, L., Yu, X., Liu, L., & Zhang, R. (2016). A novel method for qualitative analysis of edible oil oxidation using an electronic nose. *Food chemistry*, *202*, 229-235.
- Xu, S., Sun, X., Lu, H., Yang, H., Ruan, Q., Huang, H., & Chen, M. (2018). Detecting and monitoring the flavor of tomato (*Solanum lycopersicum*) under the impact of postharvest handlings by physicochemical parameters and electronic nose. *Sensors*, *18*(6), 1847.

- Yang, D., & Ying, Y. (2011). Applications of Raman spectroscopy in agricultural products and food analysis: A review. *Applied Spectroscopy Reviews*, 46(7), 539-560.
- Yelle, S., Chetelat, R. T., Dorais, M., DeVerna, J. W., & Bennett, A. B. (1991). Sink metabolism in tomato fruit: IV. Genetic and biochemical analysis of sucrose accumulation. *Plant Physiology*, 95(4), 1026-1035.
- Yelle, S., Hewitt, J. D., Robinson, N. L., Damon, S., & Bennett, A. B. (1988). Sink metabolism in tomato fruit: III. Analysis of carbohydrate assimilation in a wild species. *Plant Physiology*, 87(3), 737-740.
- Yeshiwas, Y., & Tolessa, K. (2018). Postharvest quality of tomato (*Solanum lycopersicum*) varieties grown under greenhouse and open field conditions. *International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research*, 9(1), 1-6.
- Yilmaz, E. (2001). The chemistry of fresh tomato flavor. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 25(3), 149-155.
- Ying, X., Liu, W., & Hui, G. (2015). Litchi freshness rapid non-destructive evaluating method using electronic nose and non-linear dynamics stochastic resonance model. *Bioengineered*, 6(4), 218-221.
- Young, T. E., Juvik, J. A., & Sullivan, J. G. (1993). Accumulation of the components of total solids in ripening fruits of tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 118(2), 286-292.
- Zanor, M. I., Osorio, S., Nunes-Nesi, A., Carrari, F., Lohse, M., Usadel, B., ... & Sulpice, R. (2009). RNA interference of LIN5 in tomato confirms its role in controlling Brix content, uncovers the influence of sugars on the levels of fruit hormones, and demonstrates the importance of sucrose cleavage for normal fruit development and fertility. *Plant physiology*, 150(3), 1204-1218.
- Zhang, D., Xu, L., Wang, Q., Tian, X., & Li, J. (2019). The Optimal Local Model Selection for Robust and Fast Evaluation of Soluble Solid Content in Melon with Thick Peel and Large Size by Vis-NIR Spectroscopy. *Food Analytical Methods*, 12(1), 136-147.
- Zhang, W., Pan, L., Zhao, X., & Tu, K. (2016). A study on soluble solids content assessment using electronic nose: persimmon fruit picked on different dates. *International journal of food properties*, 19(1), 53-62.
- Zhao, X. J., Wu, H. L., Pan, L. Q., & TU, K. (2015). Nondestructive prediction of postharvest strawberry quality by electronic nose. *Food Sci*, 35, 105-109.
- Zhao, Z., Tian, F., Liao, H., Yin, X., Liu, Y., & Yu, B. (2016). A novel spectrum analysis technique for odor sensing in optical electronic nose. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 222, 769-779.
- Zuppa, M., Distante, C., Persaud, K. C., & Siciliano, P. (2007). Recovery of drifting sensor responses by means of DWT analysis. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 120(2), 411-416.
- Zwaardemaker, H.; Hogewind, F. (1920). On spray-electricity and waterfall-electricity. In *KNAW Proceedings*, Amsterdam, Netherlands. Volume 22, pp. 429-437.

OBJETIVOS

Como se ha visto a lo largo de la introducción, la mejora de la calidad organoléptica en tomate y específicamente el sabor es un objetivo fundamental para, no sólo de cubrir las crecientes demandas de los consumidores, sino también de los agricultores en zonas productivas con mayores costes de producción.

Se trata de un reto complejo, no sólo por la cantidad de compuestos que condicionan la percepción del gusto y el aroma, sino también porque en ambos casos se deben tener en cuenta la interacción entre compuestos. Una interacción que también se da entre grupos, ya que los compuestos volátiles también pueden interferir en cómo se perciben los sólidos solubles a través del gusto.

Este complejo panorama se ve todavía más dificultado por la existencia de fuertes interacciones genotipo x ambiente, que sólo pueden descubrirse a través de ensayos multiambiente. Este tipo de diseños no sólo elevan la complejidad estadística del análisis de resultados de las evaluaciones desarrolladas, sino que además incrementan notablemente el número de muestras que debe manejar un programa de mejora que pretenda abordar la mejora del sabor.

Es cierto que la mejora del sabor como objetivo principal todavía se reduce a materiales concretos destinados a nichos específicos, pero lo cierto es que la evaluación de parámetros relacionados con el sabor se incluye cada vez más en programas de mejora destinados a cubrir otros objetivos más habituales, como la introducción de resistencias a enfermedades. En este caso, se trata de no perjudicar al sabor durante el desarrollo de selecciones encaminadas a cubrir otros caracteres, como ya ha ocurrido anteriormente.

En definitiva, en los programas de mejora ya sea con el objetivo de mejorar el sabor como de no perderlo, lo cierto es que es necesario disponer de herramientas de fenotipado que sean eficientes, baratas y rápidas y que por tanto permitan evaluar grandes cantidades de muestras en poco tiempo.

Aquí es donde cobran un valor fundamental las herramientas de fenotipado indirecto, como la espectrometría infrarroja y los sistemas multisensor, que permiten abaratar los análisis y facilitan la evaluación de un mayor número de muestras. Este es precisamente el objetivo global que pretende cubrir la presente tesis y que se concreta en los siguientes objetivos parciales:

Desarrollar métodos de cuantificación y selección indirectos de compuestos relacionados con la percepción del gusto en tomate mediante espectrometría del infrarrojo cercano y medio.

Desarrollar un método de evaluación indirecto del perfil volátil en tomate mediante sistemas multisensor.

El desarrollo de estos objetivos se ha plasmado en el desarrollo de 3 artículos científicos dirigidos a revistas incluidas en el *Science Citation Index*, dentro del primer cuartil de la clase correspondiente. De ellas, dos ya han sido aceptadas y publicadas y la última está enviada. Se trataría de las siguientes aportaciones:

Ibáñez, G., Cebolla-Cornejo, J., Martí, R., Roselló, S. y Valcárcel, M., 2019. Non-destructive determination of taste-related compounds in tomato using NIR spectra. **Journal of Food Engineering**, 263: 237-242. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.098>

Ibáñez, G., Valcárcel, M., Cebolla-Cornejo, J. y Roselló, S., 2019. FT-MIR determination of taste-related compounds in tomato: a high throughput phenotyping analysis for selection programs. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 99: 5140-5148. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.9760>

Valcárcel, M., Ibáñez, G., Martí, R., Beltrán, J., Cebolla-Cornejo, J., y Roselló, S., 2019. Evaluation of the volatile profile in breeding programs using e-noses: the role of drift correction. **Food Chemistry (Enviado)**.

CAPÍTULO 1

Non-destructive determination of taste-related compounds in tomato using NIR spectra

Journal of Food Engineering 263 (2019) 237–242



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Food Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jfoodeng



Non-destructive determination of taste-related compounds in tomato using NIR spectra



Ginés Ibáñez^a, Jaime Cebolla-Cornejo^{b,1}, Raúl Martí^b, Salvador Roselló^{a,*,1}, Mercedes Valcárcel^b

^a Universitat Jaume I, Unidad Mixta de Investigación Mejora de la Calidad Agroalimentaria UJI-UPV. Departament de Ciències Agràries i del Medi Natural, Avda. Sos Baynat s/n, 12071 Castellón, Spain

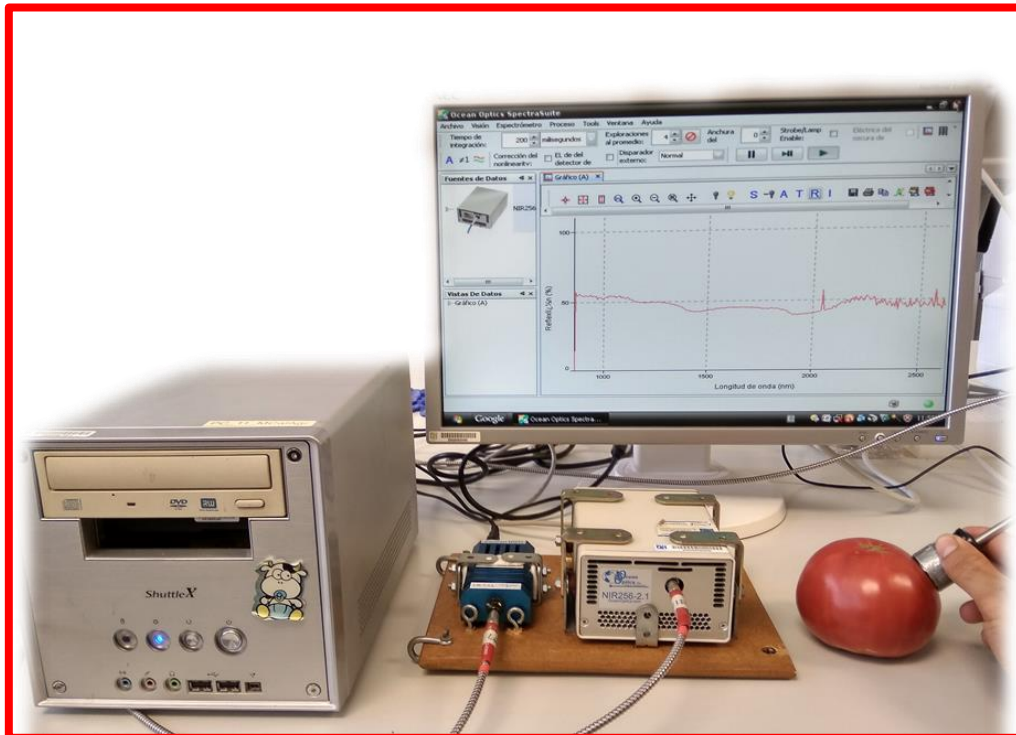
^b Universitat Politècnica de València. Unidad Mixta de Investigación Mejora de la Calidad Agroalimentaria UJI-UPV. COMAV. Cno. de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
 Fructose
 Glucose
 Citric
 Breeding
 Solanum lycopersicum L.

ABSTRACT

Near infrared (NIR) diffuse reflectance was used to predict the contents of taste-related compounds of tomato. Models were obtained for several varietal types including processing tomato, cherry and cocktail tomato, mid-sized tomato and tomato landraces, with a wide range of varieties. Good performance was obtained for the prediction of soluble solids, sugars and acids, considering a non-destructive methodology applied to fruits with different internal structure. Specific models averaged RMSEP (%mean) values lower than 6.1% for SSC, 13.3% for fructose, 14.1% for glucose, 12.7% for citric acid, 13.8% for malic acid and 21.9% for glutamic acid. The performance was dependent on varietal type. General models with a higher number of samples and variation did not improve the performance of specific models. The models obtained, either specific or general, couldn't be extrapolated to external assays and an internal calibration would be required for each assay in order to provide a reliable performance.



CAPÍTULO 1

Non-destructive determination of taste-related compounds in tomato using NIR spectra

Ginés Ibáñez^a, Jaime Cebolla-Cornejo^{b1}, Raúl Martí^b, Salvador Roselló^{a1*}, Mercedes Valcárcel^b

^a*Universitat Jaume I, Unidad Mixta de Investigación Mejora de la Calidad Agroalimentaria UJI-UPV. Departament de Ciències Agràries i del Medi Natural, Avda. Sos Baynat s/n, 12071 Castellón, Spain*

^b*Universitat Politècnica de València. Unidad Mixta de Investigación Mejora de la Calidad Agroalimentaria UJI-UPV. COMAV. Cno. de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain*

¹These authors contributed equally to the work

Abstract

Near infrared (NIR) diffuse reflectance was used to predict the contents of taste-related compounds of tomato. Models were obtained for several varietal types including processing tomato, cherry and cocktail tomato, mid-sized tomato and tomato landraces, with a wide range of varieties. Good performance was obtained for the prediction of soluble solids, sugars and acids, considering a non-destructive methodology applied to fruits with different internal structure. Specific models averaged RMSEP (%mean) values lower than 6.1% for SSC, 13.3% for fructose, 14.1% for glucose, 12.7% for citric acid, 13.8% for malic acid and 21.9% for glutamic acid. The performance was dependent on varietal type. General models with a higher number of samples and variation did not improve the performance of specific models. The models obtained, either specific or general, couldn't be extrapolated to external assays and an internal calibration would be required for each assay in order to provide a reliable performance.

Keywords: Fructose, glucose, citric, breeding, *Solanum lycopersicum* L.

1. Introduction

Consumers are often disappointed with the flavor of tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.). Several causes explain this situation, ranging from poor genetic material to harvest and handling procedures (Baldwin et al., 2000). Tomato flavor is defined by taste and aroma. Taste is determined by the accumulation of sugars, mainly fructose and glucose, organic acids, mainly citric and malic acid, and the relationship among them. A prominent role for glutamic acid has also been suggested (Bucheli et al., 1999). Increased levels of sugars and acids raised flavor acceptability, though there are maximum levels of acids above which further increases negatively affect consumer acceptability (Malundo et al., 1995). On the other hand, tomato aroma is defined by the accumulation of volatiles. Unlike other crops, aroma in tomato is rather complex, determined by the accumulation and interaction of multiple volatile compounds with none of them holding a prominent role (Baldwin et al., 2000).

Both taste and aroma are also inter-related. Some volatiles associated with fruity or floral notes can enhance the perception of sweetness, and other related to green notes can enhance the perception of sourness (Baldwin et al., 1998). On the other hand, sugars also affect aroma perception. Increased sugar levels enhance the perception of overall, ripe tomato, sweet tomato and tropical aroma notes. Furthermore, increased levels of acids also affect aroma perception. In this case, raising the perception of overall, tropical, ripe tomato and green aroma notes. It also causes a shift from floral and sweet tomato aroma and sweet taste towards bitter and citrus tastes and earthy, green, viney and musty notes (Baldwin et al., 2008).

The development of high-quality tomato productions has become an important objective in order to supply market segments, where some customers value niche products characterized by organoleptic features, giving less importance to the visual quality of the product and willing to pay a premium price (Bazzani and Canavari, 2013). This added value is especially important in the current market context, as after the financial crisis, the level of volatility in tomato prices is especially high and although the prices of tomato for consumers seem to be quite stable, price fluctuations in the chain damage the rest of the agents (Sidhoum and Serra, 2016).

For this purpose, it is necessary to develop new high-quality varieties to offer improved genotypes, to evaluate the growing conditions that optimize the expression of these genotypes and finally to monitor the production to assure quality standards. Although the recovery of positive alleles involved in the accumulation of volatile compounds that were present in tomato landraces has been proposed (Tieman et al. (2017), the truth is that it is not feasible to analyze the aroma of high quantity of samples at an affordable cost. Accordingly, most emphasis has been placed in the evaluation the accumulation of the sugar and acids, which also play a crucial role in the improvement of tomato flavor. Traditionally, these taste-related compounds have been indirectly measured with gross determinations involving soluble solid contents (SSC) and titratable acidity. But it has been described that sucrose equivalents calculated from the individual accumulation of fructose and glucose is a far better predictor of sweetness and tomato acceptability (Baldwin et al., 1998). And the same applies to organic acids, as it has been reported the positive influence of free acids on sourness (Tandon et al., 2003).

Near-infrared (NIR) spectroscopy offers several advantages over the precise determination of sugars and acids via direct analytical methods based on high pressure liquid chromatography or capillary electrophoresis. It entails an indirect analysis, as NIR data is related to the actual sugar and acid content using chemometrics. Different algorithms have been used for this purpose. In the case of fruit and vegetables the most widely used are least squares regression, LSR, multiple linear regression, MLR, partial least squares, PLS, and principal component regression, PCR (Naes et al., 2002). Among them, PLS is usually preferred over other alternatives for quantification purposes, and PCA as an explorative method (Bureau et al., 2019). In fact, most researches involving spectroscopic data and with NIR and FTIR data choose PLS models (Arendse et al., 2018; Bureau et al., 2019).

The most notable advantage of NIR indirect quantification is that it enables non-destructive indirect determinations, highly valuable in applications that require straightforward, speedy characterization of samples (Blanco and Villarroya, 2002). For this purpose, it has been used in quality analysis of fruits and vegetables. But most works related to taste are targeted to predict gross measurements such as soluble solids contents (SSC) or titratable acidity and using a limited number of varieties (Arendse et al., 2018). Nevertheless, the lacking availability of scientific evidence of the accuracy of these systems is considered a major drawback (Porep et al., 2015).

In this context, several questions have driven the development of the present work. Can efficient NIR PLS regression models be obtained to predict not only SSC but also major sugars and acids in diverse heterogeneous materials with similar characteristics? And in that case, are particular calibrations needed for each assay or general models can be satisfactorily extrapolated?

2. Material and methods

2.1. Plant material

Five sets of samples, each one with a specific material, were used to develop prediction models. The sample sets were configured considering varietal types, usually determined by their size (e.g. cherry and cocktail tomato) and purpose (e.g. processing tomato). The first sample set included 180 samples belonging to eight processing tomato varieties grown with different water and fertilization regimes in Navarra (Spain). The 168 samples from the second sample set were similar but were obtained in Extremadura, a different environment with warmer and sunnier conditions. These samples were obtained during the development of different agronomical studies (Lahoz et al., 2016; Martí et al., 2018). In both cases the fruits had a width in the range of 40-50 mm. The third sample set included 106 samples of 32 varieties of cherry and cocktail tomato (width range 20-35 mm) obtained from local markets. The fourth sample set was more heterogeneous. It represented 108 samples of mid-sized tomatoes (width range 40-82 mm) from 25 varieties including ribbed flat, rounded, plum and cluster tomatoes from commercial and landrace varieties. It was also obtained from local markets. Finally, the fifth sample set included 88 samples of 11 accessions of Spanish tomato landraces (width range 60-120 mm) of the

“Moruno” type, ribbed flat tomatoes similar to the beef type, grown in Albacete (Spain) and kindly provided by Dr. Moreno.

Each specific sample set and a general set with the 650 tomato samples were used for the calculation of models predicting SSC, sugar and acid contents from NIR spectra. In all cases, fully ripe fruits were sampled.

2.2. Acquisition of NIR spectra

All the fruits were washed with water and dried with cellulose tissue. The measurements of the NIR spectrum were carried out at four different and equidistant points in the equatorial peripheral zone of each fruit, as following the four cardinal points, (Hahn, 2002), and measurements were averaged. The spectrum was obtained with a portable NIR spectrometer (Ocean Optics, Dunedin, FL, USA) with an InGaAs detector, covering the range between 902 and 2094 nm, with measurements spaced 6.80 nm, and an optic fibre probe that allowed measurements directly on fruits using diffuse reflectance. The same probe was used for all the varieties independently of the size of the fruit, and if had a space of 20mm between the optical fibre and the edge of the probe. In order to calibrate the equipment a Teflon disk was used as reference, measuring the spectra several times per day.

2.3. Quantification of sugars and acids with capillary electrophoresis

Once the NIR spectra were acquired, the tomatoes were crushed and homogenized. The determination of the soluble solids content was carried out with the obtained tomato juice using a Pocket PAL- α digital refractometer (Atago, Tokyo, Japan). The remaining sample was stored at -80°C until the other analytical determinations were made.

The quantification of the reducing sugars fructose and glucose and the organic acids citric, malic and glutamic acids was performed by capillary zone electrophoresis (CZE) with an Agilent 7100 equipment (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) following the method described by Cebolla-Cornejo et al. (2012).

2.4. Chemicals and reagents

Fructose, glucose, citric, malic and glutamic acids, hexadimethrine bromide (HDM), and 2,6-pyridine dicarboxylic acid (PDC), and sodium dodecyl sulfate (SDS) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Ultrapure water was obtained using a Milli-Q water system (Millipore, Molsheim, France).

2.5. Data analysis

Each sample set was randomly divided into a calibration group (75% of the samples), used to develop the calibration and cross-validation procedures of partial least squares (PLS) regressions, and a validation group (25% of the samples), used to make predictions with the PLS developed. PLS method was selected considering that it is the preferred method for the quantification of sugars and acids in fruits and vegetables using spectroscopic data (Arendse et al., 2018; Bureau et al., 2019).

Before PLS regression, the NIR spectra pre-treatment was performed transforming the diffuse reflectance measured in absorbance ($\log [1/R]$). Subsequently, signal interferences of a multiplicative type, those due to particle size and those associated with changes in wavelength, were eliminated with the SNV correction algorithm (Barnes et al., 1989).

The predictive models were then obtained by PLS regression (Naes et al., 2002). The optimal number of latent variables was calculated using the Venetian blinds cross-validation procedure. Root mean squared errors of calibration (RMSEC) and cross-validation (RMSECV) and the respective coefficients of determination were calculated to check the validity of the results. Minimum RMSECV values and number of latent variables were used as the selection criteria for the number of latent variables to be included in the model. New latent variables were included if they provided a reduction of RMSECV higher than 2%.

At this point, the software provides information regarding outliers in the NIR spectra. The considerations explained by Porep et al. (2015) regarding the identification and removal of outliers were taken into account. Consequently, outliers were removed considering the values of the Hotelling T^2 statistics and the Q residues. In the case of response variables, the values of the $\frac{\text{normalized residuals}}{\text{the residuals}}$ (<-3 or >3) and leverage parameters were considered. Then, a definite PLS regression model was recalculated, and the spectra of the samples of the validation group were used to make predictions, calculating the coefficient of determination and root mean squared errors of prediction (RMSEP). RMSEP values were also contextualized using the mean (%mean) of the validation group. Residual prediction deviation (RPD), representing the ratio between the standard deviation of the validation and RMSEP, was calculated to provide a better comparison between models obtained with different samples. Usually, RPD values higher than 2 represent useful models for classification or quantification (Fearn, 2002).

The reliability of the specific models was studied applying each model to the rest of sample sets. In order to analyse the reliability of general models, five new general models were calculated with four of the sample sets for the calibration and cross-validation and they were later applied to predict the contents using the spectra of the remaining specific sample set.

The pre-treatment of the spectra, PLS regression models, detection of outliers, error parameters and goodness of fit for each model were performed with Matlab v 9.4 (Mathworks Inc, Natick, MA, USA) using the PLS_Toolbox v 8.2.1 module (Eigenvector Research Inc, Wenatchee, WA, USA).

3. Results and discussion

The calibration and validation groups for the specific and general model had similar means and coefficients of variation (Table 1). As expected, the set with cherry and cocktail tomatoes had the highest SSC, and contents of fructose, glucose and citric and malic acids. The group with tomato landraces also had high sugar content, but with much lower citric acid accumulation. In general, a higher level of variation was found for acid contents than for sugars.

Table 1. Statistical parameters of the sample sets used for the calibration and validation of PLS models. N_c : number of samples used for calibration; N_v number of samples used for validation. N: Navarra; E: Extremadura.

	Model (N_c/N_v)	Calibration				Validation			
		Mean	SD	Range	CV (%)	Mean	SD	Range	CV (%)
SSC °Brix	Processing tomato N (135/45)	4.53	0.56	3.45-6.10	12.3	4.54	0.48	3.60-5.50	10.6
	Processing tomato E (126/42)	4.57	0.47	3.50-5.80	10.3	4.51	0.41	3.65-5.35	9.2
	Cherry&cocktail (80/26)	5.64	1.08	3.95-9.15	19.1	5.51	1.14	3.50-9.00	20.6
	Mid-sized tomato (81/27)	4.30	0.55	2.95-5.65	12.9	4.31	0.55	3.45-5.40	12.7
	Tomato landraces (66/22)	5.42	0.42	4.30-6.20	7.7	5.32	0.53	4.20-6.20	10.0
	General model (487/163)	4.72	0.58	2.95-9.00	16.9	4.79	0.82	3.45-9.15	17.2
Fructose g kg ⁻¹ fw	Processing tomato N (135/45)	13.42	2.85	5.84-22.42	21.2	12.47	3.12	7.16-19.21	25.0
	Processing tomato E (126/42)	14.46	2.89	8.30-20.04	20.8	14.38	2.44	10.56-18.64	17.0
	Cherry&cocktail (80/26)	19.90	5.63	12.09-38.26	28.3	19.67	5.74	10.35-38.30	29.2
	Mid-sized tomato (81/27)	13.52	3.56	8.15-25.63	26.3	13.86	3.88	8.84-22.75	28.0
	Tomato landraces (66/22)	19.42	2.35	13.85-23.60	12.1	19.02	2.71	13.92-22.95	14.2
	General model (487/163)	15.14	4.36	7.16-38.30	28.8	15.00	4.96	5.09-36.85	33.0
Glucose g kg ⁻¹ fw	Processing tomato N (135/45)	12.15	2.79	6.10-20.87	22.9	11.67	2.54	7.42-17.16	21.8
	Processing tomato E (126/42)	14.08	2.51	7.60-19.69	18.4	13.88	1.82	10.17-18.67	13.1
	Cherry&cocktail (80/26)	17.30	5.91	9.09-37.25	34.2	17.50	6.61	7.71-38.63	37.8
	Mid-sized tomato (81/27)	11.86	3.34	6.73-22.72	28.1	12.24	3.45	7.11-20.14	28.2
	Tomato landraces (66/22)	17.71	2.67	11.02-22.11	15.1	17.26	3.18	11.13-21.86	18.4
	General model (487/163)	13.89	4.11	6.10-38.63	29.6	13.83	4.40	6.24-35.25	31.9
Citric g kg ⁻¹ fw	Processing tomato N (135/45)	4.33	0.81	2.13-7.06	18.7	4.18	0.89	2.22-5.69	21.3
	Processing tomato E (126/42)	3.52	0.61	2.03-5.54	17.4	3.50	0.64	2.36-5.22	18.4
	Cherry&cocktail (80/26)	8.61	1.64	5.38-12.38	19.0	8.22	1.53	5.20-10.72	18.7
	Mid-sized tomato (81/27)	5.79	1.94	2.70-14.03	33.6	5.66	1.73	2.98-9.64	30.6
	Tomato landraces (66/22)	4.47	0.81	2.83-6.02	18.2	4.53	0.89	3.13-6.12	19.5
	General model (487/163)	5.05	2.08	2.03-14.03	41.3	5.13	2.20	2.13-11.73	42.9
Malic g kg ⁻¹ fw	Processing tomato N (135/45)	0.95	0.24	0.37-1.74	25.2	0.91	0.26	0.32-1.27	28.0
	Processing tomato E (126/42)	1.15	0.31	0.48-1.86	26.7	1.21	0.36	0.64-2.00	29.5
	Cherry&cocktail (80/26)	1.42	0.36	0.96-2.55	25.2	1.42	0.54	0.79-3.44	37.6
	Mid-sized tomato (81/27)	1.75	0.65	0.56-4.02	36.9	1.74	0.62	0.56-3.89	35.8
	Tomato landraces (66/22)	1.59	0.50	0.72-2.68	31.7	1.48	0.46	0.82-2.22	30.7
	General model (487/163)	1.26	0.51	0.32-4.02	40.3	1.28	0.51	0.37-3.89	39.7
Glutamic g kg ⁻¹ fw	Processing tomato N (135/45)	1.75	0.41	0.81-2.77	23.5	1.76	0.45	0.87-2.82	25.7
	Processing tomato E (126/42)	1.03	0.36	0.36-2.35	35.3	1.11	0.46	0.45-2.30	41.6
	Cherry&cocktail (80/26)	1.43	0.91	0.28-4.35	63.7	1.40	0.97	0.32-4.10	69.7
	Mid-sized tomato (81/27)	1.71	0.75	0.70-4.25	44.0	1.64	0.69	0.74-3.70	42.1
	Tomato landraces (66/22)	1.97	0.44	0.92-2.88	22.5	1.87	0.45	0.93-2.65	23.8
	General model (487/163)	1.50	0.66	0.28-4.35	43.9	1.50	0.68	0.43-4.22	45.2

3.1. Prediction models

3.1.1. SSC

Most published works based in non-destructive methods for fruits with thin or thick rind have focused their interest in the indirect quantification of basic parameters such as SSC, titratable acidity and pH (Arendse et al., 2018). In the case of SSC, the performance for prediction varies

in each study, with $R^2=0.9$ and $RMSEP=0.4$ for apple (Giovanelli et al., 2014), $R^2=0.88$ and $RMSEP=0.46$ for pear (Xu et al., 2012), $R^2=0.93$ and $RMSEP=0.62$ in peach (Shao et al., 2011) and $R^2=0.82$ and $RMSEP=0.85$ in cherry (Escribano et al., 2017).

Tomato has also received attention. Even though only one variety has been used in most studies, the performance of NIR based predictions have not been always satisfactory. De Oliveira et al. (2014) tried to develop NIR models predicting SCC in different fruits but concluded that the methodology was not appropriate for fruits with heterogeneous internal structure such as tomato. In fact, their performance for prediction with a single variety was $R^2=0.53$ and $RMSEP=0.53$ (% $RMSEP=8.9\%$). Other authors have obtained better performances with their materials. Saad et al. (2015) reached $R^2=0.91$ and $SEP=0.28$, again with a single variety. Ecartot et al. (2013) with the model cultivar "Microtom" obtained a performance for prediction with $R^2=0.82$ and $RMSEP=0.45$. Torres et al. (2015) with an obsolete variety, but highly appreciated in the Spanish market, obtaining performances for the prediction with $R^2=0.60-0.75$ and $SEP=0.83-0.65$, depending on the hardware used. These last results are similar to the previously obtained by Flores et al. (2009) with the same variety and a validation group of 100 samples ($R^2=0.77$ and $SEP=0.68$).

In the present work, the performance was highly dependent on the tomato type considered, with R^2_p values for prediction ranging from 0.92 in tomato landraces to 0.51 for processing tomato grown in Navarra (Table 2). $RMSEP$ values also ranged from 0.14 to 0.46, which represented 2.7% to 8.4% of the mean value of the validation. RPD values were close to 2, considered a limit to define useful models (Fearn, 2002). These values are similar or even improve those obtained in previous works in tomato or other crops. It is true that the range of variation present in the samples of the calibration model was greater than in other works. This was expected as most works deal with a single variety and in the present work several varieties are present in each specific model. But at the same time this fact also represented a challenge, considering that the interference of the internal structure of tomatoes (pericarp width, number and size of locules, juiciness...) would be much higher as it was much more varied, and differences in internal structure hinder the development of efficient models (de Oliveira et al., 2014).

The general model including all the samples had a performance similar to the worse specific model, with $R^2_p=0.62$ and $RMSEP=0.47^\circ\text{Brix}$, which represents 9.8% of the mean contents (Table 2). Despite being higher, the values obtained with the general model are still similar to those described by other works with a limited range of varietal variation, and would still be interesting in order to minimize costs in wide screening programs.

Table 2. Performance of NIR based models using partial least squares (PLS) regression predicting contents of taste-related compounds. SSC: soluble solids content; R^2 coefficient of determination; RMSE: root mean squared error; C: calibration; CV: cross-validation; P: prediction; RPD: residual prediction deviation.

	Model(N _c /N _v)	Outliers	R ² _c	RMSEC	R ² _{cv}	RMSECV	R ² _p	RMSEP	%RMSEP (Mean)	RPD
SSC °Brix	Processing tomato N (135/45)	7	0.89	0.18	0.06	0.69	0.72	0.23	5.1	2.09
	Processing tomato E (126/42)	13	0.81	0.20	0.25	0.43	0.51	0.28	6.2	1.46
	Cherry&cocktail (80/26)	4	0.92	0.31	0.52	0.78	0.87	0.46	8.4	2.48
	Mid-sized tomato (81/27)	10	0.88	0.18	0.64	0.32	0.63	0.34	7.9	1.62
	Tomato landraces (66/22)	4	0.97	0.07	0.33	0.36	0.92	0.14	2.7	3.81
	General model (487/163)	8	0.73	0.41	0.47	0.61	0.62	0.47	9.8	1.74
Fructose g kg ⁻¹ fw	Processing tomato N (135/45)	8	0.73	1.35	0.08	2.91	0.49	1.95	15.6	1.60
	Processing tomato E (126/42)	8	0.78	1.35	0.35	2.44	0.58	1.69	11.7	1.45
	Cherry&cocktail (80/26)	8	0.86	2.07	0.52	4.04	0.81	2.32	11.8	2.47
	Mid-sized tomato (81/27)	9	0.82	1.47	0.29	3.05	0.32	2.94	21.2	1.32
	Tomato landraces (66/22)	7	0.93	0.64	0.19	2.29	0.82	1.15	6.0	2.36
	General model (487/163)	14	0.58	2.76	0.41	3.31	0.47	3.24	21.6	1.53
Glucose g kg ⁻¹ fw	Processing tomato N (135/45)	16	0.78	1.12	0.18	2.39	0.42	1.51	13.0	1.68
	Processing tomato E (126/42)	9	0.75	1.21	0.25	2.23	0.50	1.66	12.0	1.09
	Cherry&cocktail (80/26)	6	0.80	2.47	0.58	3.66	0.62	2.87	16.4	2.30
	Mid-sized tomato (81/27)	14	0.84	1.30	0.28	2.94	0.38	2.49	20.4	1.38
	Tomato landraces (66/22)	6	0.91	0.80	0.22	2.54	0.73	1.49	8.7	2.13
	General model (487/163)	14	0.57	2.54	0.41	2.98	0.46	2.92	21.1	1.51
Citric g kg ⁻¹ fw	Processing tomato N (135/45)	15	0.81	0.28	0.04	0.80	0.71	0.43	10.2	2.08
	Processing tomato E (126/42)	18	0.79	0.25	0.06	0.62	0.65	0.31	8.8	2.08
	Cherry&cocktail (80/26)	5	0.53	1.11	0.22	1.50	0.46	1.17	14.2	1.31
	Mid-sized tomato (81/27)	8	0.68	0.96	0.30	1.47	0.40	1.33	23.5	1.30
	Tomato landraces (66/22)	5	0.94	0.19	0.54	0.57	0.88	0.31	6.9	2.85
	General model (487/163)	23	0.84	0.80	0.73	1.01	0.75	1.00	19.5	2.20
Malic g kg ⁻¹ fw	Processing tomato N (135/45)	4	0.79	0.11	0.30	0.21	0.71	0.15	16.6	1.73
	Processing tomato E (126/42)	9	0.83	0.12	0.52	0.21	0.73	0.16	13.0	2.28
	Cherry&cocktail (80/26)	7	0.81	0.16	0.48	0.27	0.72	0.18	12.6	3.03
	Mid-sized tomato (81/27)	10	0.80	0.23	0.50	0.37	0.62	0.29	16.6	2.14
	Tomato landraces (66/22)	5	0.96	0.10	0.48	0.37	0.90	0.15	10.3	3.01
	General model (487/163)	23	0.69	0.27	0.53	0.35	0.67	0.28	21.9	1.82
Glutamic g kg ⁻¹ fw	Processing tomato N (135/45)	12	0.75	0.20	0.17	0.39	0.35	0.25	14.2	1.80
	Processing tomato E (126/42)	14	0.75	0.18	0.35	0.30	0.54	0.24	21.3	1.95
	Cherry&cocktail (80/26)	4	0.85	0.35	0.62	0.57	0.74	0.48	34.3	2.02
	Mid-sized tomato (81/27)	14	0.73	0.32	0.23	0.59	0.26	0.51	31.2	1.35
	Tomato landraces (66/22)	8	0.94	0.10	0.39	0.34	0.81	0.16	8.7	2.77
	General model (487/163)	30	0.51	0.43	0.31	0.53	0.36	0.50	33.1	1.37

The robustness of the models was tested trying to apply each of the specific models obtained to the samples of the rest of sample sets. On the other hand, new general models were calculated with the data of four of the five sample sets and then they were applied to predict the contents of the remaining one. None of the specific models passed the test (Table 3). The highest R^2_p values for the predictions with external assays was 0.20, and RMSEP values ranged from 0.5 to 5.10 in absolute values, and from 10.6% to 100.2% in values contextualized with the mean.

Among the different models applied to predict the rest of assays, the one corresponding to mid-sized tomatoes and the general models had the lowest mean %RMSEP values (20.2% and 20.6% respectively) with absolute values close to 1°Brix (Table 3). In the case of the new general models, R^2_p values were close to 0, with mean %RMSEP values ranging from 11.1%, when it was applied to predict the contents of processing tomato grown in Extremadura to 35.7%, when applied to make predictions with cherry and cocktail tomato, and averaging 20.6% (Table 3).

On the other hand, when the different models were applied to predict the contents of the samples of processing tomato grown either in Navarra or Extremadura and tomato landraces, a

lower mean %RMSEP was obtained (17.4, 16.6 and 17.8% respectively). The samples from the cherry and cocktail set and mid-sized tomatoes were more difficult to predict using external calibrations.

Table 3. Performance of NIR based models using partial least squares (PLS) regression for cross-predicting soluble solids content in other assays. SSC: soluble solids content; R^2_p coefficient of determination of the predictions; RMSEP: root mean squared error of the predictions. N: Navarra; E: Extremadura. For each sample set (calibration and validation), the number of samples is indicated.

Model calibration	Model validation	R^2_p	RMSEP °Brix	%RMSEP (Mean)
Processing tomato (N) (168 samples)	Processing tomato (E) (180 samples)	0.031	0.65	14.4
	Cherry&cocktail (106 samples)	0.026	5.10	90.9
	Mid-sized tomato (108 samples)	0.002	4.28	100.2
	Tomato landraces (88 samples)	0.126	0.74	13.7
	General (482 samples)	0.002	3.49	72.7
Processing tomato (E) (180 samples)	Processing tomato (N) (168 samples)	0.001	0.71	15.4
	Cherry&cocktail (106 samples)	0.000	2.65	47.2
	Mid-sized tomato (108 samples)	0.003	2.19	51.3
	Tomato landraces (88 samples)	0.202	1.29	23.9
	General (470 samples)	0.010	1.85	38.5
Cherry&cocktail (106 samples)	Processing tomato (N) (168 samples)	0.008	1.05	22.8
	Processing tomato (E) (180 samples)	0.000	0.95	21.1
	Mid-sized tomato (108 samples)	0.006	2.10	49.2
	Tomato landraces (88 samples)	0.101	0.57	10.6
	General (544 samples)	0.021	1.30	28.3
Mid-sized tomato (108 samples)	Processing tomato (N) (168 samples)	0.013	0.61	13.3
	Processing tomato (E) (180 samples)	0.042	0.50	11.1
	Cherry&cocktail (106 samples)	0.005	1.80	32.1
	Tomato landraces (88 samples)	0.157	1.28	23.7
	General (542 samples)	0.001	1.01	21.0
Tomato landraces (88 samples)	Processing tomato (N) (168 samples)	0.027	1.07	23.3
	Processing tomato (E) (180 samples)	0.121	1.13	25.1
	Cherry&cocktail (106 samples)	0.008	1.88	33.5
	Mid-sized tomato (108 samples)	0.030	1.34	31.4
	General (562 samples)	0.014	1.33	28.3
General models (650-model validation)	Processing tomato (N) (168 samples)	0.082	0.56	12.2
	Processing tomato (E) (180 samples)	0.060	0.50	11.1
	Cherry&cocktail (106 samples)	0.004	2.00	35.7
	Mid-sized tomato (108 samples)	0.000	1.15	26.9
	Tomato landraces (88 samples)	0.046	0.91	16.9

It is difficult to compare these results with other works, as it is unusual to find the application of the obtained models to external assays. Escribano et al. (2017), in their work with two cherry varieties tried to apply the models of one of the varieties to the other. In that case, the authors concluded that models for SSC did not need to be specific to the variety to be measured to perform adequately. In the present work, neither specific models nor general models were robust enough as to offer reliable predictions in other assays. Even those developed the same varieties and growing conditions but applied to predict contents of samples obtained in a different environment failed to offer a reliable performance. This result emphasizes the need to develop specific calibrations for each assay in order to minimize the error in the indirect predictions.

3.1.2. Sugars and acids

The performance of specific PLS models for the prediction of fructose and glucose was highly dependent on the varietal type considered. Mean %RMSEP values of 13.3% and 14.1 were obtained for fructose and glucose respectively, with R^2_p values for prediction ranging from 0.32 to 0.82 (Table 2). Nonetheless, the model for mid-sized tomato offered comparatively high errors, up to 21.2% for fructose and 20.4% for glucose. This group was formed by highly heterogeneous varieties, including flat salad type tomato, plum tomato and cluster tomatoes. The rather heterogeneous internal structure of the varieties would be probably originating a higher level of error in the predictions.

The performance of the general model was highly influenced by the worse specific model, with R^2_p for prediction of 0.47 for fructose and 0.46 for glucose and %RMSEP values of 21.6% and 21.1%. As in the case of SSC, general models proved to have low efficacy. Consequently, in this case it would also be recommended to rely on specific models.

Few articles on the determination of specific sugars are available for the quantification of specific compounds, as most published works rely on the determination of basic parameters such as SSC and titratable acidity (Arendse et al., 2018). Among the different limitations of non-destructive NIR spectroscopy for this purpose, the scattering typical of non-transparent media and assignment of NIR bands to specific compounds which absorb in the MIR region have been suggested (Porep et al., 2015). Nonetheless, some data is available. For example, Torres et al. (2015), with a single variety obtained SEP values of 3.8 and 4.0 for fructose and 4.2 for glucose and R^2 values ranging from 0.35 to 0.52, depending on the hardware. Considering mean contents in that work, those values would represent contextualized errors of 20.1%-21.2% for fructose and 19.3% for glucose. Better results were reported by Pedro and Ferreira (2007) with %SEP values of 13.4% for fructose and 11.6% for glucose. In that case, the authors also used diffuse reflectance, but they analyzed samples of tomato concentrate, involving homogenized samples with higher sugar contents. Therefore, a better performance would be logically expected.

The performance of specific models for the indirect quantification of acids was similar to those obtained for sugars, though a worse performance was obtained for glutamic acid. Mean %RMSEP values of 12.7%, 13.8% and 21.9% were obtained for citric, malic and glutamic acid respectively (Table 2). Again, the models for mid-sized tomatoes tended to show a worse performance and the efficiency of the general model was lower than that of the worse specific model. Torres et al. (2015) also modelled citric and malic acid accumulation in their work, obtaining SEP values of 0.81-0.86 and 0.22 respectively, which would represent 18.1-19.2% and 16.5% of the reported mean contents respectively. Most specific models improved these results, while the model for mid-sized tomatoes had similar error levels.

In perspective, mean %RMSEP values obtained in the present work are lower than 15% for fructose, glucose, citric and malic acids, using specific models based on different varieties. These values are considerably good, bearing in mind that they are obtained directly on intact fruits with heterogeneous internal structure. It is true though that the higher level of heterogeneity in fruit internal structure will result in inferior performance, as reported by de Oliveira et al. (2014).

That would mean that in order to develop useful models in the industry, the calibration and prediction groups should be formed by fruits with similar structures.

Models based on FT-MIR can be more accurate than those obtained with NIR (Schulz and Baranska, 2009). But the high absorption of MIR radiation in biological tissues entails a low penetration depth, allowing only superficial measurements of a few micrometers (Porep et al. 2015). That means, that MIR indirect measurements require a previous homogenization of the sample and centrifugation of the juices obtained. Undoubtedly, this prior homogenization contributes to a higher accuracy.

The selection of the most appropriate methodology will remain a decision for each industrial/agronomical application. It will be necessary to choose between high-throughput indirect analysis directly on intact fruits with NIR models, with higher error levels and the need to obtain specific calibrations, or obtaining more accurate indirect measurements with general models, but involving a cumbersome pre-processing of samples.

4. Conclusions

One of the main limitations of non-destructive indirect predictions of taste-related compounds based on NIR spectra is that different internal structures of tomatoes can critically affect the performance of the models. In fact, most of the published work available relies on a single tomato variety. Our work proves that it is possible to obtain models with good performance despite this limitation. These models can include several varieties within a specific varietal type and will represent a valuable tool to quantify gross measurements such as soluble solid contents, or even the individual accumulation of fructose, glucose and citric and malic acids. General models can also be obtained, representing a higher number of samples and variability, but their performance would not be better than specific models. More importantly, models must be calibrated for each assay, as the performance of specific or general models to samples obtained in new assays is unacceptable.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This research was performed despite the lack of direct public funding for its development and thanks to the enthusiasm of the authors. The authors thank Dr. Lahoz and Dr. Campillo for providing processing tomato samples and Dr. Moreno for providing samples from tomato landraces. G. Ibañez thanks Universitat Jaume I for funding his pre-doctoral grant (PREDOC/2015/45).

References

- Arendse, E., Fawole, O. A., Magwaza, L. S., & Opara, U. L. (2018). Non-destructive prediction of internal and external quality attributes of fruit with thick rind: A review. *Journal of Food Engineering*, *217*, 11-23. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.08.009>
- Baldwin, E. A., Scott, J. W., Einstein, M. A., Malundo, T. M. M., Carr, B. T., Shewfelt, R. L., & Tandon, K. S. (1998). Relationship between sensory and instrumental analysis for tomato flavor. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *123*(5), 906-915. <https://doi.org/10.21273/JASHS.123.5.906>
- Baldwin, E. A., Scott, J. W., Shewmaker, C. K., & Schuch, W. (2000). Flavor trivia and tomato aroma: biochemistry and possible mechanisms for control of important aroma components. *HortScience*, *35*(6), 1013-1021. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.35.6.1013>
- Baldwin, E. A., Goodner, K., & Plotto, A. (2008). Interaction of volatiles, sugars, and acids on perception of tomato aroma and flavor descriptors. *Journal of Food Science*, *73*(6), S294-S307. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00825.x>
- Barnes, R. J., Dhanoa, M. S., & Lister, S. J. (1989). Standard normal variate transformation and de-trending of near-infrared diffuse reflectance spectra. *Applied spectroscopy*, *43*(5), 772-777. <https://doi.org/10.1366%2F0003702894202201>
- Bazzani, C., & Canavari, M. (2013). Forecasting a scenario of the fresh tomato market in Italy and in Germany using the Delphi method. *British Food Journal*, *115*(3), 448-459. <https://doi.org/10.1108/00070701311314246>
- Blanco, M., & Villarroya, I. (2002). NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *21*(4), 240-250. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(02\)00404-1](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(02)00404-1)
- Bucheli, P., Voirol, E., de la Torre, R., López, J., Rytz, A., Tanksley, S. D., & Pétiard, V. (1999). Definition of nonvolatile markers for flavor of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as tools in selection and breeding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*(2), 659-664. <https://doi.org/10.1021/jf980875l>
- Bureau, S., Cozzolino, D., & Clark, C. J. (2019). Contributions of Fourier-transform mid infrared (FT-MIR) spectroscopy to the study of fruit and vegetables: A review. *Postharvest biology and technology*, *148*, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.10.003>
- Cebolla-Cornejo, J., Valcárcel, M., Herrero-Martínez, J. M., Roselló, S., & Nuez, F. (2012). High efficiency joint CZE determination of sugars and acids in vegetables and fruits. *Electrophoresis*, *33*(15), 2416-2423. <https://doi.org/10.1002/elps.201100640>
- de Oliveira, G. A., Bureau, S., Renard, C. M. G. C., Pereira-Netto, A. B., & de Castilhos, F. (2014). Comparison of NIRS approach for prediction of internal quality traits in three fruit species. *Food Chemistry*, *143*, 223-230. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.122>

- Ecartot, M., Bączyk, P., Tessarotto, L., & Chervin, C. (2013). Rapid phenotyping of the tomato fruit model, Micro-Tom, with a portable VIS–NIR spectrometer. *Plant Physiology and Biochemistry*, *70*, 159-163. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.019>
- Escribano, S., Biasi, W. V., Lerud, R., Slaughter, D. C., & Mitcham, E. J. (2017). Non-destructive prediction of soluble solids and dry matter content using NIR spectroscopy and its relationship with sensory quality in sweet cherries. *Postharvest Biology and Technology*, *128*, 112-120. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.01.016>
- Fearn, T. (2002). Assessing Calibrations: SEP, RPD, RER and R^2 . *NIR news*, *13*(6), 12-13. <https://doi.org/10.1255%2Fnrn.689>
- Flores, K., Sánchez, M. T., Pérez-Marín, D., Guerrero, J. E., & Garrido-Varo, A. (2009). Feasibility in NIRS instruments for predicting internal quality in intact tomato. *Journal of Food Engineering*, *91*(2), 311-318. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.09.013>
- Giovanelli, G., Sinelli, N., Beghi, R., Guidetti, R., & Casiraghi, E. (2014). NIR spectroscopy for the optimization of postharvest apple management. *Postharvest Biology and Technology*, *87*, 13-20. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.07.041>
- Hahn, F. (2002). AE—Automation and Emerging Technologies: Multi-spectral prediction of unripe tomatoes. *Biosystems Engineering*, *81*(2), 147-155. <https://doi.org/10.1006/bioe.2001.0035>
- Lahoz, I., Leiva-Brondo, M., Martí, R., Macua, J. I., Campillo, C., Roselló, S., & Cebolla-Cornejo, J. (2016). Influence of high lycopene varieties and organic farming on the production and quality of processing tomato. *Scientia Horticulturae*, *204*, 128-137. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.03.042>
- Malundo, T. M. M., Shewfelt, R. L., & Scott, J. W. (1995). Flavor quality of fresh tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as affected by sugar and acid levels. *Postharvest Biology and Technology*, *6*(1-2), 103-110. [https://doi.org/10.1016/0925-5214\(94\)00052-T](https://doi.org/10.1016/0925-5214(94)00052-T)
- Martí, R., Valcárcel, M., Leiva-Brondo, M., Lahoz, I., Campillo, C., Roselló, S., & Cebolla-Cornejo, J. (2018). Influence of controlled deficit irrigation on tomato functional value. *Food Chemistry*, *252*, 250-257. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.098>
- Naes, T., Isaksson, T., Fearn, T., Davies, T. (2002). A User-Friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification. NIR Publications, Chichester, UK.
- Pedro, A. M., & Ferreira, M. M. (2007). Simultaneously calibrating solids, sugars and acidity of tomato products using PLS2 and NIR spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, *595*(1-2), 221-227. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.03.036>
- Porep, J. U., Kammerer, D. R., & Carle, R. (2015). On-line application of near infrared (NIR) spectroscopy in food production. *Trends in Food Science & Technology*, *46*(2), 211-230. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.10.002>
- Saad, A., Jha, S. N., Jaiswal, P., Srivastava, N., & Helyes, L. (2016). Non-destructive quality monitoring of stored tomatoes using VIS-NIR spectroscopy. *Engineering in Agriculture, Environment and Food*, *9*(2), 158-164. <https://doi.org/10.1016/j.eaef.2015.10.004>

- Sidhoum, A., & Serra, T. (2016). Volatility spillovers in the Spanish food marketing chain: The case of tomato. *Agribusiness*, 32(1), 45-63. <https://doi.org/10.1002/agr.21418>
- Shao, Y., Bao, Y., & He, Y. (2011). Visible/near-infrared spectra for linear and nonlinear calibrations: a case to predict soluble solids contents and pH value in peach. *Food and Bioprocess Technology*, 4(8), 1376-1383. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0227-6>
- Schulz, H., & Baranska, M. (2009). Fruits and vegetables. In D. W. Sun (Ed.), *Infrared spectroscopy for food quality analysis and control* (pp. 321-353). New York. Elsevier Inc.
- Tandon, K. S., Baldwin, E. A., Scott, J. W., & Shewfelt, R. L. (2003). Linking sensory descriptors to volatile and nonvolatile components of fresh tomato flavor. *Journal of Food Science*, 68(7), 2366-2371. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb05774.x>
- Tieman, D., Zhu, G., Resende, M. F., Lin, T., Nguyen, C., Bies, D., ... & Ikeda, H. (2017). A chemical genetic roadmap to improved tomato flavor. *Science*, 355(6323), 391-394. <http://dx.doi.org/10.1126/science.aal1556>
- Torres, I., Pérez-Marín, D., De la Haba, M. J., & Sánchez, M. T. (2015). Fast and accurate quality assessment of Raf tomatoes using NIRS technology. *Postharvest Biology and Technology*, 107, 9-15. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.04.004>
- Xu, H., Qi, B., Sun, T., Fu, X., & Ying, Y. (2012). Variable selection in visible and near-infrared spectra: Application to on-line determination of sugar content in pears. *Journal of Food Engineering*, 109(1), 142-147. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.09.022>

CAPÍTULO 2

FT-MIR determination of taste-related compounds in tomato: a high throughput phenotyping analysis for selection programs

Research Article



Received: 19 February 2019

Revised: 16 April 2019

Accepted article published: 21 April 2019

Published online in Wiley Online Library: 24 May 2019

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jsfa.9760

FT-MIR determination of taste-related compounds in tomato: a high throughput phenotyping analysis for selection programs

Ginés Ibáñez,^a Mercedes Valcárcel,^a Jaime Cebolla-Cornejo^{b*} and Salvador Roselló^a



Abstract

BACKGROUND: Tomato taste is defined by the accumulation of sugars and organic acids. Individual analyses of these compounds using high-performance liquid chromatography (HPLC) or capillary zone electrophoresis (CZE) are expensive, time-consuming and are not feasible for large number of samples, justifying the interest of spectroscopic methods such as Fourier-transform mid-infrared (FT-MIR). This work analyzed the performance of FT-MIR models to determine the accumulation of sugars and acids, considering the efficiency of models obtained with different ranges of variation.

RESULTS: FT-MIR spectra (five-bounce attenuated total reflectance, ATR) were used to obtain partial least squares (PLS) models to predict sugar and acid contents in specific sample sets representing different varietal types. A general model was also developed, obtaining R^2 values for prediction higher than 0.84 for main components (soluble solids content, fructose, glucose, and citric acid). Root mean squared error of prediction (RMSEP) for these components were lower than 15% of the mean contents and lower than 6% of the highest contents. Even more, the model sensitivity and specificity for those variables with a 10% selection pressure was 100%. That means that all samples with the 10% highest content were correctly identified. The model was applied to an external assay and it exhibited, for main components, high sensitivities (> 70%) and specificities (> 96%). RMSEP values for main compounds were lower than 21% and 13% of the mean and maximum content respectively.

CONCLUSION: The models obtained confirm the effectiveness of FT-MIR models to select samples with high contents of taste-related compounds, even when the calibration has not been performed within the same assay.

© 2019 Society of Chemical Industry

Supporting information may be found in the online version of this article.

Keywords: *Solanum lycopersicum* L.; sugars; organic acids; plant breeding; quality; FTIR



FT-MIR determination of taste-related compounds in tomato: a high throughput phenotyping analysis for selection programs

Running title: FT-MIR determination of taste-related compounds in tomato

Ginés Ibáñez^a, Mercedes Valcárcel^a, Jaime Cebolla-Cornejo^{b*}, Salvador Roselló^a

^a Unidad Mixta de Investigación Mejora de la Calidad Agroalimentaria UJI-UPV. Departament de Ciències Agràries i del Medi Natural, Universitat Jaume I, Avda. Sos Baynat s/n, 12071 Castelló de la Plana, Spain

^b Unidad Mixta de Investigación Mejora de la Calidad Agroalimentaria UJI-UPV. COMAV. Universitat Politècnica de València, Cno. de Vera s/n, 46022 València, Spain

Abstract

BACKGROUND: Tomato taste is defined by the accumulation of sugars and organic acids. Individual analyses of these compounds using HPLC or CZE are expensive, time-consuming and are not feasible for large number of samples, justifying the interest of spectroscopic methods such as Fourier transform mid-infrared (FT-MIR). This work analysed the performance of FT-MIR models to determine the accumulation of sugars and acids, considering the efficiency of models obtained with different ranges of variation.

RESULTS: FT-MIR spectra (five-bounce attenuated total reflectance, ATR) were used to obtain PLS models to predict sugar and acid contents in specific sample sets representing different varietal types. A general model was also developed, obtaining R^2 values for prediction higher than 0.84 for main components (SSC, fructose, glucose, and citric acid). Root mean squared error of prediction RMSEP for these components were lower than 15% of the mean contents and lower than 6% of the highest contents. Even more, the model sensitivity and specificity for those variables with a 10% selection pressure was 100%. That means that all samples with the 10% highest content were correctly identified. The model was applied to an external assay and it exhibited, for main components, high sensitivities (>70%) and specificities (>96%). RMSEP values for main compounds were lower than 21% and 13% of the mean and maximum content respectively.

CONCLUSION: The models obtained confirm the effectiveness of FT-MIR models to select samples with high contents of taste-related compounds, even when the calibration has not been performed within the same assay.

Keywords: *Solanum lycopersicum* L., sugars, organic acids, plant breeding, quality, FTIR

INTRODUCTION

Consumer complaints on tomato taste became commonplace during the nineties (Bruhn et al., 1991). This discontent helped to consolidate emerging quality markets associated with tomato landraces with recognized organoleptic quality (Cebolla-Cornejo et al., 2007). Several causes explain the loss of organoleptic quality in modern varieties, including the way tomatoes are produced (early harvesting, high nitrogen fertilization, greenhouse cultivation...), conserved (i.e. refrigeration) or selected in breeding programs (Davies y Hobson 1981; Díaz de León-Sánchez et al., 2009; Cebolla-Cornejo et al., 2011; Tieman et al., 2017). This last cause had a strong influence. In part, it was due to negative collateral effects of genes controlling other interesting traits such as *uniform ripening* (*u*), which leads to reduced sugar contents in ripe fruits (Powell et al., 2012), or *rin* and *nor*, which offer long shelf life but affect the production of flavor-related compounds (Osorio et al., 2011; Qin et al., 2012). Nevertheless, probably the main negative effect was due to the strong emphasis placed in the selection for high production and biotic stress resistance and the scant attention paid to fruit flavor.

Tomato flavor is determined by the accumulation of taste-related compounds and aroma volatiles. Among the first, taste depends on the accumulation of sugars, mainly fructose and glucose (with traces of sucrose), organic acids, mainly malic, citric and glutamic acids and the ratios between them. On the other hand, volatiles would not only affect aroma perception but also affect the way that tongue receptors perceive sweetness (Baldwin et al., 1998; Tieman et al., 2017).

In order to redirect breeding programs towards high-quality varieties, it would be necessary to determine the individual accumulation of sugars and acids in selection programs. Especially, when these new materials are targeted to cover segmented tomato markets, that demand quality profiles with subtle taste differences (Causse et al., 2010). For this purpose, taste-related compounds such as sugars and acids can be determined by precise instrumental techniques such as liquid chromatography, HPLC (Agius et al., 2018), or capillary zone electrophoresis, CZE (Cebolla-Cornejo et al., 2012). However, these techniques have a high cost and require qualified personnel for their use. Even more, only a small number of samples can be processed per day considering the duration of analysis.

As an alternative, infrared spectroscopy can provide an indirect quantification of these compounds with several advantages. Its use requires minimum preparation of the sample, it is inexpensive and offers rapid analysis time (Bureau et al., 2019). Although Near-infrared (NIR) spectroscopy has been successfully used in measuring quality attributes of horticultural produces (Nicolai et al., 2007), but sometimes the goodness of the models obtained retrain their application to general screening purposes (García-Martínez et al., 2012) and studies in different contexts have evidenced a better performance of Fourier-transform mid-infrared (FT-MIR) spectroscopy in the quantification of sugars and acids (de Oliveira et al., 2014).

In tomato, FT-MIR models for the quantification of taste-related compounds are scarce. They have been obtained using a wide range of varieties (Scibisz et al., 2011) or a specific varietal type, such as processing tomato (Wilkerson et al., 2013; Ayvaz et al., 2016). Although different FT-MIR methodologies have been tested, Wilkerson et al. (2013) concluded that little difference

was observed comparing the use of triple bounce attenuated total reflectance (ATR) and transmission. In their study, Wilkerson et al. (2013) concluded that increasing the number and diversity of the samples would reduce the impact of irrelevant spectral-variations (noise) in the calibration model, thus resulting in partial least squared regression (PLSR) models with higher correlation coefficients.

In the present study, this premise is addressed: does a higher amplitude of samples and environments really increase the efficiency of FT-MIR models in the prediction of the concentration of taste-related compounds in tomato? At the same time, the feasibility of the use of five-bounce ATR FT-MIR robust models in selection procedures of fresh and processing tomato cultivars is studied. For that purpose, the prediction models obtained were tested with an external assay, including 111 samples, representing the variation produced by changes in the environmental growing conditions.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material

Three sets of samples were used to develop prediction models. Set number 1 included 108 samples of processing tomato of eight varieties grown with different water and fertilization regimes in Extremadura (Spain). Set number 2 included 107 samples of medium sized tomatoes from 25 varieties including beef, rounded, plum and cluster tomatoes from commercial and traditional varieties. Set number 3 included 115 samples of 32 varieties of cherry and cocktail tomato. Samples from set 1 were obtained during the development of different agronomical studies (Lahoz et al., 2016; Martí et al., 2018). Samples from sets 2 and 3 were purchased from local markets.

Each specific sample set and a general set grouping the total 330 tomato samples were used for the construction of models predicting sugar and acid contents from FT-MIR spectra. In all cases, fully ripe fruits were sampled.

A fourth sample set from a different external assay was also obtained. It contained 111 samples of processing tomato representing the same varieties and water regimes of sample set 1, but grown in Navarra (Spain) with different environmental conditions (lower radiation and temperature). Growing conditions were described with higher detail by Martí et al. (2018). These samples were not included in the calculation of the general model and were only used to test the robustness and true prediction capabilities of the model.

Sample preparation

The tomatoes were crushed, homogenized and stored at -80°C until analysis. Subsequently, the samples were thawed and centrifuged at 15680g for 10 minutes, following the conditions reported by Wilkerson et al. (2013) for FT-MIR analysis. Three aliquots of the supernatant were obtained. One of them was used to determine soluble solids content (SSC) with a Pocket PAL- α

digital refractometer (Atago, Tokyo, Japan). The remaining two were used to obtain the FT-MIR spectra and sugar and acid contents via capillary zone electrophoresis (CZE).

Infrared spectroscopy analysis

The absorbance measurements of the FT-MIR spectrum were carried out using a portable Cary 630 FT-MIR spectrometer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), equipped with a DTGS (Deuterated triglycine sulfate) detector and a five-bounce ZnSe ATR. Microlab FT-MIR Software v. B.05.3. (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) was used to acquire the data, selecting a spectral resolution of 4 cm⁻¹ in a range of the average infrared spectrum of 4000-650 cm⁻¹. After reviewing the spectra, and considering previous literature (Wilkerson et al., 2013), only the 1500-900 cm⁻¹ spectra were used for chemometrics.

Two independent spectral measurements (average of 64 consecutive scans) were performed in each sample. Measurements of the reference spectrum (background) were obtained between samples to correct uncontrolled variations in the spectral measurements due to variations in environmental conditions. Between the different measurements, the glass was carefully cleaned with distilled water and dried with cellulose tissues.

CZE analysis

The quantifications of the main reducing sugars (fructose and glucose) and organic acids (citric, malic and glutamic) were performed by capillary zone electrophoresis (CZE) with an Agilent 7100 equipment (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) following the method described by Cebolla-Cornejo et al. (2012).

Data analysis

Three specific prediction models for sample sets 1 to 3 and an additional general model with all these samples was calculated. Each model was calculated using 75% of the sample set (calibration group) to develop the calibration and cross-validation procedures. The remaining 25% of the samples (validation group) were not included in the models and were used to obtain an accurate estimate of the error committed predicting the contents of new samples. Both the calibration and validation groups were randomly selected. In the case of the general model the calibration and validation groups were again randomly selected, independently of the selection made for each specific model.

FT-MIR spectra were pre-treated to eliminate multiplicative signal interferences with a Multiplicative Scatter Correction (MSC) and response variables were autoscaled using the mean and standard deviation. The predictive models were then obtained by least squares partial regression, PLS (Naes et al., 2002). In order to choose the optimal number of latent variables, Venetian blinds cross-validation procedure was applied. In order to check the validity of the model root mean squared errors of calibration (RMSEC) and cross-validation (RMSECV) were calculated. RMSECV values were used as one of the selection criteria for the number of latent

variables to be included in the model. In this sense, new latent variables were not included if they did not lead to a reduction of RMSECV higher than 2%. The second criterion used was to select the lowest possible number of latent variables.

Outliers in the FT-MIR spectra and response variables were identified and removed. The values of the Hotelling T2 statistics and the Q residues were considered for the former and the values of the normalized residuals (<-3 or >3) and leverage parameters were considered for the response variables. After calculating the PLS regression models, the FT-MIR spectra of the samples of the validation group were used to make predictions and root mean squared errors of prediction (RMSEP) were then calculated.

Correlation coefficients (R^2) were calculated for the calibration (R^2_c), cross-validation (R^2_{cv}) and prediction data (R^2_p). RMSEP values were also contextualized using the mean (%mean) and maximum (%maximum) values. Additionally, the predictive capacity of the models was assessed using the dimensionless parameter residual prediction deviation (RPD), which represents the ratio between the standard deviation of the validation and RMSEP, and the range error ratio (RER), which is the ratio between the range in the composition values of the validation samples and the RMSEP. RPD and RER enable a better comparison between models obtained with different samples, especially the former, as RER values are highly dependent on rare high contents. Usually, RPD values should be higher than 2 in order to represent useful models for classification or quantification (Fearn 2002; Vermeir et al., 2009). On the other hand, Williams and Norris (1987) suggested that RER > 10 highly useful models while they would have limited to good application for values between 3 and 10. Additionally, the true prediction performance was assessed with external samples. In order to determine the effectiveness of the general model for screening, sensitivity (true positive rate) and specificity (true negative rate) values were calculated with the general model when a 10% or 20% selection pressure was applied.

The samples of the external model were used to determine if the obtained general model had a reliable performance not only with samples grown in the same environmental conditions (validation group), but also with those harvested in completely different conditions (external sample set).

Spectra pre-treatment, PLS regression models, detection of outliers, error parameters and goodness of fit for each model were performed in Matlab v 9.4 environment (Mathworks Inc, Natick, MA, USA) using the PLS_Toolbox v 8.2.1 module (Eigenvector Research Inc, Wenatchee, WA, USA). A heatmap of the correlations between statistical parameters of the samples and the performance of the PLS regression models was obtained with *Heatmapper* (<http://www.heatmapper.ca/pairwise/>).

RESULTS

The spectra obtained for the tomato samples were characterized by two high absorption areas corresponding to 3700-3000 cm^{-1} and 1750-1500 cm^{-1} (Fig. 1). In the first area, considerable differences were detected among samples, while in the second these differences were limited.

Although absorbance peak in the area $1500\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ was not as high, important differences in this area were detected among samples, especially in the area $1150\text{-}950\text{ cm}^{-1}$.

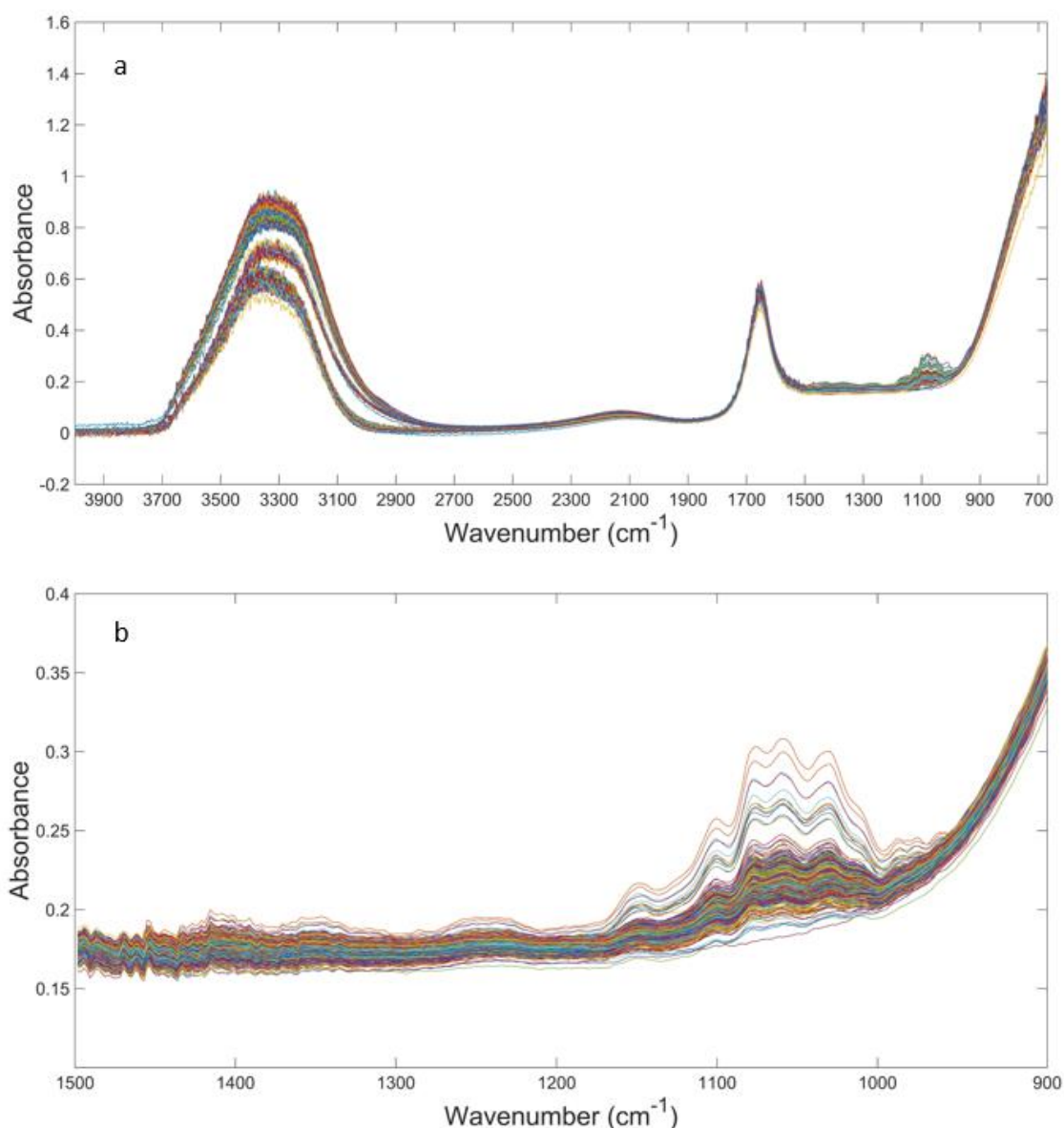


Figure 1: FT-MIR spectra of tomato samples in the $4000\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ region (a) and in the $1500\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ region (b) used for chemometric analysis.

Characterization of sample sets

SSC values obtained were in agreement with the expected values considering the varietal types used. Fresh mid-sized tomatoes had the lowest value, followed by processing tomato and cherry and cocktail tomato (Table 1). Accordingly, fructose and glucose mean contents followed the same distribution. The contents of the acids (citric, malic and glutamic) had a different distribution. Cherry and cocktail maintained higher contents, but fresh mid-sized tomatoes had higher levels of acids compared to processing tomato. For all the models, the samples selected for the validation group, that were used to predict values using the calculated PLS models, represented a similar range of variation (Table 1).

Table 1. Statistical parameters of the samples regarding the accumulation of soluble solids content (SSC), sugars and acids contents using refractometry and capillary zone electrophoresis. For each sample set the characteristics of the samples used for calibration (n_c) and those used for prediction (n_v) are indicated. An external assay was included only to predict values using the general model.

	Calibration group samples					Validation group samples					
	Parameters	Mean	Standard deviation	Coefficient of variation (%)	Minimum	Maximum	Mean	Standard deviation	Coefficient of variation (%)	Minimum	Maximum
Sample set 1 Processing tomato Extremadura ($n_c = 81$; $n_v = 27$)	SSC ^a	4.55	0.42	9.2	3.80	5.55	4.54	0.60	13.1	3.50	5.80
	Glucose ^b	14.16	2.08	14.7	9.84	19.48	14.57	2.50	17.2	10.01	19.69
	Fructose ^b	14.83	2.46	16.6	9.72	19.94	15.14	2.97	19.6	9.03	20.04
	Citric ^b	3.53	0.57	16.0	2.25	5.34	3.62	0.60	16.7	2.53	5.22
	Malic ^b	1.23	0.30	24.1	0.79	1.83	1.25	0.30	23.7	0.87	2.00
	Glutamic ^b	0.96	0.43	44.7	0.36	2.35	1.03	0.41	39.7	0.42	1.96
Sample set 2 Fresh mid-sized tomato ($n_c = 80$; $n_v = 27$)	SSC ^a	4.27	0.55	13.0	2.95	5.40	4.25	0.52	12.3	3.50	5.65
	Glucose ^b	12.10	3.40	28.0	6.73	22.49	11.50	3.31	28.8	6.98	22.72
	Fructose ^b	13.77	3.67	26.7	8.25	25.63	12.99	3.47	26.7	8.15	24.18
	Citric ^b	5.84	1.93	33.0	3.06	14.03	5.43	1.74	32.1	2.70	9.75
	Malic ^b	1.76	0.63	35.6	0.56	4.02	1.73	0.69	39.7	0.56	3.75
	Glutamic ^b	1.70	0.76	44.8	0.71	4.25	1.68	0.68	40.3	0.70	3.25
Sample set 3 Cherry&cocktail tomato ($n_c = 86$; $n_v = 29$)	SSC ^a	5.77	1.44	24.9	3.50	11.35	6.00	1.84	30.7	4.00	12.40
	Glucose ^b	18.14	7.73	42.6	6.73	46.09	19.33	9.13	47.2	10.03	50.42
	Fructose ^b	20.81	7.77	37.3	8.44	51.99	21.57	9.15	42.4	12.41	53.43
	Citric ^b	8.42	1.65	19.6	4.67	12.38	8.36	1.60	19.1	5.20	11.66
	Malic ^b	1.47	0.47	31.6	0.79	3.44	1.50	0.49	32.9	0.96	3.01
	Glutamic ^b	1.60	1.18	73.4	0.32	6.77	1.71	1.47	86.1	0.28	6.43
General model ($n_c = 245$; $n_v = 87$)	SSC ^a	4.91	1.18	23.9	2.95	11.35	4.90	1.31	26.7	3.50	12.40
	Glucose ^b	14.97	5.70	38.1	6.73	46.09	15.17	6.55	43.2	6.73	43.18
	Fructose ^b	16.66	6.17	37.0	8.15	51.99	16.71	6.67	39.9	8.25	53.43
	Citric ^b	5.90	2.43	41.2	2.36	12.38	6.13	2.58	42.1	2.25	14.03
	Malic ^b	1.51	0.54	35.9	0.56	4.02	1.45	0.47	32.4	0.56	3.01
	Glutamic ^b	1.47	0.93	63.1	0.28	6.77	1.43	0.92	64.1	0.32	5.12
External assay Processing tomato Navarra ($n_v = 111$)	SSC ^a						4.66	0.58	12.5	3.45	6.10
	Glucose ^b						12.38	2.82	22.8	6.10	20.87
	Fructose ^b						13.13	3.14	24.6	5.84	22.42
	Citric ^b						4.21	0.85	20.2	2.13	7.06
	Malic ^b						0.84	0.24	28.1	0.32	1.49
Glutamic ^b						1.70	0.42	24.6	0.81	2.82	

^a °Brix

^b g kg⁻¹

The range of variation for each variable differed among sample sets (Table 1). In general, the range of variation for sugars was lower than for acids, with the lowest variation being present for SSC. Processing tomatoes had the lowest range of variation for the accumulation of sugars, followed by fresh mid-sized tomatoes. Cherry and cocktail tomatoes represented the highest levels of variation, not only for sugars but also for glutamic acid. Regarding the rest of acids, mid-sized fresh tomatoes included higher levels of variation. The general model included a high range of composition for all the compounds.

Regarding the external assay, samples grown in Navarra had similar SSC, but lower sugar and higher acid contents than those obtained in the sample set 1, corresponding to Extremadura growing conditions (Table 1).

FT-MIR prediction models

In the three specific sample sets R^2 values for calibration were satisfactory, especially in the case of sugars and SSC, ranging from 0.82 for fructose in the model with mid-sized tomatoes to 0.98 for SSC in the model of cherry and cocktail tomato (Table 2). The R^2 values for calibration of the acids tended to be lower, especially in the mid-sized and cherry tomatoes models. For all the models, R^2 cross-validation values decreased considerably and, at the same time, RMSECV values considerably increased over those obtained for the calibration. Indeed, the cross-validation seemed to be rather tough, as in the three models the R^2 prediction values were higher and RMSEP values were similar or lower than RMSECV.

Table 2. Performance of the partial least squares (PLS) regression models predicting taste-related compounds content from ATR FT-MIR spectra.

Model	Parameters	R^2_C	RMSEC	R^2_{CV}	RMSECV	R^2_P	RMSEP	RMSEP (%Maximum)	RMSEP (%Mean)	RPD	RER
Sample set 1 Processing tomato Extremadura ($n_c=81$; $n_v=27$)	SSC ^a	0.85	0.2	0.50	0.3	0.81	0.2	4.2	5.3	2.5	9.5
	Glucose ^b	0.88	0.7	0.63	1.3	0.79	1.2	5.9	8.0	2.2	8.3
	Fructose ^b	0.88	0.9	0.45	1.9	0.77	1.4	6.8	9.0	2.2	8.1
	Citric ^b	0.90	0.2	0.51	0.4	0.68	0.3	5.6	8.0	2.1	9.3
	Malic ^b	0.82	0.1	0.52	0.2	0.58	0.2	8.5	13.6	1.8	6.7
Sample set 2 Fresh mid-sized tomato ($n_c=80$; $n_v=27$)	Glutamic ^b	0.94	0.1	0.70	0.2	0.83	0.1	7.1	13.6	2.9	11.0
	SSC ^a	0.93	0.1	0.78	0.3	0.91	0.2	3.3	4.4	2.8	11.6
	Glucose ^b	0.83	1.4	0.39	2.7	0.57	2.0	8.8	17.4	1.7	7.9
	Fructose ^b	0.82	1.5	0.30	3.1	0.70	1.6	6.7	12.4	2.2	10.0
	Citric ^b	0.58	1.1	0.39	1.3	0.75	0.9	9.6	17.1	1.9	7.6
Sample set 3 Cherry & cocktail tomato ($n_c=86$; $n_v=29$)	Malic ^b	0.63	0.4	0.09	0.6	0.49	0.4	10.7	23.1	1.7	8.0
	Glutamic ^b	0.54	0.5	0.38	0.6	0.65	0.4	12.6	24.4	1.7	6.2
	SSC ^a	0.98	0.2	0.97	0.3	0.98	0.3	2.6	5.3	5.8	26.5
	Glucose ^b	0.99	0.9	0.94	1.9	0.99	1.1	2.1	5.4	8.7	38.5
	Fructose ^b	0.95	1.8	0.92	2.2	0.93	2.4	4.5	11.2	3.8	17.0
General model ($n_c=245$; $n_v=87$)	Citric ^b	0.76	0.8	0.60	1.0	0.57	1.1	9.0	12.6	1.5	6.1
	Malic ^b	0.92	0.1	0.62	0.3	0.90	0.2	5.3	10.7	3.1	12.8
	Glutamic ^b	0.88	0.4	0.82	0.5	0.89	0.5	7.3	27.5	3.1	13.1
	SSC ^a	0.96	0.2	0.94	0.3	0.95	0.2	1.9	4.9	5.5	37.1
	Glucose ^b	0.92	1.6	0.89	1.8	0.89	1.8	4.3	12.1	3.6	19.8
General model ($n_c=245$; $n_v=87$)	Fructose ^b	0.89	2.1	0.84	2.5	0.87	2.4	4.5	14.3	2.8	18.9
	Citric ^b	0.95	0.6	0.87	0.9	0.90	0.8	5.6	12.7	3.3	15.1
	Malic ^b	0.65	0.3	0.54	0.3	0.54	0.3	9.6	20.0	1.6	8.5
	Glutamic ^b	0.85	0.4	0.75	0.5	0.58	0.4	8.0	28.7	2.2	11.7

^aRMSE values expressed as °Brix; ^bRMSE values expressed as g kg⁻¹; ^cnumber of samples in calibration set; ^dnumber of samples in validation set

SSC: soluble solids content; R^2 : correlation coefficient; RMSE: root mean squared error; C: calibration; CV: cross-validation; P: prediction; RPD: residual prediction deviation; RER: range error ratio.

In processing tomatoes RMSEP (%mean) values for SSC, citric fructose and glucose were lower than 10% and slightly higher (<15%) for glutamic and malic acid (Table 2). The error was equally distributed, and it was similar for samples with low, medium or high contents (fructose predictions are shown as an example, Fig. 2). Consequently, the relative error tended to decrease for increasing contents. When RMSEP was contextualized using the maximum value (%maximum), the percentages of error remained below 9% for all the compounds. In mid-sized tomatoes, RMSEP (%mean) values were lower than 18% for SSC, glucose, fructose, and citric and lower than 25% in the rest of compounds. RMSEP (%maximum) values were lower than 10% for SSC, fructose, glucose and citric and lower than 13% for malic and glutamic acids. In the case of cherry and cocktail tomatoes RMSEP (%mean) values were lower than 15% for all the compounds except for glutamic acid (27.5%) and RMSEP (%maximum) values were lower than 10% for all the compounds.

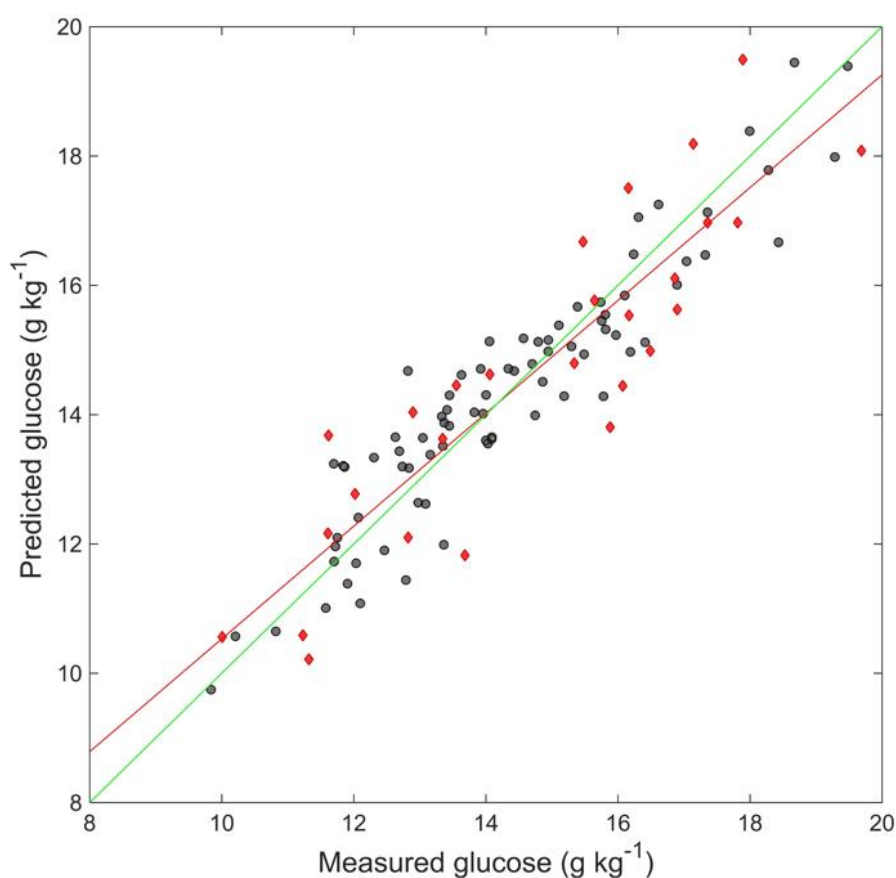
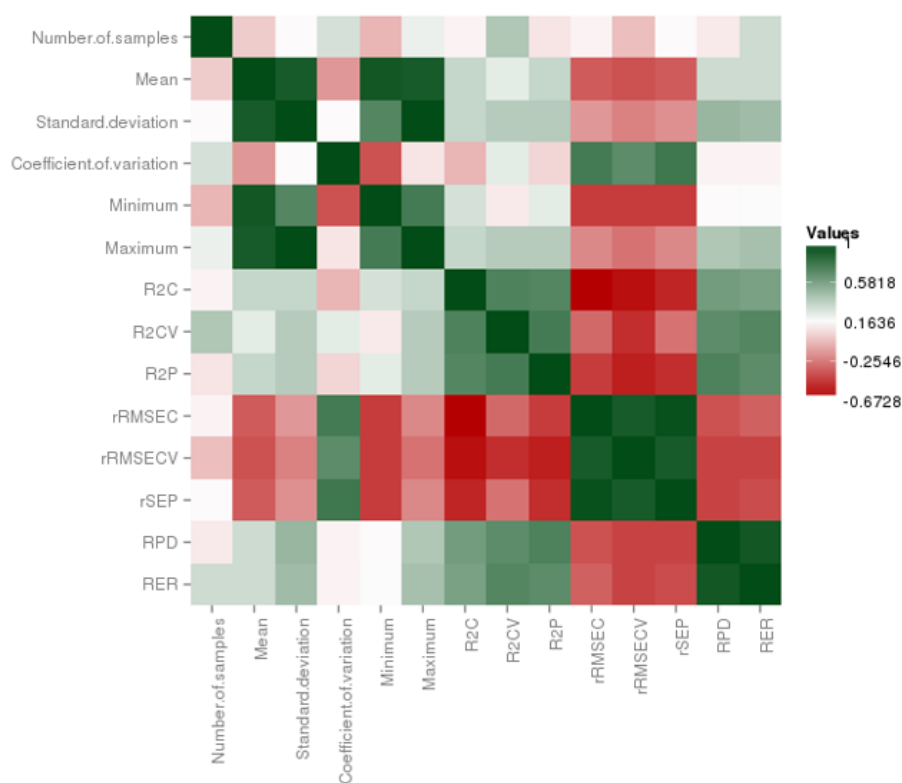


Figure 2. Predicted (ATR FT-MIR) vs. measured (CZE) glucose contents using the partial least squares (PLS) regression model for sample set 1 (processing tomato in Extremadura). Grey dots: samples used to calibrate the PLS model; red diamonds: samples used to predict using the PLS model.

Considering the range of variation represented in the samples, for the three models RPD values were, in general, close to or higher than 2 (Table 2). On the other hand, RER values were higher than 6 for all the variables in processing and mid-sized-tomatoes, and even higher than 10 for most variables in cherry and cocktail tomatoes.

A general model was obtained with the entire set of samples. R^2 values for calibration ranged from 0.65 for malic acid to 0.96 for SSC. R^2 and RMSECV values for cross-validation were similar, to those of the calibration, thus revealing a low impact of cross-validation. R^2 values for the validation group were almost identical to those of the calibration, except for glutamic acid (0.58 vs. 0.75). RMSEP values even improved RMSEC values (mean decrease of 6%). RMSEP %mean and %maximum values for main compounds were lower than 15% and 6% respectively. RPD values were higher than 2.5 for main compounds and RER values were higher than 11 for all the compounds, except for malic acid (8.5).

It seemed that increasing the number of samples did not necessarily lead to a better performance of the model. In fact, after studying different correlations between model and prediction parameters and the description of the sample, it resulted that the highest absolute correlations between relative errors (%mean) and the characteristics of the samples were found with the coefficient of variation and minimum values of the samples (Supp. Figure 1). Specifically, the correlation between the coefficients of variation of the sample sets and relative RMSEC, RMSECV and RMSEP values were 0.75, 0.69 and 0.79 respectively. An inverse relationship was observed between the minimum value of the samples and RMSEC, RMSECV and RMSEP values ($R=-0.46$).



Supplementary figure 1. Heatmap of pairwise correlations between statistical parameters of the model samples and the performance of PLS regression models. rRMSE: root mean squared error/mean*100; C: calibration; CV: cross-validation; P: prediction

Sensitivity (true positive rate) and specificity (true negative rate) values were calculated with the general model to predict the results when a 10 or 20% selection pressure was applied. Sensitivity for a 10% selection pressure was 100% for SSC, glucose, fructose and citric acid and 75% for malic and glutamic acid (Table 3). That means that when 10% of samples with the highest predicted content were selected, all of them had the highest (10%) measured (CZE) values for the main components. Specificity was 100% for main components and higher than 97% for malic and glutamic acids, meaning that within the rejected samples only 3% had high malic or glutamic content. Even for malic and glutamic acid, the mean percentile of CZE measured values of the selected samples was close to 5%, meaning that false positives also had high contents, close to the limit of selection. When a lower selection pressure was applied (selecting the 20% of samples), sensitivity decreased, but it was still higher than 78% for main components. Specificity was higher than 90% in all cases. Mean percentile of CE measured values was below 18% for all the variables.

Table 3. Values of sensitivity and specificity obtained using the general PLS model in plant selection for high content of taste-related constituents when applying a selection pressure of 10% or 20%. Samples from the general model validation set group and the external assay (processing tomato grown in Navarra) were evaluated. Mean percentiles of selected plants are also provided.

General model	10% Selection pressure			20% Selection pressure		
	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Mean percentile (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Mean percentile (%)
SSC	100.0	100.0	5.8	86.7	96.8	11.3
Glucose	100.0	100.0	5.6	87.5	96.9	11.7
Fructose	100.0	100.0	5.4	82.4	92.4	16.0
Citric	100.0	100.0	5.8	78.6	94.6	12.3
Malic	75.0	97.1	5.3	62.5	90.3	13.3
Glutamic	75.0	97.2	6.9	68.8	92.2	17.7

External assay	10% Selection pressure			20% Selection pressure		
	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Mean percentile (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Mean percentile (%)
SSC	88.9	98.8	5.4	73.7	93.4	13.2
Glucose	90.0	98.9	5.8	70.0	92.5	14.0
Fructose	70.0	96.7	7.0	60.0	90.1	21.9
Citric	70.0	96.8	8.0	52.4	88.0	22.0
Malic	40.0	93.6	8.8	47.6	86.6	19.3
Glutamic	60.0	95.7	10.0	42.9	85.4	37.1

Prediction of an external assay

The obtained general model was applied to the prediction of a new assay (111 samples) not included in its development. R^2 values were moderately high in the case of SSC (0.74) and glucose (0.63) and considerably lower in the rest of the cases (Table 4). Nevertheless, RMSEP values (%mean) were lower than 15% for SSC and glucose, lower than 20% for fructose and citric acid and lower than 40% for malic and glutamic acids. RMSEP values (%maximum) were lower than 21% in all cases. The specific model for sample set 1, representing the same varieties but

grown in different environmental conditions was also used for predictions, but it showed a worse performance than the general model (Table 4).

Table 4. Performance of the predictions made for the external assay (processing tomato grown in Navarra; 111 samples) obtained with the general model and the specific model of sample set 1 (processing tomato grown in Extremadura). R^2_p correlation coefficient of the prediction; RMSEP: root mean squared error of the prediction ($^{\circ}$ Brix for SSC and g kg^{-1} for individual compounds).

Model	Parameter	R^2_p	RMSEP	RMSEP (%Mean)	RMSEP (%Maximum)
General model predicting external assay (processing tomato Navarra)	SSC	0.74	0.39	8.4	6.4
	Glucose	0.63	1.74	14.1	8.3
	Fructose	0.34	2.51	19.1	11.2
	Citric	0.25	0.86	20.4	12.2
	Malic	0.18	0.31	36.9	20.8
	Glutamic	0.19	0.49	28.6	17.2
Sample set 1 (processing tomato Extremadura) model predicting external assay (processing tomato Navarra)	SSC	0.56	0.68	14.6	11.12
	Glucose	0.49	2.40	19.4	11.5
	Fructose	0.17	3.66	27.9	16.3
	Citric	0.05	1.07	25.4	15.2
	Malic	0.21	0.24	28.8	16.23
	Glutamic	0.11	0.45	26.2	15.8

When a 10% selection pressure was applied to select material using the general model, sensitivities for main components were higher than 70% and specificities higher than 96% (Table 3). The mean percentile of CZE measured values of the selected samples was lower than 8%. Thus, the false positives included within the selected samples had high values close to the limit of selection. With a lower selection pressure (20%) sensitivities decreased, with good values for SSC and glucose, but lower for fructose (60%) and citric acid (52.4%).

DISCUSSION

Tomato is a complex crop, with specific characteristics associated with different varietal types. For example, it has been proven that the breeding history of processing tomato led to a notable divergence of the genome from fresh tomato varieties (Lin et al., 2014). This divergence is in fact accentuated in chromosome 5, where several QTL for high soluble solid content can be found. This is in part due to the strong selection pressure in processing tomato breeding programs for high SSC. Within fresh tomato, a clear distinction is observed between cherry and other types, such as round or beef tomatoes, with important differences in the metabolic profile (Ursem et al., 2008). In this sense, cherry tomatoes tend to have higher levels of sugars and citric acid and lower levels of malic acid, as it was observed in the present study.

With this level of differentiation, it seems probable that indirect quantification methods for the accumulation of taste-related compounds should be developed specifically for each varietal type. In fact, previous works using FT-MIR prediction for sugar and acid content have been either focussed on processing tomato (Wilkerson et al., 2013; Ayvaz et al., 2016), or using a limited number of varieties. That is the case of Beullens et al. (2006) that applied their model to four varieties or Vermeir et al. (2009) with sets of six and three varieties. Nevertheless, some attempts have been made to include a higher level of diversity. It is the case of the study performed by Scibisz et al. (2011), that included 39 commercial and traditional varieties of, i.a., cherry, cocktail, Marmande, and processing tomato.

Consequently, the results obtained in these studies are not easily compared. Usually, cross-validation performance is provided to assess the robustness of the models. In the present study cross-validation using Venetian blinds proved to be rather tough, as the values for R^2 and RMSE in the prediction improved those of the cross-validation. Nevertheless, the performance of the model predicting values for samples not included in the calibration gives a better idea of its robustness, thus comparisons should be made with prediction performance results. But even then, not always mean values and coefficients of variation are provided to contextualize RMSEP values, and other values such as the dimensionless RPD and RER values are not usually provided. RPD can be interpreted as the ratio of natural variation in the samples to the size of likely prediction errors and RER is similar in spirit, but in this case, it uses the range of variation of the samples instead of the standard deviation (Fearn 2002).

Despite these limitations, some comparisons can be made. In the case of processing tomato, Ayvaz et al. (2016) obtained RMSEP values for glucose of 1.4 g L^{-1} and fructose 1.46 g L^{-1} and SSC of 0.12°Brix , values that contextualized with the mean result in 16%, 17% and 2% for ranges $1.1\text{-}20.2 \text{ g L}^{-1}$, $0.1\text{-}20.4 \text{ g L}^{-1}$ and $3.8\text{-}7.2^\circ\text{Brix}$ respectively. Also with processing tomato, Wilkerson et al. (2013) obtained values of RMSEP with a triple-bounce ATR of 1.47 g L^{-1} , 1.23 g L^{-1} and 0.23 g L^{-1} for glucose, fructose and SSC. In this case, the means were not provided, but samples used for prediction ranged $10.0\text{-}21.4 \text{ g L}^{-1}$ for glucose, $11\text{-}20.6 \text{ g L}^{-1}$ for fructose and $4.2\text{-}6.7^\circ\text{Brix}$ for SSC. These values are similar to those obtained in the present work in the model restricted to processing tomato (RMSEP values of 1.2 g kg^{-1} , 1.4 g kg^{-1} and 0.2°Brix with ranges of $10.01\text{-}19.69 \text{ g kg}^{-1}$, $9.03\text{-}20.04 \text{ g kg}^{-1}$ and $3.5\text{-}5.8^\circ\text{Brix}$ respectively).

Regarding studies with a wider diversity, Scibisz et al. (2011) obtained RMSEP values (contextualized with the mean) for glucose, fructose and SSC of 5.1%, 6.8%, and 2.9% respectively with coefficients of variation of prediction samples of 25%, 20% and 20% respectively. While in our case with the general model RMSEP values were 12.1%, 14.3% and 4.9% with much higher variability in the prediction samples (coefficients of variation of 43.2%, 39.9%, and 26.7% respectively).

Few studies are available where the authors have applied a PLS regression model to samples obtained in an external assay. Among them, Scibisz et al. (2011) obtained models for individual compounds, but the external assay was applied only to predict SSC, total acidity and dry matter. In that case, they obtained an RMSEP (%mean) value for SSC of 4.5%. In the present work, RMSEP was higher 8.4%, but it should be considered that Scibisz et al. (2011) included two varieties and the present work included 8 varieties grown with different water and fertilization regimes (Lahoz

et al., 2016; Martí et al., 2018). It could be argued that the external sample set included varieties already considered in the model and that the samples were obtained in the same years (those studies were performed with samples obtained during two years). It should be considered though, that the general model included not only these eight varieties, but much more. Additionally, previous studies with these materials proved that the site of cultivation had a similar effect or even higher than the year effect on the metabolic profile of tomato (Lahoz et al., 2016; Martí et al., 2018). Even considering the limitation of the external sample set, it seems clear that the potential of using FT-MIR models with external samples would be a real.

The models developed in this work have proved to be robust and reliable for main components (SSC, glucose, fructose and citric acid), with worse models obtained for malic and glutamic acid. Vermeir et al. (2009) also found lower predictivity levels for malic and glutamic acids compared to citric acid. In that case, they justified that the range of variation for these compounds and their concentration was small. Scibisz et al. (2011) also found that the model for malic acid was weak, and also stated that it was probably due to the low concentration found in tomato, in agreement with the results of Rudnitskaya et al. (2006) in apple, pointing out that FT-MIR models were not suitable for minor components. On the other hand, Wilkerson et al. (2013) did not include malic acid in their models, but the characteristics of the glutamic model were similar to those of the citric acid. On the other hand, most published literature shows that models for SSC are much better than those for individual components (Scibisz et al., 2011; Wilkerson et al., 2013; Ayvaz et al., 2016), as in the present work. One plausible explanation is that SSC involves the signal of individual components and it is obviously higher. Nevertheless, SSC indirect prediction has the only advantage of providing an estimate to contextualize new results with previous experiences were no data for individual compounds is available.

Apart from different comparisons, it seems clear that the obtained general model will be highly valuable for screening purposes. RPD values higher than 2 and RER values higher than 10, confirm this point, as these values are considered a threshold to define useful models (Williams y Norris 1987; Fearn 2002; Vermeir et al., 2009). In addition, RMSEP (%maximum) values for SSC, fructose, glucose and citric acid were lower than 6%. This evidences the goodness of the indirect FT-MIR determinations in the selection of materials with outstanding contents of taste-related compounds.

It also seems clear that a general model is most robust than specific models for each varietal type. In our case, this seems to be due to the higher variability included rather than to the use of a higher number of samples, as the performance of the models represented in the RMSE (%mean) values, had a high positive correlation with the coefficient of variation of the sample sets used during the calibration. It also seems that low minimum values of the variables in the samples would interfere with the calculation of good models, as moderate negative correlations were obtained with RMSE (%mean) values. Thus, answering the initial question proposed in this work, a higher amplitude of samples and environments really increases the efficiency of FT-MIR models in the prediction of the concentration of taste-related compounds in tomato.

The feasibility of the use of FT-MIR models in screening activities during breeding programs is clear. The benefits of the use of indirect quantification methods are evident when it is considered that in screening programs for a high content of specific sugars and acids, a notable

contribution of genotype x environment interaction has been described, forcing to develop multi-environmental trials (Galiana-Balaguer et al., 2018). Even more, the considerable amount of variation present within accessions, especially in wild germplasm, leads to the need to analyze individually a high number of plants per accession in order to identify sources of variation. And again, a high number of plants are to be analyzed in segregant populations during the introgression of the trait.

The sensitivity of the PLS regression model when applying a 10% selection pressure is 100%. That means that in order to select the best materials in screening programs, time-consuming and expensive HPLC or CZE determinations can be replaced by rapid and cheap ATR FT-MIR analysis. This is of utmost utility for the development of breeding programs, which still rely on the calculation of gross measures such as SSC due to the cost of implementing selections based on individual compounds.

In indirect spectroscopic analysis, it is usually necessary to perform a calibration for each assay. But in the present work, it has been proven that even applying the general model to an external assay not included in the calibration, as it was possible to obtain sensitivities higher than 70% with 10% selection pressure for main taste-related compounds. Additionally, those false positives corresponded to samples with high contents close to the limit of selection, as the mean percentiles of selected samples were close to the ideal 5%. Thus, even if these samples were selected, their effect on the development of a breeding program would be minimum. Even for quantification purposes, RMSEP values contextualized with maximum values were lower than 13% for main compounds, which is a notable performance, considering that it has been obtained with samples not included in calibration models.

CONCLUSIONS

Our results support the applicability of ATR FT-MIR as a tool to select samples with high contents of SSC, glucose, fructose and citric acid. For that purpose, it would be advisable to use pools of samples with the highest variability to develop robust general models, rather than specific models. Preliminary results using an external sample set with materials grown in a different environment suggest that even though a calibration for each assay is advisable, it would not be necessary for screening programs if a later more precise determination is planned. Even if no further analysis were performed, most selected samples would be close to the selection objective.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was performed despite the lack of direct public funding for its development and thanks to the enthusiasm of the authors. The authors thank Dr. Lahoz and Dr. Campillo for providing samples of processing tomato. G. Ibañez thanks Universitat Jaume I for funding his pre-doctoral grant (PREDOC/2015/45).

REFERENCES

- Agius C, von Tucher S, Poppenberger B, Rozhon W. Quantification of sugars and organic acids in tomato fruits. *MethodsX* :537–550 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.mex.2018.05.014>.
- Ayvaz H, Sierra-Cadavid A, Aykas DP, Mulqueeny B, Sullivan S, Rodriguez-Saona LE. Monitoring multicomponent quality traits in tomato juice using portable mid-infrared (MIR) spectroscopy and multivariate analysis. *Food Control* 66:79–86 (2016). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.01.031>.
- Baldwin EA, Scott JW, Einstein M, Malundo TMM, Carr BT, Shewfelt RL, et al. Relationship between sensory and instrumental analysis for tomato flavor. *J Am Soc Hortic Sci* 123(5):906–915 (1998).
- Beullens K, Kirsanov D, Irudayaraj J, Rudnitskaya A, Legin A, Nicolai BM, et al. The electronic tongue and ATR-FTIR for rapid detection of sugars and acids in tomatoes. *Sensors Actuators, B Chem* 116(1–2):107–115 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.snb.2005.11.084>.
- Bruhn CM, Feldman N, Garlitz C, Harwood J, Ivans E, Marshall M, et al. Consumer perceptions of quality: apricots, cantaloupes, peaches, pears, strawberries,. *J Food Qual* 14(3):187–195 (1991). <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.1991.tb00060.x>.
- Bureau S, Cozzolino D, Clark CJ. Contributions of Fourier-transform mid infrared (FT-MIR) spectroscopy to the study of fruit and vegetables: A review. *Postharvest Biol Technol* 148:1–14 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.10.003>.
- Causse M, Friguet C, Coiret C, LéPicier M, Navez B, Lee M, et al. Consumer Preferences for Fresh Tomato at the European Scale: A Common Segmentation on Taste and Firmness. *J Food Sci* 75(9):531–541 (2010). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01841.x>.
- Cebolla-Cornejo J, Soler S, Nuez F. Genetic erosion of traditional varieties of vegetable crops in Europe: tomato cultivation in Valencia (Spain) as a case Study. *Int J Plant Prod* 1(2):113–128 (2007). <https://doi.org/10.22069/IJPP.2012.531>.
- Cebolla-Cornejo J, Roselló S, Valcárcel M, Serrano E, Beltrán J, Nuez F. Evaluation of Genotype and Environment Effects on Taste and Aroma Flavor Components of Spanish Fresh Tomato Varieties. *J Agric Food Chem* 59(6):2440–2450 (2011). <https://doi.org/10.1021/jf1045427>.
- Cebolla-Cornejo J, Valcárcel M, Herrero-Martínez JM, Roselló S, Nuez F. High efficiency joint CZE determination of sugars and acids in vegetables and fruits. *Electrophoresis* 33(15):2416–2423 (2012). <https://doi.org/10.1002/elps.201100640>.
- Davies JN, Hobson GE. The constituents of tomato fruit — the influence of environment, nutrition, and genotype. *C R C Crit Rev Food Sci Nutr* 15(3):205–280 (1981). <https://doi.org/10.1080/10408398109527317>.
- de Oliveira GA, de Castilhos F, Renard CMGC, Bureau S. Comparison of NIR and MIR spectroscopic methods for determination of individual sugars, organic acids and

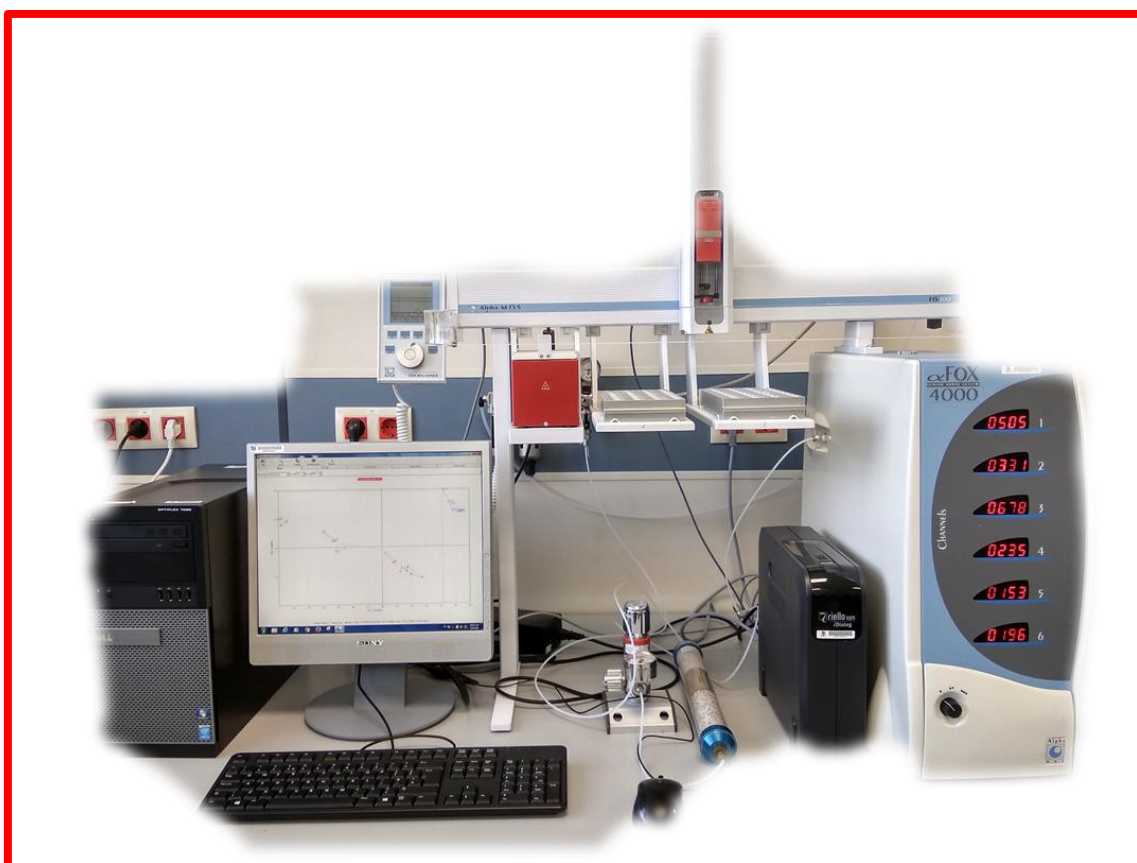
- carotenoids in passion fruit. *Food Res Int* 60:154–162 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.10.051>.
- Díaz de León-Sánchez F, Pelayo-Zaldívar C, Rivera-Cabrera F, Ponce-Valadez M, Ávila-Alejandro X, Fernández FJ, et al. Effect of refrigerated storage on aroma and alcohol dehydrogenase activity in tomato fruit. *Postharvest Biol Technol* 54(2):93–100 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2009.07.003>.
- Fearn T. Assessing calibrations: SEP, RPD, RER and R2. *NIR news* 13(6):12–14 (2002). <https://doi.org/10.1255/nirn.689>.
- Galiana-Balaguer L, Ibáñez G, Cebolla-Cornejo J, Roselló S. Evaluation of germplasm in Solanum section Lycopersicon for tomato taste improvement. *Turkish J Agric For* 42(5):309–321 (2018). <https://doi.org/10.3906/tar-1712-61>.
- García-Martínez, S., Gálvez-Sola, L. N., Alonso, A., Agulló, E., Rubio, F., Ruiz, J. J., & Moral, R. Quality assessment of tomato landraces and virus-resistant breeding lines: quick estimation by near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(6), 1178-1185 (2012). <https://doi.org/10.1002/jsfa.4661>.
- Lahoz I, Leiva-Brondo M, Martí R, Macua JI, Campillo C, Roselló S, et al. Influence of high lycopene varieties and organic farming on the production and quality of processing tomato. *Sci Hortic (Amsterdam)* 204:128–137 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.03.042>.
- Lin T, Zhu G, Zhang J, Xu X, Yu Q, Zheng Z, et al. Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. *Nat Genet* 46(11):1220–1226 (2014). <https://doi.org/10.1038/ng.3117>.
- Martí R, Valcárcel M, Leiva-Brondo M, Lahoz I, Campillo C, Roselló S, et al. Influence of controlled deficit irrigation on tomato functional value. *Food Chem* 252:250–257 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.098>.
- Naes T, Isaksson T, Fearn T, Davies T. A User-Friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification. NIR Publications; 2002.
- Nicolai BM, Beullens K, Bobelyn E, Peirs A, Saeys W, Theron KI, et al. Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review. *Postharvest Biol Technol* 46(2):99–118 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.06.024>.
- Osorio S, Alba R, Damasceno CM, Lopez-Casado G, Lohse M, Zanol MI, et al. Systems Biology of Tomato Fruit Development: Combined Transcript, Protein, and Metabolite Analysis of Tomato Transcription Factor (nor, rin) and Ethylene Receptor (Nr) Mutants Reveals Novel Regulatory Interactions. *Plant Physiol* 157(1):405–425 (2011). <https://doi.org/10.1104/pp.111.175463>.
- Powell ALT, Nguyen CV, Hill T, Cheng KL, Figueroa-Balderas R, Aktas H, et al. Uniform ripening Encodes a Golden. *Science (80)* 336(29):1711–1715 (2012). <https://doi.org/10.1126/science.1222218>.

- Qin G, Wang Y, Cao B, Wang W, Tian S. Unraveling the regulatory network of the MADS box transcription factor RIN in fruit ripening. *Plant J* 70(2):243–255 (2012). <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04861.x>.
- Rudnitskaya A, Kirsanov D, Legin A, Beullens K, Lammertyn J, Nicolai BM, et al. Analysis of apples varieties – comparison of electronic tongue with different analytical techniques. *Sensors Actuators B Chem* 116(1–2):23–28 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.snb.2005.11.069>.
- Scibisz I, Reich M, Bureau S, Gouble B, Causse M, Bertrand D, et al. Mid-infrared spectroscopy as a tool for rapid determination of internal quality parameters in tomato. *Food Chem* 125(4):1390–1397 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.10.012>.
- Tieman D, Zhu G, Resende MFR, Lin T, Nguyen C, Bies D, et al. A chemical genetic roadmap to improved tomato flavor. *Science* (80) 355:391–394 (2017). <https://doi.org/10.1126/science.aal1556>
- Ursem R, Tikunov Y, Bovy A, Van Berloo R, Van Eeuwijk F. A correlation network approach to metabolic data analysis for tomato fruits. *Euphytica* 161(1–2):181–193 (2008). <https://doi.org/10.1007/s10681-008-9672-y>.
- Vermeir S, Beullens K, Mészáros P, Polshin E, Nicolai BM, Lammertyn J. Sequential injection ATR-FTIR spectroscopy for taste analysis in tomato. *Sensors Actuators, B Chem* 137(2):715–721 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.snb.2009.01.056>.
- Wilkerson ED, Anthon GE, Barrett DM, Sayajon GFG, Santos AM, Rodriguez-Saona LE. Rapid assessment of quality parameters in processing tomatoes using hand-held and benchtop infrared spectrometers and multivariate analysis. *J Agric Food Chem* 61(9):2088–2095 (2013). <https://doi.org/10.1021/jf304968f>.
- Williams P, Norris K. Near-infrared technology in the agricultural and food industries. American Association of Cereal Chemists, Inc.; 1987

CAPÍTULO 3

Evaluation of the volatile profile in breeding programs using e-noses: the role of drift correction

(Enviado a Food Chemistry)



Evaluation of the volatile profile in breeding programs using e-noses: the role of drift correction

Running title: Evaluation of the volatile profile in breeding programs using e-noses

Mercedes Valcárcel,[†] Ginés Ibáñez,[‡] Raúl Martí[†], Joaquín Beltrán,[#] Jaime Cebolla-Cornejo,[†] and Salvador Roselló*,[‡]

[‡]Unidad Mixta de Investigación Mejora de la Calidad Agroalimentaria UJI-UPV. Departament de Ciències Agràries i del Medi Natural, Universitat Jaume I, Avda. Sos Baynat s/n, 12071 Castelló de la Plana, Spain

[#]Institut Universitari de Plaguicides i Aigües, Universitat Jaume I, Avda. Sos Baynat s/n, E-12071 Castellón, Spain

[†]Unidad Mixta de Investigación Mejora de la Calidad Agroalimentaria UJI-UPV. COMAV. Universitat Politècnica de València, Cno. de Vera s/n, 46022 València, Spain

*Corresponding author: Phone: +34 964 72 80 98. E-mail: rosello@uji.es

Abstract

E-noses can be routinely used to evaluate and select tomato samples in breeding programs once the sensor drift and standardization issues are adequately solved. Short-term drift can be corrected using a strategy based on a multiplicative drift correction procedure coupled with a PLS adaptation of the Component Correction. It must be performed specifically for each sequence, using all sequence signals data. Long-term drift can be fixed up using a synthetic reference standard mix (with a representation of main aroma volatiles of the species) to be included in each sequence. With this integral strategy, a notable intra-sequence drift correction (up to 1:27 %RSD improvement) and good inter-sequence standardization (94.4% success in overlapping the same material) can be obtained. Combined with PLS-DA two-dimensional graphical representation, e-noses can be used to developed expandable maps of volatile signal similitudes to be used in selection procedures.

Keywords: electronic nose, drift correction, sequence standardization, tomato, selection, breeding.

1. Introduction

During decades of fruit and vegetable breeding programs, the focus was placed on the improvement of productivity whilst trying to minimize losses due to biotic or abiotic stress. At the same time, little emphasis was placed on monitoring the effects of selection on flavor, and, as a side effect, it was negatively affected. This would be the case of tomato. Modern commercial varieties are less flavorful than landraces or heirloom varieties (Tieman et al., 2017). Today we know that one of the main factors under the loss of flavor relies on the loss of alleles related to the contents of aroma volatiles. These not only affect aroma perception, but also taste perception of sugars and acids. With molecular breeding tools, breeding programs can be targeted to recover important lost alleles (Zhao et al., 2019), but in the end, it would be necessary to monitor the evolution of the volatile profile and its proximity or distance to the volatile profile of highly appreciated flavorful materials.

In this context, the use of trained panelists or precise volatile quantifications by gas chromatography-mass spectrometry is discarded considering that these evaluations are too expensive and time-consuming and, consequently, not adequate to evaluate a high number of samples.

As an alternative, electronic noses (e-noses) were designed to evaluate the volatile profiles of agricultural products, mimicking the human olfactory system, with an array of partially selective chemical sensors that react in a different way when exposed to different volatiles and a computerized chemometric system, which processes the electronic signals and extracts feature information using diverse statistical methodologies.

E-noses have been usually applied to classify materials considering their quality characteristics, their origin, the variety or the presence of diseases, additives, adulterations, and off-flavors. For this purpose, they have been applied to different fruits and vegetables including tomato, kiwifruits, peach, nectarine, apple, banana, persimmon, grape, watermelon, strawberry, blackberry, onion, potato and pumpkin (Majchrzak, Wojnowski, Dymerski, Gębicki, & Namieśnik, 2018; Jia, Liang, Jiang, & Wang, 2019). Most of these applications were modeled and tested in a short-term scenario, using a limited number of samples. However, in order to apply this technology to the evaluation of materials in breeding programs it is necessary to assure the capability to process a high number of samples in the same day and to compare them with data obtained in previous assays. By doing so, it would be possible to apply e-noses to selection programs, in which each new sample is compared with reference values obtained in previous assays corresponding to elite materials that stand out for the good impact their volatile profile in aroma and flavor perception and those with plain flavor or presenting off-flavors. From this point of view, the objective would not be centered in classifying a new sample, but to have an idea of its distance to a breeding objective.

In order to take advantage of the advantages of e-noses it would be necessary to overcome the effects of sensor drift. This phenomenon is defined as temporarily or gradual changes in one or some sensor properties which causes distorted response measures and reduces the validity of the electronic fingerprints. It is inevitable and caused by complex and dynamic processes, such as changes in room environmental conditions (temperature or humidity), changes in

composition of measured samples (component interactions), instrument operational disturbances (sensors thermal and memory effects, aging or poisoning) (Marco & Gutierrez-Galvez, 2012; Rudnitskaya, 2018). These changes can be noticed both, in signals within a work sequence (short-term drift) and in signals obtained in different work sequences (long-term drift). The improvement of sensor technology at the manufacturing stage to enhance its stability over time has contributed to reduce these problems. However, despite the advances obtained, a regular calibration is still required to limit the effects of sensor drift. It can be performed using external standards and statistical multivariate calibration models. Nonetheless, multivariate calibration requires large number of samples and frequent re-calibrations of the sensor arrays would limit the number of new samples analyzed. In this sense, model calibration transfer or update and signal standardization using a small number of reference samples represents an interesting solution to keep the system operative for long periods (Rudnitskaya, 2018), and it requires the optimization of data collection and processing in order to obtain more robust multivariate calibration models (Marco & Gutierrez-Galvez, 2012).

In the last two decades, an enormous research effort has been made on different methodologies aimed to properly processing signals and data from electronic noses (reviewed by Gutierrez-Osuna, 2002; Marco & Gutierrez-Galvez, 2012; Rudnitskaya, 2018). Some authors tried to solve data stability problems before developing calibration models using several data preprocessing or feature selection methods. Common examples are the use of several normalization procedures, autoscaling, filtering and baseline corrections to avoid problems due to common-mode perturbations and multiplicative effects, scattering due to changes in concentration and instabilities in sampling and changes in environmental parameters. Other authors proposed the use of univariate methods for drift compensation. Nevertheless, as drift has correlated effects in several sensors, univariate methods cannot exploit these correlations to better estimate and counteract drift. Consequently, the use of multivariate drift compensation and modeling methods was preferred. These multivariate drift modeling and correction methods try to estimate the subspace that contains drift and, with the obtained drift model, correct sensor array signals in new samples. They are most effective when the data set drift occurs in a subspace of small dimensionality but if this subspace also contains discriminant information their effectivity falls down (Marco & Gutierrez-Galvez, 2012). The best known and used is the family group of methods commonly named as Component Correction (CC). These methods assume that sensors in the array have a correlated drift response and this drift has a specific direction, which is the same for all samples. CC methods use different multivariate orthogonal projection methodologies to find and model drift (Artursson, Eklöv, Lundström, Martensson, Sjöström, & Holmberg, 2000; Gutierrez-Osuna, 2000; Di Natale, Martinelli, & D'Amico, 2002; Padilla, Perera, Montoliu, Chaudry, Persaud, & Marco, 2010; Ziyatdinov, Marco, Chaudry, Persaud, Caminal, & Perera, 2010). Other groups of methods are based on splitting sensor signals into two components, low and high frequency, considering the lowest signal component as drift and removing it from the data (Zuppa, Distanto, Persaud & Siciliano, 2007). Other strategies are based on the analysis of several types of time series of sensor signals to model drift (Zhang & Peng, 2016). In general, the main problem of drift modeling methods is the need for relative long series of measurements (several weeks) to obtain an efficient drift correction model. Which would only be valid during a relatively short period of time as their efficacy would

decline gradually and new models would be required (Rudnitskaya, 2018).

Additionally, multivariate calibration update methods are targeted to the recalculation of signal calibration models. Among them, the data standardization group of methods are the most widely used. They are aimed to model a relationship between two experimental conditions and the resulting model is applied to correct signals made in the new experimental situation. To develop standardization models a set of reference samples are measured in both conditions and relationships between initial and new signals can be calculated using several multivariate direct standardization strategies (Tomic, Ulmer, & Haugen, 2002; Deshmukh et al., 2014; Yan & Zhang, 2015; Fernandez, Guney, Gutierrez-Galvez, & Marco, 2016). This approach is used both to transfer calibration models between different instruments and to transfer calibration models for the same instrument in different working conditions (i.e. different periods of time or after sensors substitution). Nevertheless, successful calibration transfers using these data standardization procedures again needs relatively large data sets (Rudnitskaya, 2018). Other multivariate calibration update methods are included in the groups of model expansion, adaptative learning or global models. Model expansion methods are based on building a standardization subset by joining initial data and new data and using it to recalculate the calibration model (Yan & Zhang, 2015; Zhang & Zhang, 2015). Nevertheless, these methods have several validation issues that limit their routine application (Rudnitskaya, 2018). Adaptative learning methods (Vergara, Vembu, Ayhan, Ryan, Homer, & Huerta, 2012; Zhang & Zhang, 2015; Yan & Zhang, 2016) are mainly aimed for classifications and are based on a continuous update of the classifier using unknown samples measured during routine use of e-nose. This approach is attractive because no reference samples or long-term measurements are required. Nevertheless, if not all sensors in the array have similar responses to the drift, the method performance diminishes. Global models propose the inclusion of known sources of variation in the calibration model to make it general and avoid the need for drift modeling and correction (Solórzano et al., 2018). These methods also need a high number of calibration samples and reduce the prediction success compared with individual calibration methods but provide important cost reduction as avoid recalibration (Rudnitskaya, 2018).

It seems clear that, despite the high amount of research on drift correction and calibration update methods developed in the last two decades, these proposals were not routinely used, except for component correction and directed standardization methods. So, although the use of commercial electronic noses for the evaluation, classification, and selection in tomato breeding programs has a huge potential, it is necessary to develop an operating methodology that makes them effective to routinely evaluate wide collections of real samples. The aim of this paper is to test a two-step drift correction and signal standardization strategy for e-nose signals. The first one applies to remove short-term drift, and the second one is used to counteract long-term drift, thus making it possible to compare data obtained in different work sequences. Once these main problems are solved, the development of long-term expandable graphical maps of electronic nose volatile profiles is proposed as a valuable tool to introduce aroma-related volatile profiles in selection procedures within breeding programs.

2. Materials and Methods

2.1 Experimental design

Two different assays were planned. In the first assay, 18 samples with different compositions were used. These samples include real samples from 14 varieties obtained homogenizing whole fruits and mixture standards (four synthetic tomato-like standards with variable volatile composition). Six of the 18 samples were used as controls (the 4 tomato-like standards and 2 tomato varieties) to test the goodness of the drift correction and standardization strategy and the remaining 12 as real samples to complete work sequences. To mimic the evaluation routines applied in breeding programs, these 12 tomato samples were distributed in three different day-work sequences. Consequently, each work-day sequence included the 6 controls and 4 additional tomato samples. Tomato samples were replicated 7 times and tomato-like synthetic standards 4 times in each sequence. All the samples were randomly distributed in each working sequence. The independent study of each one of these three sequences was used to test and correct short-term drift within a work-day sequence. The joint data of all these sequences were used to test the performance of the long-term drift correction between sequences and standardization strategies proposed in this work. To ensure the inclusion of long-term drift in the signal responses, the sequences of this trial were carried out in a 3 months period (one sequence per month) included in the normal routine usage of the equipment.

For a deeper study of the short-term drift, a second assay was designed in order to include a higher number of repetitions (12) per sample. Two consecutive long work sequences (22 hours each) were planned to test seven tomato and one tomato-like synthetic standard (TomSSt_2). All the samples were also randomly distributed within the first replicate of each sequence, and the order was maintained in the rest of the replicates. This design provided data to compare the performance in a whole sequence (12 repetitions/sample in 22 hours) or in a short sequence (4 repetitions/sample in 8 hours approximately) to test the performance of the drift correction strategy proposed in different scenarios.

2.2 Plant material and tomato-like synthetic standards

Tomato-like synthetic standards were developed to obtain a synthetic mixture of main volatile compounds of an average real tomato sample, but with higher stability and reproducibility. For this purpose, a high concentration standard mixture was prepared (TomSSt_4), containing 30 individual volatile compounds at concentrations (Table 1) corresponding to the mean values of representative tomato cultivars with different aromatic profiles (Beltran, Serrano, López, Peruga, Valcárcel, & Roselló, 2006). Three alternative standards were obtained diluting TomSSt_4 to 70% (TomSSt_3), 50% (TomSSt_2) and 30% (TomSSt_1). The dilutions were obtained to cover a wide range of volatile sample concentrations. TomSSt_2 was employed as a reference sample for inter-sequence standardization in long-term drift correction.

Table 1: Tomato-like synthetic standard TomSSt_4's volatile composition (ng mL⁻¹).

Volatile compounds		Volatile compounds	
E-2-hexen-1-ol acetate	0.70	eugenol	13.92
3-methyl thiopropanal	1.12	nonanal	11.12
terpineol (alpha+beta+gamma)	0.56	2-isobutylthiazole	26.40
E-2-hexen-1-ol	1.10	E-2-heptenal	24.96
1-hexanol	2.02	methyl salicylate	892.00
3-carene	2.11	guaiacol	480.00
3-methylbutyl acetate	2.04	E-2-hexenal	702.00
alpha-pinene	1.98	6-methyl-5-hepten-2-one	590.00
gamma-terpinene	2.08	hexanal	800.00
2-carene	7.20	Z-3-hexenal	824.00
linalool	6.60	E-2-octenal	102.00
phenylacetaldehyde	9.20	citral (Z+E)	170.40
2-phenylethanol	12.04	R-limonene	98.00
6-methyl-5-hepten-2-ol	13.64	Z-3-hexen-1-ol	216.80
beta-ionone	13.16	geranyl acetone	114.80

Tomato varieties evaluated in this work represented a wide diversity of fruit shapes, colors, genotypic structures (commercial hybrids and landraces) and origins (Table 2), but also, they represented a wide diversity of organoleptic features. The plant material included four commercial hybrids, “Zayno RZ”, “Divyne RZ”, “Vinchy RZ” (Rijk Zwaan Iberica, Almería, Spain) and “Caramba” (De Ruiter Seeds, Almería, Spain). Four experimental tomato breeding lines (UJI008, UJI011, UJI014, and UJI028) with different fruit sizes. One cherry tomato type accession (BGV004587). Five accessions of local landraces, UJI023 of “de penjar” landrace, BGV005477 accession of a “Morado” landrace, BGV005651 an accession of “Muchamiel” landrace, BGV005718 an accession of “Amarillo” landrace and BGV005655 an accession belonging to the “Valenciano”. The “de penjar” landrace carries with *alcobaça*, *alç*, long-life mutation allelic to the *nor* gene (Casals, Pascual, Cañizares, Cebolla-Cornejo, Casañas & Nuez, 2012) and it results in a very specific aroma volatile evolution (Casals, Cebolla-Cornejo, Roselló, Beltrán, Casañas & Nuez, 2011), “Morado” landrace has external pink color due to the transparent peel typical of the *yellow*, *y*, mutation which alters synthesis of polyphenols and “Amarillo” has yellow flesh color typical of the impairment of carotenoid synthesis resulting from the presence of the *yellow-flesh*, *r*, mutation (reviewed by Cebolla-Cornejo, Roselló & Nuez, 2013) and it, therefore, affects the synthesis of apocarotenoid volatiles.

UJI accessions were obtained from Universitat Jaume I and BGV accessions from the genebank of the Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV).

Table 2. Description of the tomato accessions tested and their assignment in the different work-sequences in the two assays performed.

Code	Accession	1 st assay	2 nd assay	Type of material	Fruit characteristics
1	“Zayno RZ” ^{a,z}	1-2-3	1	Commercial hybrid	Large, rounded, green-red
2	BGV005718 ^{b,x}	1-2-3	1	“Amarillo” landrace	Large, slightly flattened, yellow
3	“Caramba” ^{a,y}	1	1	Commercial hybrid	Large, flattened, green-red
4	UJI011 ^{c,u}	1	1	Breeding line	Large, rounded, red
5	“Divyne RZ” ^{a,z}	1		Commercial hybrid	Medium-large, rounded, red
6	“Vinchy RZ” ^{a,z}	1		Commercial hybrid	Large, rounded, red, long life
7	UJI023 ^{b,u}	2	2	“De penjar” landrace	Small, rounded, red, long life
8	BGV005477 ^{b,x}	2	2	“Morado” landrace	Large, slightly flattened, pink
9	BGV005651 ^{b,x}	2	2	“Muchamiel” landrace	Large, flattened, red-orange,
10	BGV005655 ^{b,x}	2		“Valenciano” landrace	Medium-large, Heart shaped, red-orange
11	BGV004587 ^{b,x}	3		Cherry tomato	Small, rounded, orange-brownish
12	UJI008 ^{c,u}	3		Breeding line	Small, rounded, red
13	UJI014 ^{c,u}	3		Breeding line	Medium-large, slightly flattened, red
14	UJI028 ^{c,u}	3		Breeding line	Small, rounded, red

Tomato types: ^acommercial hybrid, ^blocal landraces, ^cbreeding lines

Origin: ^zRijk Zwaan Iberica S.A., ^yDe Ruiter Seeds S.A., ^xInstituto Universitario de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV) seed bank, ^uUniversitat Jaume I seed collection.

2.3 Electronic nose and data acquisition

A FOX 4000 (Alpha MOS, Toulouse, France) e-nose system was used. The system included 18 metal oxide semiconductor sensors (MOS) installed in three chambers, an autosampler system (CombiPAL HS100, CTC Analytics, Zwingen, Switzerland) and a software package (AlphaSoft v11) to control and process initial data. The sensor response in MOS sensors is a resistance variation due to a reaction caused by the chemical species on the surface of the active layer of the sensor. As usual for MOS sensors, the signal was expressed as normalized resistance variation of the signal highest point $((R_i - R_{max})/R_i)$, where R_i is resistance at time zero and R_{max} is resistance in the signal highest point of the sensor (Skov & Bro, 2005).

The analysis parameters related to general aspects of equipment operation were fixed following supplier recommendations, while those that directly determine the response quality (influence headspace generation) were established from previous tests based on the methodology for the analysis of tomato aroma developed by Beltran et al. (2006). In this way, 2 g of sample (2 mL in the case of tomato synthetic standards) were introduced into a 10 mL vial and sealed. Each sample replicate corresponded to an independent vial. Samples were incubated in the autosampler at 45°C for 10 minutes to generate the headspace and then 2 mL of it were injected in the sensors chambers for analysis. The sensors' response was recorded over two minutes with 18 minutes between each measurement to allow the baseline recovery. Between samples, dry clean synthetic air flowed over the sensor array for 2 minutes to remove residues of the previous sample. The gas flow rate was 150 mL min⁻¹. Instrument maintenance (daily auto test and two-week diagnosis) were routinely performed following supplier protocols to ensure proper operation.

2.4 Drift correction and inter-sequence standardization

A multivariate adaptation of the multiplicative drift correction procedure proposed by Salit and Turk (1998) combined with a PLS adaptation of the component correction strategy (Artursson et al., 2000) to model time-dependent drift was used both to remove intra-sequence short-term drift and to perform inter-sequence standardization to counteract long-term drift. Two assumptions were considered: i) drift, regardless of its type, is a function of time and it is independent of what samples are being measured and ii) drift for our electronic nose instrument is multiplicative (i.e. the magnitude of the perturbations is dependent of the signal level).

According to Salit and Turk (1998), when multiplicative drift appears, the signal measured in a sample i evaluated with j repetitions in each of the k sensors of the system ($S_{i(j),k \text{ measured}}$) could be decomposed as:

$$S_{i(j),k \text{ measured}} = S_{i,k \text{ truth}}(1 + E_{\text{drift}}(t) + E_{\text{noise}}) \quad (1)$$

Being $S_{i \text{ truth}}$ the true signal for sample i , $E_{\text{drift}}(t)$ the drift estimation as a function of time and E_{noise} the estimation of the background noise (independent of time). $S_{i \text{ truth}}$ can be estimated using the mean of all $\hat{S}_{i,k \text{ measured}}$

Then the multiplicative deviation pretreatment for each measured signal ($\frac{S_{i(j),k \text{ measured}}}{\hat{S}_{i,k \text{ measured}}}$) allowed to model the deviations from 1 as an estimate of $E_{i,k \text{ drift}}(t) + E_{i,k \text{ noise}}$

To estimate time-dependent drift, we performed a multivariate PLS regression between the pretreated signal measurements for all system sensors as independent variables (X matrix) and the time of analysis as a dependent variable (Y vector). As PLS drift model finds latent variables that explain the variability in the deviation of electronic signals due only to time evolution, this model function provides the estimate of $E_{i,k \text{ drift}}(t)$ and the residuals of these model provide

the estimation of $E_{i,k}$ noise.

Accordingly, as proposed by Artursson et al. (2000), after the drift model was fitted, the matrix product of resulting loadings and scores of the model was used to calculate the matrix of $E_{drift}(t)$ components. Then the initial signal measured values were corrected for multiplicative drift using the following equation from Salit and Turk (1998):

$$S_{i(j),k \text{ corrected}} = [\hat{S}_{i,k \text{ measured}}(1 - E_{i(j),k \text{ drift}}(t))] + S_{i(j),k \text{ measured}} \quad (2)$$

A similar strategy was used to perform inter-sequence standardization to correct long-term drift. For different work sequences, a generalization of equation (1) was considered to decompose signal measured in a sample i evaluated with j repetitions in each of the k sensors of the system. This generalization assumes that in this case the truth signal can be estimated using two components, the mean of all $S_{i(j)}$ repetitions and an inter-sequence standardization coefficient. To calculate this inter-sequence standardization coefficient, the difference of the signals of the same reference sample measured in two different sequences was used. The tomato-like standard TomSSt_2 was used as a reference sample in all work sequences.

Consequently, the multiplicative deviation pretreatment used for each measured signal was:

$$\frac{S_{i(j),k \text{ measured}}}{\hat{S}_{i,k \text{ measured}} + (\hat{S}_{TLS1,k} - \hat{S}_{TLSn,k})} \quad (3)$$

Where $\hat{S}_{TLS1,k}$ and $\hat{S}_{TLSn,k}$ are the signal means of all repetitions for the tomato-like standard reference sample in sequences 1 and n , respectively, for each k sensor.

The generalization of equation (1) also assumes that, when considering several work sequences, the time-dependent drift can be decomposed in two components:

$$E_{drift}(t) = E_{short-term \text{ drift}}(t) + E_{long-term \text{ drift}}(t) \quad (4)$$

Inter-sequence standardization was applied to all sequences after short-drift correction. Doing that, time-dependent drift would be equivalent to the long-term drift that appears between sequences. Consequently, after applying pretreatment of equation (3) when we model drift by PLS regression as explained previously it was possible to calculate the matrix of $E_{long-term \text{ drift}}$ components and to use it to standardize sequence signals applying equation (4).

The PLS regressions were performed using venetian blinds (with as many groups as samples evaluated) as resampling procedure, in order to calculate error models and to select the number of latent variables used in the model. Outliers were detected and removed, using Hotelling T2 and Q Residuals (Ballabio & Consonni, 2013).

2.5 Graphical maps and data analysis tools

Drift-corrected sensor signals were graphically plotted in a 2D PLS-DA scatterplot map as with this dimensional reduction representation technique the distance between projected points preserves sample similarities (Krzanowski, 2000). Confidence ellipsoids ($p=0.05$) were calculated and plotted for samples with more than four replicates. In some cases, after removing outliers there were not enough points to calculate these intervals and data points were just linked with lines to provide rapid identification of groups. The closer the points, the higher the similarity between signals. This allows to compare and relate sample volatile profile similarities in order to use this graphical information for selection purposes. The objective was not to classify samples in predefined groups. This would be a typical objective in a quality assurance control, but in breeding programs, the objective is to select those materials closer to specific volatile profile targets. Nevertheless, to assess the performance of the proposed drift correction strategy, we compared classification results with other reputed drift correction methods: the original Salit and Turk (1998) method, independent component analysis (ICA) and parallel factor analysis 2 (PARAFAC2) (Di Natale et al., 2002). For that purpose, two frequent classification techniques, K nearest neighbors (KNN) classification and discriminant analysis based on partial least square regression (PLS-DA) (Krzanowski, 2000) were used.

PLS, KNN, and PLS-DA analysis and graphics were performed using PLS_Toolbox v 8.6 (Eigenvector Research Inc, Wenatchee, WA, USA) for Matlab v 9 (Mathworks Inc, Natick, MA, USA). ICA models (Hyvärinen & Oja, 2000) were calculated with the FastICA toolbox for Matlab developed at the Helsinki University of Technology. PARAFAC2 models were performed using a graphical user interface, SENSABLE, developed by Skov & Bro (2005).

To justify the need for standardization procedures, test for significant differences between the same sample signals in different sequence work using MANOVA analysis and Roy test were used (Krzanowski, 2000). These analyses were performed using IBM SPSS v.24 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

3. Results and discussion

3.1 Short-term drift correction

In the first assay, high levels of short-term drift were observed considering the position of each sample replicate in the two-dimensional representation of the PLS analysis obtained with raw signals (Fig. 1 a, b and c). This short-term drift even affected tomato-like standards which should be much more homogeneous than real tomato samples. In fact, despite having different aroma volatile profile, the confidence ellipsoids of each variety overlapped, making impossible to discriminate the different materials. The high level of short-term drift was detected in the three independent sequences tested. The effects of short-term drift varied between different sequences. As an example, TomSSt_2 confidence ellipsoid was small and data points plotted close in the first sequence (Fig. 1a), while the ellipsoid was considerably wider in the second (Fig.1b) and third sequences (Fig. 1c). As the samples were randomly distributed for each replicate in the sequence, the difference in confidence ellipsoids suggests that the effect of drift changes between sequences. Thus, confirming the difficulty of extrapolating short-term drift effects in different analysis sessions.

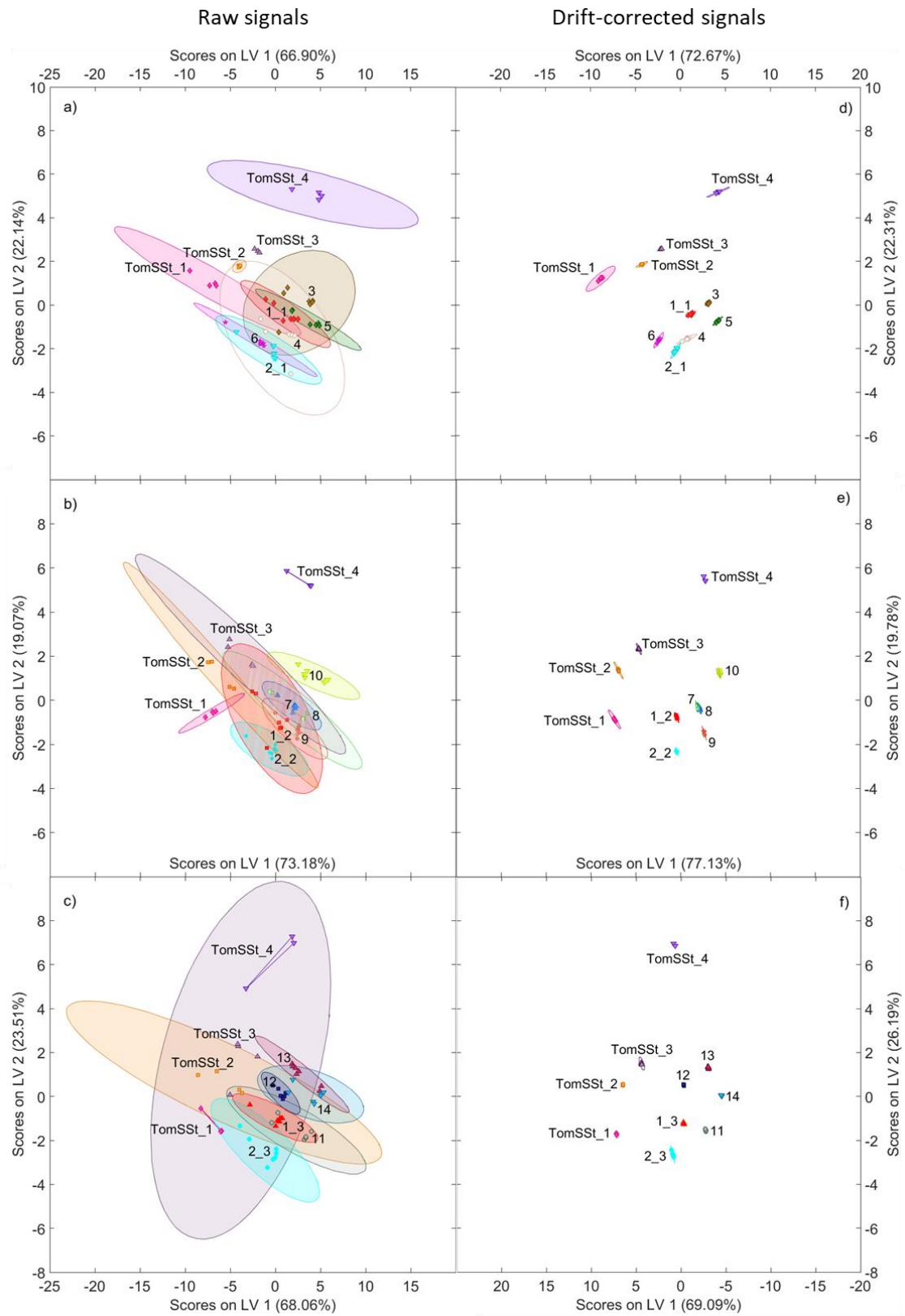


Fig. 1. Similarity maps of volatile electronic profiles from raw signals (on the left) and short-term drift-corrected signals (on the right) data from samples tested in three different work sequences assayed in the first assay. Sample codes as indicated in Table 2. TomSSt = Tomato-like synthetic standard. Ellipsoids represent confidence intervals ($p=0.05$) for samples with more than three replicates.

When short periods of time are considered, the main factors contributing to e-nose drift effects in sensor performance are usually due to differences in temperature, humidity, changes in samples analyzed due to components interactions or other uncontrolled effects. In the long term, the stability of MOS sensors could progressively be affected by sensor aging or poisoning affecting their performance. This includes changes in the morphology of the sensing layer and irreversibly bind of some sample compounds to metal oxides which diminish the catalytic oxidation of sample volatiles and affecting the sensors' resistance response (Rudnitskaya, 2018). In practice, the data distortion caused by sensor drift in short time scenarios (one or few work-sequences) has many times been avoided when the use of the data collected was strictly for classification purposes. In these cases, the use of advanced multivariate statistical classification methodologies allows to obtain subjacent information from the raw signal characteristic of each sample group, discarding the rest of the signal information and, then diminishing the drift distortions problems (see a recent example in Song, Bi, Chen, Wu, Lyu, & Meng 2019). Unconsciously, when using a multivariate classifying technique, the analysis identifies and discards the "non-characteristic" part of raw sensor signal which normally mainly consists of noise, drift and other non-relevant information to preserve sample group characteristic information. Nevertheless, this "signal cleaning" is a collateral effect (unwanted effect) and, consequently the success of this strategy is variable since the characteristic subjacent information of the group is highly dependent of the samples and the number of latent variables used to build up the classification model. When a reduced number of samples with important differences between them are evaluated or when the volatile composition of the samples is not complex the "signal cleaning" effect could work well and it would be possible classify them in a quite satisfactory way using raw data signals and these multivariate classification techniques (Hong, Wang, & Qi, 2015). But, with this approach, it is not always possible to completely avoid drift distortion effects, as occurs when evaluating complex samples (complex matrix and/or very complex mixtures of volatiles) or when the sample set consists of a lot of samples and their characteristics are not highly different. Consequently, a drift correction strategy would be more convenient.

In order to gather more information on the effects of short-term drift and to validate the proposed drift correction strategy a second assay with 8 samples was performed (Table 2). This time, samples were randomized in the first replicate, but the order was maintained in the rest of the replicates to enable comparison among varieties. A long hard work sequence (22 hours) typical of the requirements of a high number of samples was applied, increasing the number of repetitions per sample up to 12. Raw sensor data from these analyses revealed, for all the samples in all the sequences, the presence of an important drift effect for all sensors. In our study, the higher drift effects were detected in the samples of the variety "Caramba" (Fig. 2). These drift effects were more evident and important at the end of the sequence (Fig. 2a), showing a complex non-linear time-dependent variation. In the case of "Caramba" samples, raw signals (12 repetitions distributed in a sequence of 60 analysis) showed a very high relative standard deviation (%RSD) for the complete sequence for all the sensors (Fig. 2b. first data in parenthesis). In order to provide a reference, these values were compared to those obtained by Xu et al. (2015) corresponding to 6 analyses with the same apparatus equipped with the same sensors (Fig. 2b in square brackets). %RSD values obtained in the present work were

considerably higher. Thus, the use of long sequences such as these would be unacceptable. It should be considered though, that the material used by Xu et al. (2015) was Semen *Arecae*, a dried seed preparation from *Areca catechu* L. Therefore, differences in %RSD would be explained both by changes in the sample matrix, and in the number of hours of work of the sensors per sequence. When shorter sequences are considered (8 working hours, i.e. 4 “Caramba” samples analyzed in a sequence of 18 injections) the drift also remained excessive (Fig. 2d. first data in parenthesis).

In order to correct these drift problems, sensor drift within a sequence was modeled and subtracted from the raw signals. To do that, a multivariate adaptation of the multiplicative drift correction procedure proposed by Salit and Turk (1998) combined with a PLS adaptation of the highly used component correction strategy (Artursson et al., 2000) to specifically model each drift present in each sequence was performed. The following assumptions were considered: i) sensors of the array have similar drift behavior, ii) this drift has a specific direction in the data hyperspace which allows its modelization by regression and iii) this drift is time-dependent. After modeling short-term drift for each sequence, drift components for each signal in the data matrix were calculated. Later, matrix subtraction was performed in a Matlab environment to remove drift from the raw sensor signal data, thus providing a corrected sensor data matrix, which was used to plot the data (Fig. 2e). Compared with the raw sensor signals (Fig. 2a), the corrected signals were much more stable during all the sequence for all sensors, even those with higher %RSD. Accordingly, an impressive %RSD decrease was observed for all the sensors (Fig. 2b). After the drift correction, even with long sequences, %RSDs were between one (T40/2 sensor) and 27 (LY2/LG sensor) times lower than those reported by Xu et al. (2015) with a lower number of injections. As expected, the use of shorter work-sequences (18 injections in 8 hours sequence) resulted in better performance after drift correction (Fig. 2d and 2f).

It should be considered though, that the increase in stability entails a small decrease in the absolute value of signals after correction, especially in long sequences (Fig. 2a vs. Fig. 2e). While this decrease is imperceptible in shorter sequences (Fig. 2c vs. Fig. 2f). Consequently, despite the powerful short-term drift correction capabilities obtained, it would be preferable to use short (8 hours) work sequences.

When this drift correction strategy was applied to the signals of the first assay, the corrected drift signals allowed an impressive reduction of the sample signal variability which enabled a clear comparison of similitudes between samples in each PLS-DA similarity map (corrected: Fig. 1d, 1e and 1f vs. raw: Fig. 1a, 1b and 1c). After this correction, it was easy to ascertain similarities in the volatile signal profile between samples.

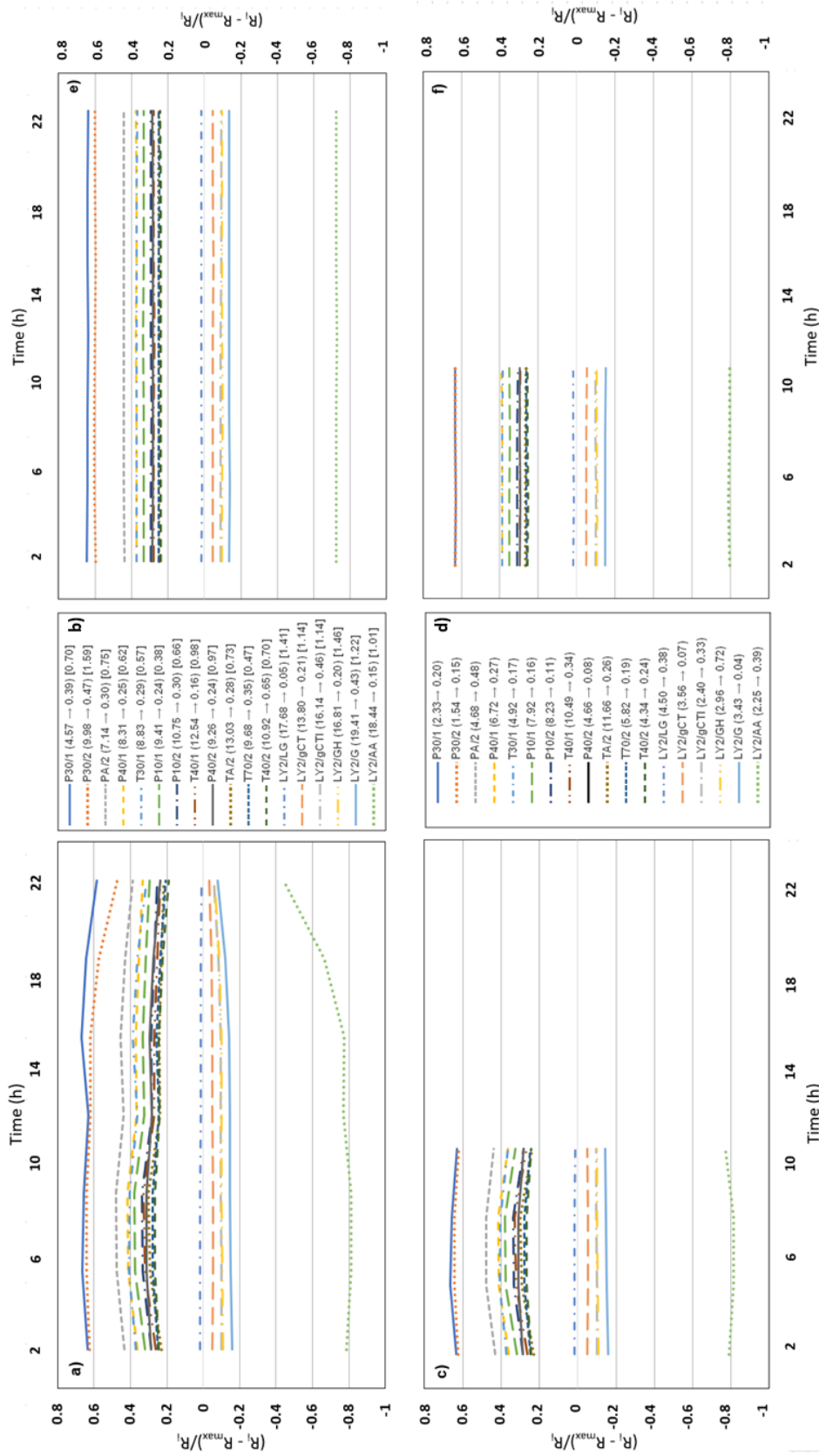


Fig. 2. Sensors response in the evaluation of tomato “Caramba” samples in (top) long work sequences (22h) and (bottom) short work sequences (8h). On the left: Raw sensor signals (a, c). On the right: intra-sequence drift corrected sensor signal (e, f). Legends (b, d) show the evolution of sensor signals %RSD before and after applying intra-sequence drift correction (first and second value in parenthesis). External reference %RSD values using the same equipment and 6 injections is provided in square brackets (Xu et al., 2015).

The reliability of the proposed short-term drift correction methodology was then tested using different statistical alternatives. In order to enable this comparison and considering that most works dealing with e-nose data are based on classification, different drift-correction alternatives were tested before applying KNN and PLS-DA classification methods to the corrected data (Supplementary Table 1). For that purpose, data from the second assay was used. In general, both classification methods had a similar performance, as it varied depending on the variety considered. Taking into account different alternatives, the proposed correction offered best results compared to popular alternatives including the Salit & Turk (1998) correction, ICA (Di Natale et al., 2002) and PARAFAC2 (Skov & Bro, 2005;). In fact, KNN classification with the proposed short-term drift correction was the only methodology able to classify correctly 100% of the samples considering the variety to which they belonged.

3.2 Long-term drift correction and data standardization.

Once the problem short-term drift was solved, the focus was set in overcoming the effects of long-term drift. This point is essential if a high number of samples are to be analyzed, e.g. in a breeding program, as they would be distributed in different sequences that would be run on several days. Long-term drift can be originated by sensor aging or other causes. Nonetheless, regardless of the cause, the effects can be considerable and unpredictable, as it was pointed out in the comparison of the three sequences of the first assay. Consequently, considering the unpredictable nature of long-term drift, it seemed clear that some reference samples should be included in each sequence to assess how long-term drift affected the signal. At this point, it would not be advisable to use real tomato samples as references. The storage capability of these samples would be limited, and long-term evolution in a freezer would introduce an undesirable noise in the system. Accordingly, it was decided to include tomato-like standard volatile solutions, which could be created on purpose for each session. As tomato volatile profile is highly complex, with more than 400 volatiles being involved, it was decided to focus on a group of compounds (Table 2) that had been suggested to present a prominent role in the aroma perception (Buttery, Teranishi & Ling, 1987; Tieman et al., 2012).

In order to propose a long-drift correction, the joint data including all the sequences from the first assay were used, after applying short-term drift correction. In this way, an expandable map of the volatile profile was constructed with twelve tomato samples and six controls analyzed in different sessions with long (22h) sequences. The six controls included four tomato-like volatile standards and samples from two tomato accessions, which were repeated in each sequence.

PLS-DA 2D maps were constructed using the controls (Fig. 3a). Samples from the same control tended to plot together, but, as expected, the effects of long-term drift were noticeable and some of the samples did not overlap their confidence intervals. This was true even for tomato-like standard solutions, which were supposed to be more homogeneous than real tomato samples.

Supplementary Table 1. Percentage of sample correctly classified using KNN and PLS-DA classification methods for seven tomato cultivars and the tomato-like synthetic standard 2, before (raw data) and after intra-sequence drift correction using our adaptation of Salit & Turk and PLS component correction method, the original Salit & Turk (1998), ICA (Di Natale et al., 2002) and PARAFAC2 (Skov & Bro, 2005) methods. Data are an average of three work-sequences (variation range in brackets).

Sample	Raw data		Proposed correction		Salit & Turk correction		ICA correction		PARAFAC2 correction	
	KNN	PLS-DA	KNN	PLS-DA	KNN	PLS-DA	KNN	PLS-DA	KNN	PLS-DA
TomSst_2 ^a	98.9 (97.9-100)	100	100	100	97.6 (93.8-100)	100	94.8 (86.5-100)	93.8 (81.3-100)	99.0 (97.9-100)	93.7 (88.3-99.0)
Zayno	85.4 (78.6-92.9)	90.4 (84.7-100)	100	99.3 (98.0-100)	92.2 (83.6-100)	93.5 (88.7-100)	83.6 (76.5-91.8)	80.9 (74.5-85.7)	80.3 (77.5-85.7)	72.7 (66.3-80.6)
BGV005718	91.5 (87.8-99.0)	88.4 (83.5-91.8)	100	94.6 (90.8-100)	99.7 (99.0-100)	89.7 (85.6-91.8)	79.9 (64.3-98.0)	83.3 (76.5-87.8)	86.4 (74.4-93.9)	68.5 (55.1-80.6)
Caramba	60.5 (47.9-84.7)	76.8 (68.0-83.7)	100	94.5 (92.9-98.0)	89.0 (82.6-92.9)	80.8 (78.3-85.6)	54.8 (47-62.2)	81.3 (61.2-91.7)	66.8 (62.7-69.3)	60.5 (48.4-71.0)
UJI011	78.2 (71.4-82.6)	77.7 (70.8-83.7)	100	92.4 (82.2-100)	94.2 (90.8-99.0)	78.3 (69.9-86.7)	63.6 (55.1-76.5)	65.2 (61.2-67.3)	61.2 (52-71.4)	67.9 (61.2-73.5)
UJI023	96.3 (91.8-99.0)	99.7 (99.0-100)	100	100	96.5 (90.6-100)	97.2 (91.7-100)	75.8 (56.1-86.6)	88.1 (71.4-100)	93.8 (90.6-98.0)	84.3 (81.6-89.8)
BGV005477	88.8 (76.5-99.0)	92.8 (89.6-94.9)	100	98.0 (93.9-100)	97.3 (92.9-100)	94.5 (92.7-96.9)	79.2 (45.9-98.0)	90.1 (79.6-96.9)	95.2 (90.8-98.0)	85.3 (81.3-88.8)
BGV005651	82.8 (82.3-83.7)	77.9 (74.3-79.7)	100	95.9 (93.9-98.0)	91.4 (82.3-100)	84.3 (77.4-93.9)	79.7 (54.3-94.0)	83.7 (75.3-91.0)	85.8 (82.3-91.8)	77.9 (75.3-81.6)

^aTomato Synthetic Standard

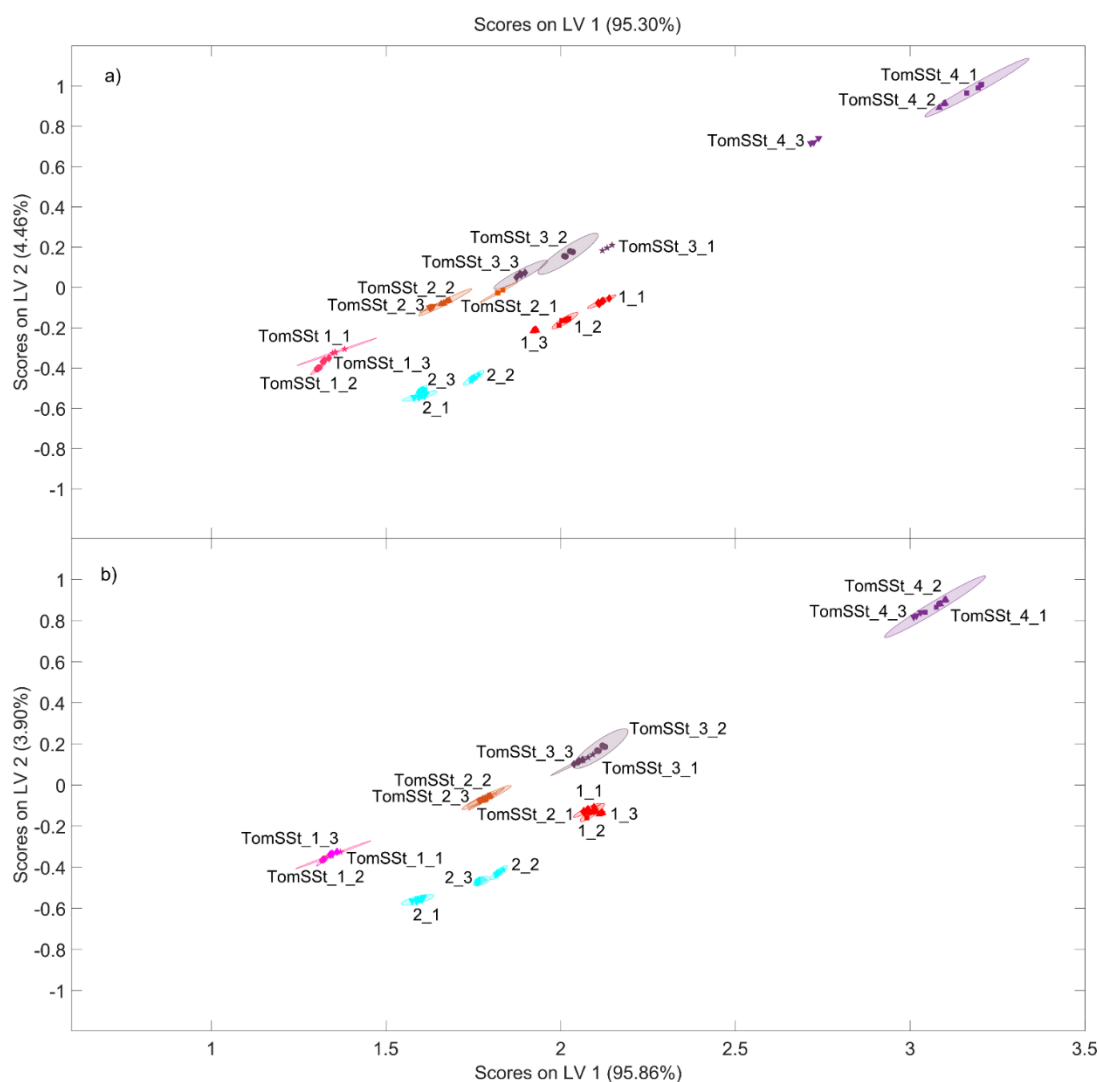


Fig. 3. PLS-DA similitude map from electronic nose fingerprints for the 6 control samples in three different work sequences (a) with short-term drift correction only and (b) with short-term drift correction + long term drift correction using sequence standardization (b). Confidence ellipsoids ($P=0.05$) are represented for samples with more than 4 repetitions. TomSSt: tomato-like synthetic standards. 1: “Zayno RZ”; 2: BGV005718 (real tomato samples used as controls). _1, _2, _3: sequence number.

Even in the case of the control with lower variability (TomSSt_1), the fluctuations of signal values were rather high for some sensors, reaching RSD values above 20% (e.g. LY2/gCTI and LY2/GH sensors) or very close to this threshold (e.g. LY2/G sensor). In fact, a MANOVA analysis for TomSSt_1 using the data from the three sequences showed significant inter-sequence differences (Roy test $\alpha < 0.03$). Higher levels of variation were found in the rest of the controls. Consequently, despite the use of the routine instrument calibration recommended by the equipment manufacturer, the unacceptable inter-sequence variance for each sample causes important bias in the graphs constructed with joint data from several sequences and makes necessary the use of a data standardization between sequences before merging data from different sessions.

In order to tackle long-term drift, the data from the tomato-like synthetic standard TomSSt_2 was selected to standardize sequence signals. Accordingly, sensor signals from each sample after short-term drift correction were transformed using the deviation between the corrected signals obtained for TomSSt_2 in the different sequences, as described previously. Once the signals were transformed, they were related to a time vector using PLS regression. Time vector values were obtained adding the time of each analysis, including the different sequences consecutively. New PLS-DA 2D maps were then obtained (Fig. 3b), and the efficiency of correction was evident. For five of the six controls no significant inter-sequence differences were found, and the confidence ellipsoids overlap. Only in the case of the samples of the accession BGV005718 (coded 2 in Fig. 3) of the tomato landrace “Amarillo” significant differences (Roy test $\alpha < 0.001$) were found between the first sequence and the remaining two. Nonetheless, the three samples plotted at a short distance.

Considering the good performance in the case of the controls, the long-term drift correction was then applied to twelve new tomato materials to extend the volatile signal map. In contrast with the raw data map (Fig. 4a), when both short term and long-term drift were corrected (Fig. 4b), the variation observed per sample was highly reduced, enabling a realistic comparison of similarities and differences in the volatile signal profile between samples considering map distance.

Once short-term and long-term-drift were corrected, the repetitions analyzed in different sequences for both tomato-like standards and real tomato samples tended to overlap their confidence intervals. Only one of the repetitions of the “Amarillo” landrace could not be grouped with the rest of the repetitions of the same material analyzed in different sequences (BGV005718 in Fig 4b). Considering all these controls, the integral group correction showed an efficiency of 94.4%, with a correct adscription of 17 the 18 sample groups. This result represent a similar success efficiency compared to other strategies regarding long-term drift counteraction methods (Gutierrez-Osuna, 2002; Tomic et al., 2002; Tomic, Eklöv, Kvaal, & Haugen, 2004; Padilla et al., 2010; Zhang & Zhang, 2015; Yan & Zhang, 2016; Solórzano et al., 2018) or better (Ziyatdinov et al., 2010; Fernandez et al., 2016).

Some of these works (Gutierrez-Osuna, 2002; Padilla et al., 2010; Ziyatdinov et al., 2010) are based on adaptations of the component correction strategy applied to a long-term drift counteraction. These authors use a group of training samples to model the drift using different regression methodologies (PLS, OSC or CPCA) and, then subtract the drift modeled from the signals of new samples. These strategies are based on the assumption that, for practical purposes, with a good training set, the calibration model can be useful for a long time. However, it is obvious that to extend the period of use, large training sets are needed. Gutierrez-Osuna (2002) uses a training set of 5 to 10 samples for a drift correction period of 3 months in samples of 4 very different species. Padilla et al. (2010) used training sets higher than 100 samples for a drift correction period of 10 months in samples of individual chemical compounds at different concentrations. A similar application was tested by Ziyatdinov et al. (2010) with training sets higher than 1000 samples for a drift correction period of 7 months. It is also obvious than when sensor degradation increases the usefulness of these calibration models will decrease and, at any moment, they would need an update.

In the present study, specific training set samples were not used. In other works, training sets have been used with mixes of a few volatiles, and real tomato samples consist of more than 400 volatiles (Tieman et al., 2012). Thus, instead of using this approach, the information of the samples evaluated in each work sequence was used to calculate the specific drift correction model. Four injections per sample would be enough to model short-term drift and at the same time providing a reliable confidence interval. By doing so, each sequence would have its proper model and, consequently, it would be always up to date. The unpredictable nature of short-term drift in different sequences using tomato matrices would limit the efficiency of other alternatives.

On the other hand, the use of one reference synthetic standard has proven to be highly efficient for long-term drift correction, enabling the comparison of samples analyzed in different sequences. This strategy would also be useful when a replacement of sensors is performed or when different instruments are used to enlarge the processing capabilities of the lab. Accordingly, Tomic et al. (2004) tried a similar component correction strategy based on PCA and complemented with multiplicative drift correction to accomplish successfully a calibration transfer between instruments. Other calibration transfer strategies which use sophisticated correction methods and algorithms have been also applied to expansion of calibration update models (Vergara et al., 2012; Zhang & Zhang, 2015; Yan & Zhang, 2016) but they need higher number of training samples (10 to more than 400 depending on the methodology) and were tested only for the detection of individual chemical compounds, so the efficiency in more complex samples still needs to be tested (Rudnitskaya, 2018).

It is possible to easily identify differences in the volatile signal profile of the samples by combining short-term and long-term drift correction and PLS-DA 2D similitude maps, thus enabling a rapid selection of new samples when are analyzed and compared with a library of materials previously analyzed and identified as breeding targets. These maps would be expandable, offering the possibility of including new reference points. In fact, when Fig. 3b and 4b are compared, neither the relative position of the real tomato samples of “Zayno RZ” (1 in the figures) and BGV005718, an accession of “Amarillo” (2 in the figures) was not altered; nor the position of the tomato-like synthetic solutions.

This strategy was successfully applied to a combination of different materials, selected to represent a wide variability of volatile profiles, especially in the case of tomato landraces. These materials are frequently commercialized in quality markets in which consumers are willing to pay a price premium for excellent flavor (Cebolla-Cornejo, Soler & Nuez, 2007). Consequently, these genetic resources are especially important in breeding programs targeted to improve fruit flavor. Additionally, modern commercial materials have lost key alleles related to the synthesis of aroma related volatiles, which are conserved in traditional varieties (Tieman et al., 2017), and represent important breeding targets, as far as flavor is concerned. The landraces included in the study had already shown a clearly different volatile profile (Cebolla-Cornejo, Roselló, Valcárcel, Serrano, Beltrán & Nuez, 2011). Interestingly, “Muchamiel” (BGV005651), which had previously shown a less intense volatile profile in gas chromatography analysis compared to “Valenciano” (BGV005655) and “Morada” (BGV005477), plotted in the PLS-DA 2D map in an area corresponding to materials with lower volatile concentration (Fig.4b).

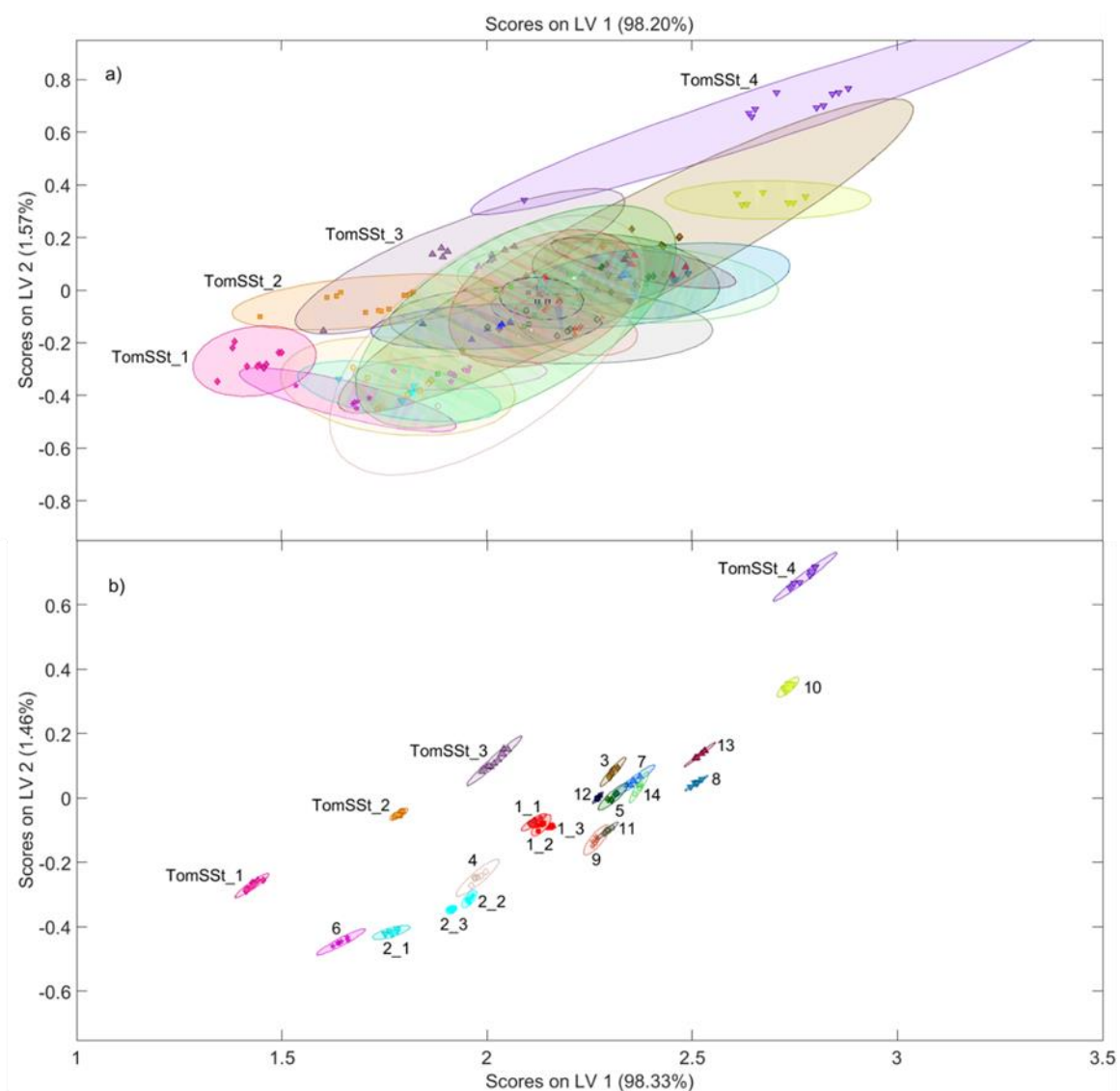


Fig. 4. PLS-DA similitude map merging data from four tomato-like synthetic standards (TomSSt) and 14 tomato varieties, obtained in three different work sequences. (a) using raw data, (b) using short-term intra-sequence drift correction + long-term drift correction using sequence standardization. Confidence ellipsoids ($P=0.05$) are represented for samples with more than four repetitions. 1: “Zayno RZ”; 2: BGV005718; 3: “Caramba”; 4: UJI011; 5: “Divyne RZ”; 6: “Vinchy RZ”; 7: UJI023; 8: BGV005477; 9: BGV005651; 10: BGV005655; 11: BGV004587; 12: UJI008; 13: UJI014; 14: UJI028. _1, _2, _3 samples analyzed in different sequences.

4. Conclusions

Short- and long-term drift in e-noses compromises the possibility of applying this technology to the evaluation of volatile profiles in breeding programs. An integral correction strategy has been efficiently developed for tomato samples. This species was selected as a model for breeding programs considering the interest in recovering volatile evaluation as a selection target for quality markets, and the complexity of its aroma profile and perception. The use of specific

models for correcting short-term drift in each sequence, and the use of synthetic reference standards for counteracting long-term drift, combined with PLS-DA two-dimensional similitude maps, enables rapid and reliable identification of samples with a volatile signal profile similar to references selected as breeding targets.

5. Acknowledgments

This research was partially funded by Jaume I University with projects P1-1B2011-41 and COGRUP/2016/04. G. Ibáñez also thanks Universitat Jaume I for funding his pre-doctoral grant (PREDOC/2015/45).

6. References

- Artursson, T., Eklöv, T., Lundström, I., Mårtensson, P., Sjöström, M., & Holmberg, M. (2000). Drift correction for gas sensors using multivariate methods. *Journal of Chemometrics*, *14*, 711–723. [https://doi.org/10.1002/1099-128X\(200009/12\)14:5/6<711::AID-CEM607>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1099-128X(200009/12)14:5/6<711::AID-CEM607>3.0.CO;2-4)
- Ballabio, D., & Consonni, V. (2013). Classification tools in chemistry. Part 1: linear models. PLS-DA. *Analytical Methods*, *5*(16), 3790-3978. <https://doi.org/10.1039/c3ay40582f>
- Beltran, J., Serrano, E., López, F. J., Peruga, A., Valcarcel, M., & Rosello, S. (2006). Comparison of two quantitative GC-MS methods for analysis of tomato aroma based on purge-and-trap and on solid-phase microextraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *385*(7), 1255-1264. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0410-9>
- Buttery, R. G., Teranishi, R., & Ling, L. C. (1987). Fresh tomato aroma volatiles: a quantitative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *35*(4), 540-544. <https://doi.org/10.1021/jf00076a025>
- Casals, J., Cebolla-Cornejo, J., Roselló, S., Beltrán, J., Casañas, F. and Nuez, F. (2011). Long-term postharvest aroma evolution of tomatoes with the alcobaça (alc) mutation. *European Food Research and Technology*, *233*(2), pp.331-342. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1517-6>
- Casals, J., Pascual, L., Cañizares, J., Cebolla-Cornejo, J., Casañas, F. and Nuez, F. (2012). Genetic basis of long shelf life and variability into Penjar tomato. *Genetic Resources and Crop Evolution*, *59*(2), pp.219-229. <https://doi.org/10.1007/s10722-011-9677-6>
- Cebolla-Cornejo, J.; Soler, S.; Nuez, F. (2007). Genetic erosion of traditional varieties of vegetable crops in Europe: tomato cultivation in Valencia (Spain) as a case study. *International Journal of Plant Production* *1*: 113-128. <https://doi.org/10.22069/IJPP.2012.531>
- Cebolla-Cornejo, J., Roselló, S., Valcárcel, M., Serrano, E., Beltrán, J. and Nuez, F. (2011). Evaluation of genotype and environment effects on taste and aroma flavor components

- of Spanish fresh tomato varieties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(6), pp.2440-2450. <https://doi.org/10.1021/jf1045427>
- Cebolla-Cornejo, J., Roselló, S. and Nuez, F. (2013). Selection of tomato rich in nutritional terpenes. *Natural products: phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes*, pp.2853-2881.
- Deshmukh, S., Kamde, K., Jana, A., Korde, S., Bandyopadhyay, R., Sankar, R., Bhattacharyya, N., & Pandey, R. A. (2014). Calibration transfer between electronic nose systems for rapid In situ measurement of pulp and paper industry emissions. *Analytica Chimica Acta*, 841, 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.05.054>
- Di Natale, C., Martinelli, E., & D'Amico, A. (2002). Counteraction of environmental disturbances of electronic nose data by independent component analysis. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 82(2–3), 158–165. [https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(01\)01001-2](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(01)01001-2)
- Fernandez, L., Guney, S., Gutierrez-Galvez, A., & Marco, S. (2016). Calibration transfer in temperature modulated gas sensor arrays. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 231, 276–284. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.02.131>
- Gutierrez-Osuna, R. (2000). Drift reduction for metal-oxide sensor arrays using canonical correlation regression and partial least squares. *Proceedings of the 7th International Symposium On Olfaction & Electronic Nose*, 1–7. Retrieved from http://research.cs.tamu.edu/prism/publications/isoen00_gutierrez.pdf
- Gutierrez-Osuna, R. (2002). Pattern analysis for machine olfaction: a review. *Sensors Journal, IEEE*, 2(3), 189–202. Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/47f7/631dd7e5d892a7a5e36607ce7b2faf686f2c.pdf>
- Hong, X., Wang, J., & Qi, G. (2015). E-nose combined with chemometrics to trace tomato-juice quality. *Journal of Food Engineering*, 149, 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.10.003>
- Hyvärinen, A., & Oja, E. (2000). Independent component analysis: algorithms and applications. *Neural Networks : The Official Journal of the International Neural Network Society*, 13(4–5), 411–430. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10946390>
- Jia, W., Liang, G., Jiang, Z., & Wang, J. (2019). Advances in Electronic Nose Development for Application to Agricultural Products. *Food Analytical Methods*, 1-15. <https://doi.org/10.1007/s12161-019-01552-1>
- Krzanowski, W. (2000). *Principles of multivariate analysis: A User's Perspective*. Oxford University Press.
- Liang, Z., Tian, F., Yang, S., Zhang, C., Sun, H., & Liu, T. (2018). Study on interference suppression algorithms for electronic noses: A review. *Sensors (Switzerland)*, 18(4), 1–26. <https://doi.org/10.3390/s18041179>
- Majchrzak, T., Wojnowski, W., Dymerski, T., Gębicki, J., & Namieśnik, J. (2018). Electronic noses in classification and quality control of edible oils: A review. *Food Chemistry*, 246, 192–201. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.013>

- Marco, S., & Gutierrez-Galvez, A. (2012). Signal and data processing for machine olfaction and chemical sensing: A review. *IEEE Sensors Journal*, 12(11), 3189–3214. <https://doi.org/10.1109/JSEN.2012.2192920>
- Padilla, M., Perera, A., Montoliu, I., Chaudry, A., Persaud, K., & Marco, S. (2010). Drift compensation of gas sensor array data by Orthogonal Signal Correction. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 100(1), 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2009.10.002>
- Rudnitskaya, A. (2018). Calibration Update and Drift Correction for Electronic Noses and Tongues. *Frontiers in Chemistry*, 6:433. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00433>
- Salit, M. L., & Turk, G. C. (1998). A drift correction procedure. *Analytical Chemistry*, 70(15), 3184–3190. <https://doi.org/10.1021/ac980095b>
- Skov, T., & Bro, R. (2005). A new approach for modelling sensor based data. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 106(2), 719–729. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2004.09.023>
- Solórzano, A., Rodríguez-Pérez, R., Padilla, M., Graunke, T., Fernandez, L., Marco, S., & Fonollosa, J. (2018). Multi-unit calibration rejects inherent device variability of chemical sensor arrays. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 265, 142–154. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.02.188>
- Song, J., Bi, J., Chen, Q., Wu, X., Lyu, Y., & Meng, X. (2019). Assessment of sugar content, fatty acids, free amino acids, and volatile profiles in jujube fruits at different ripening stages. *Food Chemistry*, 270, 344–352. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.102>
- Tieman, D., Bliss, P., McIntyre, L.M., Blandon-Ubeda, A., Bies, D., Odabasi, A.Z., Rodríguez, G.R., van der Knaap, E., Taylor, M.G., Goulet, C. and Mageroy, M.H., (2012). The chemical interactions underlying tomato flavor preferences. *Current Biology*, 22(11), pp.1035–1039. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.04.016>
- Tieman, D., Zhu, G., Resende, M. F. R., Lin, T., Nguyen, C., Bies, D., ... Klee, H. (2017). A chemical genetic roadmap to improved tomato flavor. *Science*, 355(6323), 391–394. <https://doi.org/10.1126/science.aal1556>
- Tomic, O., Eklöv, T., Kvaal, K., & Haugen, J. E. (2004). Recalibration of a gas-sensor array system related to sensor replacement. *Analytica Chimica Acta*, 512(2), 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.03.001>
- Tomic, O., Ulmer, H., & Haugen, J. E. (2002). Standardization methods for handling instrument related signal shift in gas-sensor array measurement data. *Analytica Chimica Acta*, 472(1–2), 99–111. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00936-4](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00936-4)
- Vergara, A., Vembu, S., Ayhan, T., Ryan, M. A., Homer, M. L., & Huerta, R. (2012). Chemical gas sensor drift compensation using classifier ensembles. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 166–167, 320–329. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.01.074>
- Xu, M., Yang, S. L., Peng, W., Liu, Y. J., Xie, D. S., Li, X. Y., & Wu, C. J. (2015). A novel method for the discrimination of semen arecae and its processed products by using computer vision, electronic nose, and electronic tongue. *Evidence-Based Complementary and Alternative*

- Medicine*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/753942>
- Yan, K., & Zhang, D. (2015). Improving the transfer ability of prediction models for electronic noses. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 220, 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.05.060>
- Yan, K., & Zhang, D. (2016). Calibration transfer and drift compensation of e-noses via coupled task learning. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 225, 288–297. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.11.058>
- Zhang, L., & Peng, X. (2016). Time series estimation of gas sensor baseline drift using ARMA and Kalman based models. *Sensor Review*, 36(1), 34–39. <https://doi.org/10.1108/SR-05-2015-0073>
- Zhang, L., & Zhang, D. (2015). Domain adaptation extreme learning machines for drift compensation in E-Nose systems. *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*, 64(7), 1790–1801. <https://doi.org/10.1109/TIM.2014.2367775>
- Zhao, J., Sauvage, C., Zhao, J., Bitton, F., Bauchet, G., Liu, D., Huang, S., Tieman, D.M., Klee, H.J. and Causse, M. (2019). Meta-analysis of genome-wide association studies provides insights into genetic control of tomato flavor. *Nature communications*, 10(1), p.1534. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09462-w>
- Ziyatdinov, A., Marco, S., Chaudry, A., Persaud, K., Caminal, P., & Perera, A. (2010). Drift compensation of gas sensor array data by common principal component analysis. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 146(2), 460–465. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2009.11.034>
- Zuppa, M., Distante, C., Persaud, K. C., & Siciliano, P. (2007). Recovery of drifting sensor responses by means of DWT analysis. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 120(2), 411–416. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2006.02.049>

DISCUSIÓN GENERAL

A finales de los años 80 la pérdida de sabor en las variedades modernas de tomate era evidente, lo que condujo a la queja generalizada de los consumidores (Bruhn et al., 1991). Esta situación propició en pocos años el desarrollo de mercados de calidad basados en la comercialización de variedades tradicionales en Europa y de variedades *heirloom* en América. Mercados en los que el consumidor estaba dispuesto a pagar un importante diferencial de precio a cambio de recuperar el sabor perdido (Cebolla-Cornejo et al., 2007). Casi veinte años después la situación sigue siendo parecida, y los cultivares modernos comercializados en supermercados muchas veces siguen siendo menos sabrosos que las variedades tradicionales (Marcinkiewicz, 2017).

Evidentemente, hay factores agronómicos que contribuyen a esta pérdida de sabor, incluyendo aspectos como la cosecha en estadio temprano para facilitar la manipulación, transporte y prolongar el periodo comercial, el cultivo fuera de estación bajo invernadero o la refrigeración de los tomates para prolongar su conservación (Davies y Hobson, 1981; Díaz de León-Sánchez et al., 2009; Cebolla-Cornejo et al., 2011). Sin embargo, uno de los factores decisivos detrás de esta pérdida de sabor ha sido la propia mejora genética. Por un lado, el uso de determinados genes para introducir caracteres clave para el comercializador han tenido un efecto secundario negativo sobre el sabor. Sería el caso, por ejemplo, del gen de maduración uniforme (*uniform ripening*, *u*), empleado para eliminar los hombros verdes del tomate y ofrecer un color rojo uniforme en el fruto. Este gen se usa desde los años 40 en el desarrollo de variedades comerciales (Kinzer et al., 1990). Sin embargo, hoy en día sabemos que su uso afecta a la acumulación de clorofila y desarrollo de cloroplastos en fruto, disminuyendo la acumulación de azúcares (Powell et al., 2012). También sería el caso de los genes de larga vida *rin* y *nor*, empleados para alargar la vida comercial de los frutos, que como efecto colateral afectan de forma negativa a la producción de compuestos volátiles relacionados con el sabor (Osorio et al., 2011; Qin et al., 2012), aunque el efecto depende mucho del fondo genético en el que se integran (Baldwin et al., 2000).

Por otro lado, más allá del efecto colateral de estos genes, un factor determinante ha consistido en obviar las características relacionadas con el sabor durante los programas de mejora genética, que se han centrado en optimizar el potencial productivo e introducir genes de resistencia a enfermedades para reducir las pérdidas de producción (Marcinkiewicz, 2017; Wang et al., 2017). Por un lado, la selección de frutos de mayor tamaño conllevó la selección indirecta de alelos que condicionan una menor acumulación de azúcares. En el caso de los ácidos orgánicos los alelos que afectan a la acumulación de ácido málico cambiaron durante la domesticación, pero los más afectados por los programas de mejora genética han sido los relacionados con el contenido en ácido cítrico (Zhao et al., 2019). Por otro lado, de forma progresiva se han ido fijando alelos desfavorables desde el punto de vista de la acumulación de volátiles relacionados con el aroma. Probablemente cada uno de estos alelos desfavorables tendría un efecto menor, pero el desarrollo de programas de mejora durante décadas ha producido una acumulación de alelos desfavorables que sí tienen un efecto negativo perceptible (Tieman et al., 2017).

Mediante selección asistida es posible recuperar los alelos favorables perdidos en los procesos de mejora genética (Zhao et al., 2019). Sin embargo, es crucial introducir un fenotipado

preciso durante estos programas de mejora para evaluar el perfil de acumulación de compuestos relacionados con el sabor. No se trata sólo de monitorizar la evolución en el desarrollo de variedades élite destinadas a mercados de calidad, sino también de asegurar un mínimo impacto en el sabor cuando se mejoran otros aspectos como la productividad o la resistencia a enfermedades.

Para este fenotipado ya no sirven las antiguas aproximaciones basadas en el uso de parámetros básicos como el contenido en sólidos solubles (CSS), el pH y la acidez titulable (AT), empleados en los antiguos programas de mejora de las variedades de tomate para industria (Davies y Hobson, 1981; Kader, 1985). Efectivamente, es necesario conocer la acumulación precisa de los azúcares fructosa, glucosa y sacarosa y los ácidos málico, cítrico y glutámico que determinan el dulzor y la acidez del tomate y están directamente relacionados con la percepción del sabor, tanto en términos de contenido como de interrelación entre contenidos (Stevens et al., 1977 y 1979; Davies y Hobson, 1981; Malundo et al., 1995; Balwin et al., 1998; Bucheli et al., 1999; Fulton et al., 2002; Causse et al., 2010). Es también necesario conocer el perfil de acumulación de compuestos volátiles, no sólo por su efecto directo sobre el aroma (Buttery, 1993), sino por la interacción sobre cómo se perciben azúcares y ácidos a través del gusto y su papel en el matiz de aspectos como el dulzor (Baldwin et al., 1998; Baldwin et al., 2000; Klee y Tieman, 2018)

Por tanto, es necesario contar con técnicas analíticas que permitan cuantificar de forma individual la acumulación de cada uno de estos compuestos. En el caso del gusto, y la consiguiente acumulación de ácidos y azúcares, se dispone de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Agius et al., 2018) y la electroforesis capilar zonal (CZE) (Cebolla-Cornejo et al., 2012) como técnicas precisas de cuantificación. En el primer caso existe el inconveniente de que, en muchos métodos, se analizan de forma separada los ácidos y los azúcares, lo que implica mayor coste y tiempo de análisis. En cambio, la CZE permite cuantificar de forma simultánea tanto ácidos como azúcares, requiriendo de una mínima preparación de la muestra y de pequeñas cantidades de reactivos para el análisis (Roselló et al., 2002).

El propio grupo en el que se ha realizado la presente tesis desarrolló un método de electroforesis capilar capaz de analizar azúcares y ácidos en tomate en menos de 12 minutos (Cebolla-Cornejo et al., 2012). Esta metodología es muy interesante para cuantificar de forma precisa líneas avanzadas de mejora, pero sigue implicando un coste y tiempo de análisis demasiado alto como para ser empleado de forma rutinaria en las fases iniciales de los programas de mejora, en las que el número de muestras a analizar sea muy elevado.

Por eso, se propuso como alternativa recurrir al uso de técnicas de cuantificación indirectas basadas en la espectroscopía infrarroja. En el momento en el que se planteó el reto ya existían estudios en los cuales se había utilizado el infrarrojo cercano (NIR) para predecir el contenido en sólidos solubles (Flores et al., 2009; Ecartot et al., 2013; de Oliveira et al., 2014; Saad et al., 2015), así como ácidos y azúcares individuales en frutos de tomate (Torres et al., 2015). Del mismo modo, existían varias publicaciones que utilizaban el infrarrojo medio (FT-MIR) para llevar a cabo tales predicciones (Vermeir et al., 2009; Scibisz et al., 2011; Wilkerson et al., 2013; Ayvaz et al., 2016). De igual manera existen multitud de trabajos en los que se han utilizado estas técnicas para el análisis de otras frutas (revisiones de Nicolaï et al., 2007 y Bureau

et al., 2019). Sin embargo, en la mayoría de estas investigaciones se habían limitado a analizar un reducido número de muestras de una o unas pocas variedades distintas y habían validado los modelos con un grupo de muestras procedentes del mismo ensayo. Por tanto, quedaba la duda de la eficacia de predicción de dichos modelos a largo plazo. Pero lo más preocupante era que estas metodologías no estaban adaptadas a evaluar materiales muy distintos entre sí, lo que representa un requisito importante en los procesos de selección que se llevan a cabo en los programas de mejora.

En este contexto se planteó desarrollar un método no destructivo de cuantificación basado en la espectroscopía del infrarrojo cercano (*Near Infra-Red*, NIR), que pudiera usarse incluso en condiciones de campo, y un método que previsiblemente fuera más preciso, aunque involucrara el procesado de las muestras y por tanto mayor tiempo de análisis, basado en la espectroscopía del infrarrojo medio con transformada de Fourier (*Fourier Transform Mid Infra-Red*, FT-MIR).

En ambos casos se abordó el reto de desarrollar métodos de amplio uso, que pudieran emplearse para evaluar materiales muy diversos, contrastando la eficiencia de calibrados generales o específicos. Para ello se emplearon gran cantidad de muestras de diferentes tipos varietales, orígenes, localidades, años, tipos de cultivo, etc.

En el caso de la metodología NIR de reflectancia difusa los modelos obtenidos específicos por grupos varietales y predicción de CSS mostraron valores de ajuste y de error muy similares a los obtenidos por otros autores. Así, los coeficientes de determinación de predicción (r^2_p) oscilaron entre 0.92 para las variedades tradicionales cultivadas en Albacete y 0.51 para los tomates de industria de Navarra. En cuanto a los errores medios de predicción (RMSEP), estos variaron entre 0.14 para los tomates tradicionales y 0.46 para los tomates tipo cherry y cocktail. Al agrupar las muestras y construir un modelo general no se observó mejora en la eficiencia del modelo, siendo los resultados similares a los obtenidos por el peor modelo específico ($r^2_p=0.62$, RMSEP=0.47). Para determinar la robustez de los diferentes modelos específicos se estudiaron todas las combinaciones posibles para predecir el resto de modelos. Incluso se generaron nuevos modelos generales excluyendo a un solo tipo varietal, el cual se utilizaba como lote externo de predicción. A pesar de ello, ningún modelo particular específico, ni tampoco los generales, fueron capaces de proporcionar predicciones fiables al intentar predecir el CSS de las muestras de los otros ensayos. Ni siquiera fue posible en el caso de las muestras de Navarra y Extremadura, que representaban las mismas variedades y lo único que cambiaba era el ambiente de cultivo.

Queda claro pues, que los modelos construidos mediante NIR (o al menos los obtenidos en este estudio) no se deben de extrapolar a otras muestras, y por lo tanto, si se quieren obtener predicciones fiables, es necesario desarrollar los modelos específicos para cada ensayo. En gran parte, esta situación puede deberse a la diferente estructura interna de los frutos, que lógicamente complica la extrapolación a tipos varietales distintos (de Oliveira et al., 2014). Esta situación implica por tanto un mayor coste de análisis.

En el caso de los modelos de predicción del contenido en azúcares, los resultados de nuevo resultaron ser dependientes del tipo varietal, y el modelo general no consiguió mejorar

las predicciones al estar influenciado por el peor modelo específico (tomates de tipo medio). Algo similar ocurrió en el caso de los ácidos orgánicos. Sin embargo, hay que aclarar que en el caso del ácido málico la eficiencia de los modelos fue inferior al resto.

A pesar de las limitaciones, con los modelos específicos se consiguió obtener valores medios de RMSEP (referenciados al contenido medio en porcentaje), menores del 6.1% para CSS, 13.3% para fructosa, 14.1% para glucosa, 12.7% para ácido cítrico, 13.8% para ácido málico y 21.9% para ácido glutámico. Estos valores de error siguen siendo elevados, pero hay que tener en cuenta que el método cuenta como ventaja el hecho de ser no destructivo y, por tanto, de reducir muchísimo el tiempo de análisis. Será por tanto necesario hacer un balance coste-beneficio a la hora de recomendarlo para algunos procesos de selección.

Si se requiere de una determinación más precisa, sin duda habrá que recurrir al FT-MIR. Así se desprende si se realiza una comparación de las eficiencias obtenidas por los modelos de ambas metodologías, ya que los resultados obtenidos en gran parte se han obtenido con muestras muy parecidas.

Así, los modelos FT-MIR mostraron mejores ajustes y predicciones, al compararlos con los correspondientes de NIR. Una de las ventajas respecto al uso de NIR, es que con FT-MIR, el uso de un modelo general ofreció una eficiencia muy elevada. En este sentido, los valores de r^2 para la predicción fueron superiores a 0.84 para los principales compuestos relacionados con el sabor (CSS, azúcares y ácido cítrico), con valores de error %RMSEP inferiores al 15% del contenido medio y menos del 6% del contenido máximo. Es cierto que en el caso de los ácidos málico y glutámico la eficiencia del modelo general fue inferior. La menor eficiencia en la predicción de estos ácidos de menor concentración ha sido puesta de manifiesto en otros estudios, como los realizados por Vermeir et al. (2009) o Scibisz et al. (2011). La causa podría estar relacionada con la baja concentración en estos compuestos, ya que en otros cultivos se ha evidenciado que a baja concentración la absorción MIR es menor y el error cometido al medir la reflectancia es mayor (Rudnitskaya et al., 2006). De hecho, Bureau et al. (2019) consideraron que la espectrometría MIR es insensible para contenidos inferiores a 1 g kg^{-1} .

Comparados con estudios previos en tomate con FT-MIR, la eficiencia del modelo general es muy buena, especialmente si se tiene en cuenta que el nivel de variación que incluye es mucho mayor del descrito en estudios anteriores, lo que en principio debería comprometer su eficiencia (Vermeir et al., 2009; Scibisz et al., 2011; Wilkerson et al., 2013; Ayvaz et al., 2016). Pero lo importante es que por primera vez se ha podido evaluar la eficiencia de un modelo general en la predicción de un ensayo externo. Los valores de %RMSEP referenciados a la media fueron mayores que los obtenidos en la validación del modelo, pero aun así se mantuvieron por debajo del 20% para los compuestos principales. Este resultado es excepcional si se tiene en cuenta que las muestras del lote de validación no formaban parte del modelo de calibrado, algo muy inusual en modelos basados en espectrometría. Así, se abren esperanzas de poder contar con modelos generales muy robustos según se vayan aumentando el número de muestras evaluadas. De hecho, se comprobó que el modelo general es más eficiente en la predicción de un nuevo ensayo que el uso de un modelo específico con las mismas variedades. Algo, que no ocurrió en el caso del NIR.

De forma adicional, se ha comprobado que el uso del modelo general permite realizar selecciones eficientes de los materiales por alto contenido, que es al fin y al cabo el objetivo perseguido en la presente tesis: su aplicación en procesos de selección en programas de mejora. Así la sensibilidad para CSS, fructosa, glucosa y ácido cítrico fue del 100% para una presión de selección del 10%. La sensibilidad en el caso de málico y glutámico fue menor, bajando a 75%, pero aun así, el percentil medio de las muestras seleccionadas fue el 5.3% y 6.9%, lo que indica que las muestras que fueron erróneamente seleccionadas estaban muy próximas al límite de selección.

En definitiva, los modelos basados en FT-MIR son más precisos que los obtenidos con NIR, de hecho, la eficiencia obtenida con un modelo general FT-MIR aplicado a un ensayo externo no es muy inferior a la obtenida en los modelos NIR calibrados específicamente para ese ensayo. A cambio, el precio de una mayor eficiencia reside en la necesidad de procesar la muestra y el incremento en el tiempo de análisis que implica. Efectivamente la espectrometría FT-MIR no puede emplearse como método no destructivo, ya que la radiación MIR es menos energética que la NIR y solo es capaz de penetrar unas pocas micras en la muestra (Porep et al., 2015).

No está claro cuál es el factor que contribuye en mayor grado a la mayor eficiencia de los modelos FT-MIR. Schulz y Baranska (2009) constataron la mayor eficiencia del MIR frente al NIR y Porep et al. (2015) sugirieron que una de las mayores limitaciones del NIR respecto al MIR era la dispersión en medios no transparentes junto con la dificultad de adscribir bandas en el espectro NIR a compuestos que realmente absorben en el espectro MIR. De hecho, los enlaces O-H y C-H presentan bandas de absorción en el rango 3600 a 2800 cm^{-1} y los enlaces C=O y C-O en el rango 1722 a 1226 cm^{-1} , siendo el rango de absorción más interesante en el caso de azúcares y ácidos el comprendido entre 1800 y 900 cm^{-1} (Bureau et al., 2019). Pero, por otro lado, no cabe duda de que el homogeneizado previo a la medición contribuye a aumentar la eficiencia de los modelos, ya que se pierde la interferencia de las diferencias en la estructura interna que afectan a los modelos NIR no destructivos (de Oliveira et al., 2014).

Entre ambas metodologías, sin duda, la más recomendable sería el uso de FT-MIR, aunque en algunos casos en los que el número de muestras a analizar fuera muy elevado podría considerarse el uso de la determinación vía NIR que al evitar el homogeneizado de los frutos reduce el tiempo global de análisis prácticamente a la tercera parte. En estos casos podría emplearse la determinación FT-MIR para comprobar el resultado de un porcentaje restringido, preseleccionado con NIR, de las muestras evaluadas.

En cualquier caso, los buenos resultados obtenidos con el modelo general FT-MIR para predecir ensayos externos hace recomendable continuar ampliando el modelo obteniendo nuevos puntos para el calibrado, ya que se espera que según se aumente el número de muestras aumente la eficiencia del mismo. No tanto por el aumento en el número de muestras, sino por el aumento de la variabilidad representada, ya que en el estudio se observó que la eficiencia en la predicción (%RMSEP) se correlacionó con el coeficiente de variación del grupo de muestras de calibrado, más que con el número de muestras.

En el caso de los volátiles la evaluación es mucho más compleja, lo que dificulta su incorporación como criterio de selección en programas de mejora. La forma más precisa para su cuantificación es mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) (Beltrán et al., 2006). Sin embargo, esta técnica es cara y muy laboriosa, lo que reduce mucho el número de muestras que se pueden procesar por día y encarecería en exceso los costes de evaluación, por lo que su uso rutinario en programas de mejora queda descartado (Tiemán et al., 2017). Su uso quedaría relegado a la evaluación final de líneas élite. Una fase en la que también se puede abordar una evaluación sensorial. Este tipo de valoraciones tienen las mismas restricciones de coste y capacidad de análisis por día, a lo que se añade que su reproducibilidad y repetibilidad es baja (Causse et al., 2001; Dymerski et al., 2011; Wojnowski et al., 2017).

Por tanto, la evaluación del perfil volátil en programas de mejora necesariamente pasa por desarrollar métodos de evaluación indirectos que permitan obviar la necesidad de separación de los métodos de CG-EM, acortando los tiempos de análisis, así como reduciendo el precio de la infraestructura necesaria y su mantenimiento. En este contexto se podría haber optado por el estudio de las posibilidades que ofrece la espectrometría, pero lo cierto es que parecen bastante limitadas. En primer lugar, se tienen que descartar los métodos no destructivos, ya que muchos de los volátiles importantes en la configuración del aroma se generan durante la disrupción de los tejidos al masticar (Tandon et al., 2003), por lo que la evaluación en tejido intacto sería excesivamente predictiva y sujeta a errores no controlados. Por otro lado, la concentración de los más de 400 volátiles encontrados en tomate (Petro-Turza, 1986) y de los más destacados en la configuración del aroma (Buttery, 1993) es muy reducida, por lo que en el caso de la espectroscopía NIR implica el uso de transmisión y no de reflectancia. Por otro, concentraciones tan bajas prácticamente descartarían el uso de la espectroscopía MIR que se ve más limitada por las concentraciones necesarias para obtener señales espectrales idóneas (Bureau et al., 2019).

Aun así, es cierto que se ha empleado la espectroscopía NIR para la evaluación del perfil volátil de vinos (Garde-Cerdán et al., 2010; Genisheva et al., 2018) o de manzanas (Ye et al., 2016) con eficiencias razonables. Aunque hay que considerar el problema de la aplicación de modelos de predicción a muestras de ensayos diferentes. En el caso de la espectroscopía FT-MIR ha tenido cierto éxito, pero sólo para compuestos mayoritarios, por ejemplo, ciertos alcoholes en brandy (Coldea et al., 2013), o en mediciones de transmisión con una longitud de paso especialmente aumentada para medir aspectos básicos como el estado de madurez (Jiao et al., 2017). En este contexto, el uso de esta aproximación podría considerarse a largo plazo, pero se consideró que los sistemas multisensor o narices electrónicas ofrecían más posibilidades y se descartó el uso de sistemas híbridos, ya que al requerir un paso de separación se extendía el tiempo de análisis y la ventaja frente a un método de CG-EM se perdía.

Este tipo de sistemas en principio es incapaz de discriminar y cuantificar de forma individual cada uno de los compuestos volátiles presentes en la muestra, entre otras cosas porque no hay separación previa y por tanto unos compuestos interfieren con otros, pero sí que ofrecen una huella electrónica que permitiría clasificar a las muestras desconocidas una vez que se dispongan de librerías de referencia (Wilson y Baietto, 2009).

Cuando se planteó el estudio, en el caso concreto de tomate, se habían publicado varios trabajos que utilizaban las narices electrónicas, generalmente, para clasificar grupos de muestras según diferentes criterios, y validándose en ocasiones los resultados obtenidos con los adquiridos con otras metodologías analíticas.

Así, las narices electrónicas se han utilizado con éxito en procesos de clasificación de características muy generales. Por ejemplo, para determinar la frescura del zumo de tomate obtenido a partir de tomates cherry (Hong et al., 2015) y la calidad postcosecha de frutos de tomate cherry refrigerados (Feng et al., 2018). También se han empleado para clasificar según el estado de madurez (Gómez et al., 2006), monitorizar el estado de madurez durante el almacenamiento (Gómez et al., 2008), así como para detectar contaminaciones por organismos microbiológicos en tomates pelados enlatados (Concina et al., 2009). Además, Xu et al. (2018) combinando los datos de la nariz electrónica con datos fisicoquímicos, estudiaron las variaciones en el aroma debidas a los diferentes tratamientos postcosecha aplicados. Por último, Hong y Wang (2014) determinaron la adulteración del zumo de tomate cherry con zumos sobremaduros, mientras que Mohammed-Razdari et al. (2019) determinaron la adulteración de la pasta de tomate con calabaza, patata y almidón.

Por otro lado, las evaluaciones realizadas con narices electrónicas se han comparado con metodologías más precisas, analíticas o sensoriales, con el fin de justificar la conveniencia o no de su uso. Por ejemplo, Maul et al. (2000) analizaron el perfil aromático del tomate mediante CG-EM, nariz electrónica y panel de cata, obteniendo resultados de clasificación similares. A la misma conclusión llegaron Sinesio et al. (2000) utilizando los datos obtenidos mediante un panel de cata frente a los de la nariz electrónica. Berna et al. (2004) consiguieron diferenciar entre distintos cultivares, pero solo con la nariz electrónica híbrida, no así con la convencional. Posteriormente, estos mismos autores analizaron un número mayor de cultivares añadiendo los datos de un panel de cata y de la CG-EM (Berna et al., 2005). En este caso los mejores resultados se obtuvieron con la cromatografía de gases. Por último, Huang et al. (2018) pudieron determinar el estado de madurez mediante nariz electrónica y visión por ordenador, encontrando que al fusionar los datos de ambas técnicas los resultados eran mejores.

En cualquier caso, los estudios publicados se basan en la evaluación de un número limitado de muestras, reduciendo la variabilidad incluida en los modelos y por tanto su aplicabilidad a gran escala. Y, por otro lado, se enfoca el uso de la metodología en la clasificación de muestras. Por tanto, las posibilidades reales de uso de la nariz electrónica en programas de mejora no se habían explorado. En primer lugar, porque en este caso es necesario comparar materiales muy distintos, por ejemplo, procedentes de segregaciones de autofecundación de una F2, en los que la variabilidad es enorme. Por otro lado, porque no tiene sentido abordar la clasificación de los materiales. En este caso no queremos identificar una variedad concreta, sino que trabajamos con materiales que no pertenecen a ningún grupo definido con antelación. En este sentido, el objetivo sería conseguir una metodología que se pudiera aplicar a un amplio rango de variabilidad y que permita conocer como de parecida o distinta es una muestra respecto a un cierto número de referentes.

Además de la falta de aplicabilidad, otra de las limitaciones de los estudios ya publicados en tomate era que no tienen en cuenta los efectos de la deriva, ya que se limitan a analizar en un corto periodo de tiempo las muestras.

Este es, sin embargo, uno de los mayores problemas de las narices electrónicas, a causa del envejecimiento de los sensores y de factores ambientales como la humedad, la temperatura o la presión atmosférica (Di Carlo y Falasconi, 2012; Rudnitskaya, 2018). Para hacer frente a ella se puede recurrir a infinidad de métodos que tratan de modelizarla y eliminarla de la señal bruta de los sensores (revisado por Rudnitskaya, 2018). Sin embargo, resulta poco frecuente el uso de algún tipo de corrección de deriva, o en todo caso, la corrección se aplica a muestras simples con pocos volátiles.

El presente trabajo, de hecho, ha confirmado la importancia de la deriva tanto a corto plazo entre muestras de la misma secuencia, como a largo plazo entre secuencias analizadas en días distintos. En el caso de la deriva a corto plazo, el intervalo de confianza del perfil de señal de volátiles de materiales con diferencias marcadas acaba solapándose si no se corrige la deriva, lo que dificulta diferenciarlos. Esta situación es consecuencia de la deriva detectada para cada uno de los 18 sensores empleados en el sistema multisensor, que además se agudiza según se suceden más muestras en secuencias largas. En este caso, se plantearon diversas alternativas para la corrección de deriva, siendo la propuesta en el trabajo la más eficiente si se compara con estrategias ya publicadas. Esta estrategia se basa en modelizar la deriva como una función del tiempo y sustraer la deriva de la señal original. Para ello se optó por una adaptación multivariante de la corrección de deriva multiplicativa propuesta por Salit y Turk (1998) combinada con una adaptación PLS de la estrategia de corrección de componentes (Artursson et al., 2000).

Esta aproximación ofreció una corrección asombrosa de los efectos de la deriva a corto plazo, de forma que los intervalos de confianza se redujeron notablemente. De esta forma la representación bidimensional del análisis PLS-DA de la señal corregida permite estimar similitudes entre diferentes muestras. Esta estrategia implica tener al menos cuatro repeticiones por muestra dentro de cada secuencia para disponer de suficiente potencia estadística. Por otro lado, implica que la deriva se debe corregir específicamente dentro de cada secuencia. Algo por otra parte necesario, ya que al evaluar secuencias analizadas en distintos días se comprobó que el efecto de la deriva a corto plazo cambiaba entre secuencias de forma no predecible.

El poder usar esta aproximación en el cribado de germoplasma requería, por otro lado, enfrentarse a la deriva a largo plazo, ya que es necesario comparar los perfiles de señal de muestras evaluadas en días distintos. En este caso para poder corregirla se optó por utilizar un patrón sintético de tomate, que permite obtener una mezcla volátil homogénea y reproducible. Este patrón sintético se emplea para corregir a largo plazo entre secuencias (interdía), de forma que se lleva a cabo una estandarización entre secuencias. A través de este procedimiento integral (corrección intradía + corrección entre días) se consiguió que los intervalos de confianza de las repeticiones de la misma muestra solaparan no sólo entre análisis dentro de secuencia sino también entre secuencias, con una eficiencia del 94.4%.

El desarrollo de este trabajo ha permitido establecer una metodología apropiada para corregir los efectos de la deriva a corto y largo plazo, permitiendo mediante representaciones bidimensionales del análisis PLS-DA de la señal corregida y estandarizada un interfaz gráfico en el que es fácilmente observable la similitud entre perfiles volátiles de muestras distintas. Una vez solucionada la principal limitación de este tipo de estrategia el objetivo será seguir ampliando la librería de huellas electrónicas y comparar los perfiles obtenidos con el perfil volátil real obtenido por CG-EM y la valoración sensorial. De esta forma se pueden anclar referentes que actuarían como objetivo a perseguir en los procesos de selección.

Como conclusión, la presente tesis ha permitido finalmente desarrollar metodologías de fenotipado indirecto de alta capacidad que pueden aplicarse a la evaluación en programas de mejora genética de tomate, tanto para la selección por componentes relacionadas con la percepción del gusto, como las correspondientes al perfil volátil de las muestras.

Bibliografía

- Agius, C., von Tucher, S., Poppenberger, B., & Rozhon, W. (2018). Quantification of sugars and organic acids in tomato fruits. *MethodsX*, 5, 537-550.
- Artursson, T., Eklöv, T., Lundström, I., Mårtensson, P., Sjöström, M., & Holmberg, M. (2000). Drift correction for gas sensors using multivariate methods. *Journal of chemometrics*, 14(5-6), 711-723.
- Ayvaz, H., Sierra-Cadavid, A., Aykas, D. P., Mulqueoney, B., Sullivan, S., & Rodriguez-Saona, L. E. (2016). Monitoring multicomponent quality traits in tomato juice using portable mid-infrared (MIR) spectroscopy and multivariate analysis. *Food Control*, 66, 79-86.
- Baldwin, E. A., Scott, J. W., Einstein, M. A., Malundo, T. M. M., Carr, B. T., Shewfelt, R. L., & Tandon, K. S. (1998). Relationship between sensory and instrumental analysis for tomato flavor. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 123(5), 906-915.
- Baldwin, E. A., Scott, J. W., Shewmaker, C. K., & Schuch, W. (2000). Flavor trivia and tomato aroma: biochemistry and possible mechanisms for control of important aroma components. *HortScience*, 35(6), 1013-1022.
- Beltran, J., Serrano, E., López, F. J., Peruga, A., Valcarcel, M., & Rosello, S. (2006). Comparison of two quantitative GC-MS methods for analysis of tomato aroma based on purge-and-trap and on solid-phase microextraction. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 385(7), 1255.
- Berna, A. Z., Buysens, S., Di Natale, C., Grün, I. U., Lammertyn, J., & Nicolai, B. M. (2005). Relating sensory analysis with electronic nose and headspace fingerprint MS for tomato aroma profiling. *Postharvest biology and technology*, 36(2), 143-155.
- Berna, A. Z., Lammertyn, J., Saevels, S., Di Natale, C., & Nicolai, B. M. (2004). Electronic nose systems to study shelf life and cultivar effect on tomato aroma profile. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 97(2-3), 324-333.
- Bruhn, C. M., Feldman, N., Garlitz, C., Harwood, J., Ivans, E., Marshall, M., ... & Williamson, E. (1991). Consumer perceptions of quality: apricots, cantaloupes, peaches, pears, strawberries, and tomatoes. *Journal of Food Quality*, 14(3), 187-195.

- Bucheli, P., Voirol, E., de la Torre, R., López, J., Rytz, A., Tanksley, S. D., & Pétiard, V. (1999). Definition of nonvolatile markers for flavor of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as tools in selection and breeding. *Journal of agricultural and food chemistry*, *47*(2), 659-664.
- Bureau, S., Cozzolino, D., & Clark, C. J. (2019). Contributions of Fourier-transform mid infrared (FT-MIR) spectroscopy to the study of fruit and vegetables: A review. *Postharvest biology and technology*, *148*, 1-14.
- Buttery, R. G. (1993). Quantitative and sensory aspects of flavor of tomato and other vegetables and fruits. En Flavor science: Sensible principles and techniques, Acree T., Teranishi, R. (eds). American Chemical Society, Washington. pp. 259-286.
- Causse, M., Friguet, C., Coiret, C., Lépiciér, M., Navez, B., Lee, M., ... & Grandillo, S. (2010). Consumer preferences for fresh tomato at the European scale: a common segmentation on taste and firmness. *Journal of Food Science*, *75*(9), S531-S541.
- Causse, M., Saliba-Colombani, V., Lesschaeve, I., & Buret, M. (2001). Genetic analysis of organoleptic quality in fresh market tomato. 2. Mapping QTLs for sensory attributes. *Theoretical and Applied Genetics*, *102*(2-3), 273-283.
- Cebolla-Cornejo, J., Roselló, S., Valcárcel, M., Serrano, E., Beltrán, J., & Nuez, F. (2011). Evaluation of genotype and environment effects on taste and aroma flavor components of Spanish fresh tomato varieties. *Journal of agricultural and food chemistry*, *59*(6), 2440-2450.
- Cebolla-Cornejo, J., Soler, S., & Nuez, F. (2012). Genetic erosion of traditional varieties of vegetable crops in Europe: tomato cultivation in Valencia (Spain) as a case study. *International Journal of Plant Production*, *1*(2), 113-128.
- Cebolla-Cornejo, J., Valcárcel, M., Herrero-Martínez, J. M., Roselló, S., & Nuez, F. (2012). High efficiency joint CZE determination of sugars and acids in vegetables and fruits. *Electrophoresis*, *33*(15), 2416-2423.
- Coldea, T. E., Socaciu, C., Fetea, F., POP, R. M., & Florea, M. (2013). Rapid quantitative analysis of ethanol and prediction of methanol content in traditional fruit brandies from Romania, using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, *41*(1), 143-149.
- Concina, I., Falasconi, M., Gobbi, E., Bianchi, F., Musci, M., Mattarozzi, M., ... & Sberveglieri, G. (2009). Early detection of microbial contamination in processed tomatoes by electronic nose. *Food Control*, *20*(10), 873-880.
- Davies, J. N., Hobson, G. E. (1981). The constituents of tomato fruit—the influence of environment, nutrition, and genotype. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, *15*(3), 205-280.
- de Oliveira, G. A., Bureau, S., Renard, C. M. G. C., Pereira-Netto, A. B., & de Castilhos, F. (2014). Comparison of NIRS approach for prediction of internal quality traits in three fruit species. *Food Chemistry*, *143*, 223-230.
- Di Carlo, S., & Falasconi, M. (2012). Drift correction methods for gas chemical sensors in artificial olfaction systems: techniques and challenges. In *Advances in Chemical Sensors*. IntechOpen.

- Díaz de León-Sánchez, F. D., Pelayo-Zaldívar, C., Rivera-Cabrera, F., Ponce-Valadez, M., Ávila-Alejandre, X., Fernández, F. J., ... & Pérez-Flores, L. J. (2009). Effect of refrigerated storage on aroma and alcohol dehydrogenase activity in tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, *54*(2), 93-100.
- Dymerski, T., Chmiel, T., & Wardencki, W. (2011). An odor-sensing system-powerful technique for foodstuff studies. *Review of Scientific Instruments*, *82*, 1-32.
- Ecarnot, M., Bączyk, P., Tessarotto, L., & Chervin, C. (2013). Rapid phenotyping of the tomato fruit model, Micro-Tom, with a portable VIS–NIR spectrometer. *Plant physiology and biochemistry*, *70*, 159-163.
- Feng, L., Zhang, M., Bhandari, B., & Guo, Z. (2018). A novel method using MOS electronic nose and ELM for predicting postharvest quality of cherry tomato fruit treated with high pressure argon. *Computers and electronics in agriculture*, *154*, 411-419.
- Flores, K., Sánchez, M. T., Pérez-Marín, D., Guerrero, J. E., & Garrido-Varo, A. (2009). Feasibility in NIRS instruments for predicting internal quality in intact tomato. *Journal of Food Engineering*, *91*(2), 311-318.
- Fulton, T. M., Bucheli, P., Voirol, E., Lopez, J., Petiard, V., & Tanksley, S. D. (2002). Quantitative trait loci (QTL) affecting sugars, organic acids and other biochemical properties possibly contributing to flavor, identified in four advanced backcross populations of tomato. *Euphytica*, *127*(2), 163-177.
- Garde-Cerdán, T., Lorenzo, C., Alonso, G. L., & Salinas, M. R. (2010). Employment of near infrared spectroscopy to determine oak volatile compounds and ethylphenols in aged red wines. *Food chemistry*, *119*(2), 823-828.
- Genisheva, Z., Quintelas, C., Mesquita, D. P., Ferreira, E. C., Oliveira, J. M., & Amaral, A. L. (2018). New PLS analysis approach to wine volatile compounds characterization by near infrared spectroscopy (NIR). *Food chemistry*, *246*, 172-178.
- Gómez, A. H., Hu, G., Wang, J., & Pereira, A. G. (2006). Evaluation of tomato maturity by electronic nose. *Computers and electronics in agriculture*, *54*(1), 44-52.
- Gomez, A. H., Wang, J., Hu, G., & Pereira, A. G. (2008). Monitoring storage shelf life of tomato using electronic nose technique. *Journal of Food Engineering*, *85*(4), 625-631.
- Hong, X., & Wang, J. (2014). Detection of adulteration in cherry tomato juices based on electronic nose and tongue: Comparison of different data fusion approaches. *Journal of Food Engineering*, *126*, 89-97.
- Hong, X., Wang, J., & Qi, G. (2015). E-nose combined with chemometrics to trace tomato-juice quality. *Journal of Food Engineering*, *149*, 38-43.
- Huang, X. Y., Pan, S. H., Sun, Z. Y., Ye, W. T., & Aheto, J. H. (2018). Evaluating quality of tomato during storage using fusion information of computer vision and electronic nose. *Journal of food process engineering*, *41*(6), e12832.
- Jiao, L., Dong, D., Han, P., Zhao, X., & Du, X. (2017). Identification of the mango maturity level by the analysis of volatiles based on long optical-path FTIR spectroscopy and a molecular sieve. *Analytical Methods*, *9*(16), 2458-2463.
- Kader, A. A. (1985). Postharvest biology and technology: an overview. *Postharvest technology of horticultural crops*. Capítulo 2, pp. 3-7.

- Kinzer, S. M., Schwager, S. J., & Mutschler, M. A. (1990). Mapping of ripening-related or-specific cDNA clones of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Theoretical and applied genetics*, 79(4), 489-496.
- Klee, H. J., & Tieman, D. M. (2018). The genetics of fruit flavour preferences. *Nature Reviews Genetics*, 19(6), 347.
- Malundo, T. M. M., Shewfelt, R. L., & Scott, J. W. (1995). Flavor quality of fresh tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as affected by sugar and acid levels. *Postharvest Biology and Technology*, 6(1-2), 103-110.
- Marcinkiewicz, K. (2017). The alleles of a tasty tomato. *Nature biotechnology*, 35(3), 220.
- Maul, F., Sargent, S. A., Sims, C. A., Baldwin, E. A., Balaban, M. O., & Huber, D. J. (2000). Tomato flavor and aroma quality as affected by storage temperature. *Journal of Food Science*, 65(7), 1228-1237.
- Mohammad-Razdari, A., Ghasemi-Varnamkhasti, M., Yoosefian, S. H., Izadi, Z., & Siadat, M. (2019). Potential application of electronic nose coupled with chemometric tools for authentication assessment in tomato paste. *Journal of Food Process Engineering*, 42(5), e13119.
- Nicolai, B. M., Beullens, K., Bobelyn, E., Peirs, A., Saeys, W., Theron, K. I., & Lammertyn, J. (2007). Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review. *Postharvest biology and technology*, 46(2), 99-118.
- Osorio, S., Alba, R., Damasceno, C. M., Lopez-Casado, G., Lohse, M., Zanor, M. I., ... & Giovannoni, J. J. (2011). Systems biology of tomato fruit development: combined transcript, protein, and metabolite analysis of tomato transcription factor (*nor*, *rin*) and ethylene receptor (*Nr*) mutants reveals novel regulatory interactions. *Plant Physiology*, 157(1), 405-425.
- Petro-Turza, M. (1986). Flavor of tomato and tomato products. *Food Reviews International*, 2(3), 309-351.
- Porep, J. U., Kammerer, D. R., & Carle, R. (2015). On-line application of near infrared (NIR) spectroscopy in food production. *Trends in Food Science & Technology*, 46(2), 211-230.
- Powell, A. L., Nguyen, C. V., Hill, T., Cheng, K. L., Figueroa-Balderas, R., Aktas, H., ... & Lopez-Baltazar, J. (2012). Uniform ripening encodes a Golden 2-like transcription factor regulating tomato fruit chloroplast development. *Science*, 336(6089), 1711-1715.
- Qin, G., Wang, Y., Cao, B., Wang, W., & Tian, S. (2012). Unraveling the regulatory network of the MADS box transcription factor RIN in fruit ripening. *The Plant Journal*, 70(2), 243-255.
- Roselló, S., Galiana-Balaguer, L., Herrero-Martínez, J. M., Maquieira, A., & Nuez, F. (2002). Simultaneous quantification of the main organic acids and carbohydrates involved in tomato flavour using capillary zone electrophoresis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(10), 1101-1106.
- Rudnitskaya, A. (2018). Calibration Update and Drift Correction for Electronic Noses and Tongues. *Frontiers in Chemistry*, 6:433.
- Rudnitskaya, A., Kirsanov, D., Legin, A., Beullens, K., Lammertyn, J., Nicolai, B. M., & Irudayaraj, J. (2006). Analysis of apples varieties—comparison of electronic tongue with different analytical techniques. *Sensors and Actuators B: chemical*, 116(1-2), 23-28.

- Saad, A., Jha, S. N., Jaiswal, P., Srivastava, N., & Helyes, L. (2016). Non-destructive quality monitoring of stored tomatoes using VIS-NIR spectroscopy. *Engineering in agriculture, environment and food*, 9(2), 158-164.
- Salit, M. L., & Turk, G. C. (1998). A drift correction procedure. *Analytical chemistry*, 70(15), 3184-3190.
- Schulz, H., Baranska, M., (2009). Fruits and vegetables. In: Sun, D.W. (Ed.), *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*. Elsevier Inc, New York, pp. 321–353.
- Ścibisz, I., Reich, M., Bureau, S., Gouble, B., Causse, M., Bertrand, D., & Renard, C. M. (2011). Mid-infrared spectroscopy as a tool for rapid determination of internal quality parameters in tomato. *Food Chemistry*, 125(4), 1390-1397.
- Sinesio, F., Di Natale, C., Quaglia, G. B., Bucarelli, F. M., Moneta, E., Macagnano, A., ... & D'Amico, A. (2000). Use of electronic nose and trained sensory panel in the evaluation of tomato quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(1), 63-71.
- Stevens, M. A., Kader, A. A., & Albright, M. (1979). Potential for increasing tomato flavor via increased sugar and acid content. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 104(1), 40-42.
- Stevens, M. A., Kader, A. A., & Albright-Holton, M. (1977). Intercultivar variation in composition of locular and pericarp portions of fresh market tomatoes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 102, 689-692.
- Tandon, K. S., Baldwin, E. A., Scott, J. W., & Shewfelt, R. L. (2003). Linking sensory descriptors to volatile and nonvolatile components of fresh tomato flavor. *Journal of food science*, 68(7), 2366-2371.
- Tieman, D., Zhu, G., Resende, M. F., Lin, T., Nguyen, C., Bies, D., ... & Ikeda, H. (2017). A chemical genetic roadmap to improved tomato flavor. *Science*, 355(6323), 391-394.
- Torres, I., Pérez-Marín, D., De la Haba, M. J., & Sánchez, M. T. (2015). Fast and accurate quality assessment of Raf tomatoes using NIRS technology. *Postharvest Biology and Technology*, 107, 9-15.
- Vermeir, S., Beullens, K., Mészáros, P., Polshin, E., Nicolai, B. M., & Lammertyn, J. (2009). Sequential injection ATR-FTIR spectroscopy for taste analysis in tomato. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 137(2), 715-721.
- Wang, D., & Seymour, G. B. (2017). Tomato flavor: lost and found?. *Molecular plant*, 10(6), 782-784.
- Wilkerson, E. D., Anthon, G. E., Barrett, D. M., Sayajon, G. F. G., Santos, A. M., & Rodriguez-Saona, L. E. (2013). Rapid assessment of quality parameters in processing tomatoes using hand-held and benchtop infrared spectrometers and multivariate analysis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(9), 2088-2095.
- Wilson, A., & Baietto, M. (2009). Applications and advances in electronic-nose technologies. *Sensors*, 9(7), 5099-5148.
- Wojnowski, W., Majchrzak, T., Dymerski, T., Gębicki, J., & Namieśnik, J. (2017). Electronic noses: Powerful tools in meat quality assessment. *Meat science*, 131, 119-131.
- Xu, S., Sun, X., Lu, H., Yang, H., Ruan, Q., Huang, H., & Chen, M. (2018). Detecting and monitoring the flavor of tomato (*Solanum lycopersicum*) under the impact of postharvest handlings by physicochemical parameters and electronic nose. *Sensors*, 18(6), 1847.

- Ye, M., Gao, Z., Li, Z., Yuan, Y., & Yue, T. (2016). Rapid detection of volatile compounds in apple wines using FT-NIR spectroscopy. *Food chemistry*, *190*, 701-708.
- Zhao, J., Sauvage, C., Zhao, J., Bitton, F., Bauchet, G., Liu, D., ... & Causse, M. (2019). Meta-analysis of genome-wide association studies provides insights into genetic control of tomato flavor. *Nature communications*, *10*(1), 1534.

CONCLUSIONES

La presente tesis ha permitido desarrollar diferentes herramientas indirectas para la evaluación del sabor del tomate. Todas ellas son técnicas sencillas y rápidas que pueden ser utilizadas para el fenotipado masivo de genotipos de tomate, y de este modo acelerar los programas de mejora genética en los cuales es necesario seleccionar entre grandes cantidades de muestras. De forma más concreta, de los resultados obtenidos se extraen las siguientes conclusiones.

- Como alternativa a las técnicas analíticas tradicionales (HPLC y CZE) usadas en la cuantificación precisa de los compuestos químicos individuales, se han desarrollado dos metodologías basadas en el uso del infrarrojo para, de forma indirecta, predecir el contenido en ácidos y azúcares, relacionados con la percepción del gusto en tomate.

- La primera de ellas se basa en el uso del infrarrojo cercano (NIR) mediante reflectancia difusa, que permite obtener los espectros sin tener que destruir la muestra. Los modelos obtenidos permiten predecir con una simple medida varios compuestos a la vez (contenido en sólidos solubles, ácidos y azúcares) con unos errores aceptables en diferentes tipos varietales de tomate. La eficacia de dichos modelos es buena cuando se aplican por tipos varietales, siendo notablemente peor cuando se trata de construir modelos generales. Estos modelos, a pesar de obtenerse con mayor número de muestras y de variabilidad pueden verse muy condicionados por las grandes diferencias en la estructura interna de los frutos. Por otro lado, los diferentes modelos obtenidos no son extrapolables a otros ensayos, ya que los errores que se cometen son inaceptables, lo cual obliga a realizar calibrados específicos para cada nuevo ensayo.

- La segunda utiliza la espectroscopía del infrarrojo medio (MIR) con transformada de Fourier, muestreando por reflectancia total atenuada (ATR FT-MIR). Debido a la menor energía de este tipo de radiación, la penetración en la muestra es mínima, por lo que las muestras deben ser procesadas antes del análisis. Aunque el muestreo es por tanto más laborioso, los modelos específicos obtenidos por tipos varietales son más precisos que los obtenidos con NIR. Además, la construcción del modelo general con el conjunto de las muestras permite cuantificar sólidos solubles, fructosa, glucosa y ácido cítrico de forma bastante precisa en cualquier tipo de muestra de tomate. El uso del modelo general para la selección de muestras por alto contenido (presión de selección del 10%) ofrece sensibilidades y especificidades del 100% para contenido en sólidos solubles, fructosa, glucosa y ácido cítrico. En el caso de los ácidos málico y glutámico la especificidad es menor (75%), pero las muestras seleccionadas de forma errónea se sitúan muy cerca del límite de selección. Al utilizar el modelo general para predecir las muestras de un ensayo externo dichas sensibilidades y especificidades son superiores al 70%, presentando un percentil medio próximo al correspondiente a una sensibilidad del 100%. Por lo tanto, los modelos obtenidos mediante FT-MIR si son extrapolables a otros ensayos, por lo que se puede prescindir de nuevos calibrados para cada ensayo.

- También se ha desarrollado una metodología de evaluación del perfil volátil de tomate mediante sistemas multisensor (nariz electrónica). Para ello se ha abordado la corrección de deriva en los sensores, tanto a corto como a largo plazo. La metodología propuesta utiliza modelos de corrección de deriva a corto plazo empleando datos de todas las repeticiones de una secuencia, y a largo plazo gracias a la estandarización de secuencias al emplear como referencia para la corrección un patrón sintético con una composición promedio de tomate. Con esta metodología integral de corrección de deriva se consigue que al corregir la deriva intradía se obtenga una reducción de entre el 1 y el 27% de RSD de señal de los sensores, mientras que la estandarización entre secuencias permite obtener una eficiencia de un 94.4 % de éxito en la superposición de muestras del mismo material. Tras esta corrección y estandarización de huellas electrónicas de cada uno de los genotipos que se van evaluando se pueden incluir en un gráfico PLS-DA en dos dimensiones (mapas de huellas electrónicas de volátiles) que se irá ampliando y completando a medida que se evalúan más genotipos. La corrección integral de señal puesta a punto permite comparar la similitud del perfil de nuevas muestras en un programa de mejora con el correspondiente a muestras de referencia que representen un objetivo en ese programa de mejora. Esta comparación gráfica de las similitudes de estas huellas electrónicas de volátiles con las de muestra objetivo permite disponer de un criterio de selección mucho más simple y eficaz para su uso en programas de mejora de lo que resulta el uso de cuantificaciones de volátiles mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

ANEXO

Salvador Antonio Roselló Ripollés, como coautor doy mi **autorización** a Ginés Ibáñez Vidal para la presentación de las siguientes publicaciones como parte de su tesis doctoral.

Relación de publicaciones:

Ibáñez, G., Cebolla-Cornejo, J., Martí, R., Roselló, S. y Valcárcel, M., 2019. Non-destructive determination of taste-related compounds in tomato using NIR spectra. *Journal of Food Engineering*, 263: 237-242. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.098>

Ibáñez, G., Valcárcel, M., Cebolla-Cornejo, J. y Roselló, S., 2019. FT-MIR determination of taste-related compounds in tomato: a high throughput phenotyping analysis for selection programs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99: 5140-5148. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.9760>

Valcárcel, M., Ibáñez, G., Martí, R., Beltrán, J., Cebolla-Cornejo, J., y Roselló, S., 2019. Evaluation of the volatile profile in breeding programs using e-noses: the role of drift correction. *Food Chemistry (pendiente envío a Food Chemistry)*.

Asimismo, **renuncio** a poder utilizar estas publicaciones como parte de otra tesis doctoral.

Y para que conste firmo el presente documento,

<p>SALVADOR ANTONIO ROSELLO RIPOLLES - NIF: 18959276P</p>	<p>Digitally signed by SALVADOR ANTONIO ROSELLO RIPOLLES - NIF:18959276P DN: cn=SALVADOR ANTONIO ROSELLO RIPOLLES - NIF:18959276P, SERIALNUMBER=18959276P, o=SALVADOR ANTONIO, sn=ROSELLO RIPOLLES, c=ES Reason: I am the author of this document Location: your signing location here Date: 2019.10.04 11:25:54 Full PrintoutPDF Version: 3.6.0</p>
--	--

En Castellón de la Plana, a 4 de octubre de 2019

Todo ello, atendiendo al artículo 23 de la Normativa de los Estudios de Doctorado, regulados por el RD 99/2011, en la Universitat Jaume I (Aprobada por el Consejo de Gobierno núm. 19 de 26 de Enero de 2012, modificada por el Consejo de Gobierno núm. 29 de 27 de Noviembre de 2012 y con posterior modificación por el Consejo de Gobierno núm. 37 de 25 de Julio de 2013):

"(...)

"*Aquellas tesis doctorales que opten por la incorporación de artículos (compendio de publicaciones) deben de ajustarse, en la medida de lo posible, a la siguiente estructura: -Introducción/objetivos - Un capítulo por artículo incorporado - Discusión general de los resultados - Conclusiones. -Aceptación de los coautores de que el doctorando presente el trabajo como tesis y renuncia expresa de estos a presentarlo como parte de otra tesis doctoral.*"

Jaime Cebolla Cornejo, como coautor doy mi **autorización** a Ginés Ibáñez Vidal para la presentación de las siguientes publicaciones como parte de su tesis doctoral.

Relación de publicaciones:

Ibáñez, G., Cebolla-Cornejo, J., Martí, R., Roselló, S. y Valcárcel, M., 2019. Non-destructive determination of taste-related compounds in tomato using NIR spectra. *Journal of Food Engineering*, 263: 237-242. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.098>

Ibáñez, G., Valcárcel, M., Cebolla-Cornejo, J. y Roselló, S., 2019. FT-MIR determination of taste-related compounds in tomato: a high throughput phenotyping analysis for selection programs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99: 5140-5148. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.9760>

Valcárcel, M., Ibáñez, G., Martí, R., Beltrán, J., Cebolla-Cornejo, J., y Roselló, S., 2019. Evaluation of the volatile profile in breeding programs using e-noses: the role of drift correction. *Food Chemistry (pendiente envío a Food Chemistry)*.

Asimismo, **renuncio** a poder utilizar estas publicaciones como parte de otra tesis doctoral.

Y para que conste firmo el presente documento,

JAIME|
CEBOLLA|
CORNEJO

Firmado digitalmente por JAIME|
CEBOLLA|CORNEJO
Nombre de reconocimiento (DN):
cn=JAIME|CEBOLLA|CORNEJO,
serialNumber=22570547A,
givenName=JAIME, sn=CEBOLLA
CORNEJO, ou=CIUDADANOS, o=ACCV,
c=ES
Fecha: 2019.10.04 10:51:03 +02'00'

En València, a 4 de octubre de 2019

Todo ello, atendiendo al artículo 23 de la Normativa de los Estudios de Doctorado, regulados por el RD 99/2011, en la Universitat Jaume I (Aprobada por el Consejo de Gobierno núm. 19 de 26 de Enero de 2012, modificada por el Consejo de Gobierno núm. 29 de 27 de Noviembre de 2012 y con posterior modificación por el Consejo de Gobierno núm. 37 de 25 de Julio de 2013):

"(...)

"*Aquellas tesis doctorales que opten por la incorporación de artículos (compendio de publicaciones) deben de ajustarse, en la medida de lo posible, a la siguiente estructura: -Introducción/objetivos - Un capítulo por artículo incorporado - Discusión general de los resultados - Conclusiones. -Aceptación de los coautores de que el doctorando presente el trabajo como tesis y renuncia expresa de estos a presentarlo como parte de otra tesis doctoral.*"

Joaquim Beltrán Arandes, como coautor doy mi **autorización** a Ginés Ibáñez Vidal para la presentación de las siguientes publicaciones como parte de su tesis doctoral.

Relación de publicaciones:

Valcárcel, M., Ibáñez, G., Martí, R., Beltrán, J., Cebolla-Cornejo, J., y Roselló, S., 2019. Evaluation of the volatile profile in breeding programs using e-noses: the role of drift correction. Food Chemistry (pendiente envío a Food Chemistry).

Asimismo, **renuncio** a poder utilizar estas publicaciones como parte de otra tesis doctoral.

Y para que conste firmo el presente documento,

En Castellón de la Plana, a 4 de octubre de 2019

JOAQUIN|
BELTRAN|ARANDES

Firmado digitalmente por
JOAQUIN|BELTRAN|ARANDES
Fecha: 2019.10.04 10:21:43
+02'00'

Todo ello, atendiendo al artículo 23 de la Normativa de los Estudios de Doctorado, regulados por el RD 99/2011, en la Universitat Jaume I (Aprobada por el Consejo de Gobierno núm. 19 de 26 de Enero de 2012, modificada por el Consejo de Gobierno núm. 29 de 27 de Noviembre de 2012 y con posterior modificación por el Consejo de Gobierno núm. 37 de 25 de Julio de 2013):

"(...)

"*Aquellas tesis doctorales que opten por la incorporación de artículos (compendio de publicaciones) deben de ajustarse, en la medida de lo posible, a la siguiente estructura: -Introducción/objetivos - Un capítulo por artículo incorporado - Discusión general de los resultados - Conclusiones. -Aceptación de los coautores de que el doctorando presente el trabajo como tesis y renuncia expresa de estos a presentarlo como parte de otra tesis doctoral.*"

Mercedes Valcárcel Germes, como coautor doy mi **autorización** a Ginés Ibáñez Vidal para la presentación de las siguientes publicaciones como parte de su tesis doctoral.

Relación de publicaciones:

Ibáñez, G., Cebolla-Cornejo, J., Marti, R., Roselló, S. y Valcárcel, M., 2019. Non-destructive determination of taste-related compounds in tomato using NIR spectra. *Journal of Food Engineering*, 263: 237-242. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.098>

Ibáñez, G., Valcárcel, M., Cebolla-Cornejo, J. y Roselló, S., 2019. FT-MIR determination of taste-related compounds in tomato: a high throughput phenotyping analysis for selection programs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99: 5140-5148. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.9760>

Valcárcel, M., Ibáñez, G., Marti, R., Beltrán, J., Cebolla-Cornejo, J., y Roselló, S., 2019. Evaluation of the volatile profile in breeding programs using e-noses: the role of drift correction. *Food Chemistry* (pendiente envío a Food Chemistry).

Asimismo, **renuncio** a poder utilizar estas publicaciones como parte de otra tesis doctoral.

Y para que conste firmo el presente documento,

En Castellón de la Plana, a 4 de octubre de 2019



Todo ello, atendiendo al artículo 23 de la Normativa de los Estudios de Doctorado, regulados por el RD 99/2011, en la Universitat Jaume I (Aprobada por el Consejo de Gobierno núm. 19 de 26 de Enero de 2012, modificada por el Consejo de Gobierno núm. 29 de 27 de Noviembre de 2012 y con posterior modificación por el Consejo de Gobierno núm. 37 de 25 de Julio de 2013):

"(...)

"*Aquellas tesis doctorales que opten por la incorporación de artículos (compendio de publicaciones) deben de ajustarse, en la medida de lo posible, a la siguiente estructura: -Introducción/objetivos - Un capítulo por artículo incorporado - Discusión general de los resultados - Conclusiones. -Aceptación de los coautores de que el doctorando presente el trabajo como tesis y renuncia expresa de estos a presentarlo como parte de otra tesis doctoral.*"

Raül Martí Renau, como coautor doy mi **autorización** a Ginés Ibáñez Vidal para la presentación de las siguientes publicaciones como parte de su tesis doctoral.

Relación de publicaciones:

Ibáñez, G., Cebolla-Cornejo, J., Martí, R., Roselló, S. y Valcárcel, M., 2019. Non-destructive determination of taste-related compounds in tomato using NIR spectra. *Journal of Food Engineering*, 263: 237-242. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.098>

Valcárcel, M., Ibáñez, G., Martí, R., Beltrán, J., Cebolla-Cornejo, J., y Roselló, S., 2019. Evaluation of the volatile profile in breeding programs using e-noses: the role of drift correction. *Food Chemistry* (pendiente envío a *Food Chemistry*).

Asimismo, **renuncio** a poder utilizar estas publicaciones como parte de otra tesis doctoral.

Y para que conste firmo el presente documento,

En Castellón de la Plana, a 4 de octubre de 2019



Todo ello, atendiendo al artículo 23 de la Normativa de los Estudios de Doctorado, regulados por el RD 99/2011, en la Universitat Jaume I (Aprobada por el Consejo de Gobierno núm. 19 de 26 de Enero de 2012, modificada por el Consejo de Gobierno núm. 29 de 27 de Noviembre de 2012 y con posterior modificación por el Consejo de Gobierno núm. 37 de 25 de Julio de 2013):

"(...)

"*Aquellas tesis doctorales que opten por la incorporación de artículos (compendio de publicaciones) deben de ajustarse, en la medida de lo posible, a la siguiente estructura: -Introducción/objetivos - Un capítulo por artículo incorporado - Discusión general de los resultados - Conclusiones. -Aceptación de los coautores de que el doctorando presente el trabajo como tesis y renuncia expresa de estos a presentarlo como parte de otra tesis doctoral.*"

