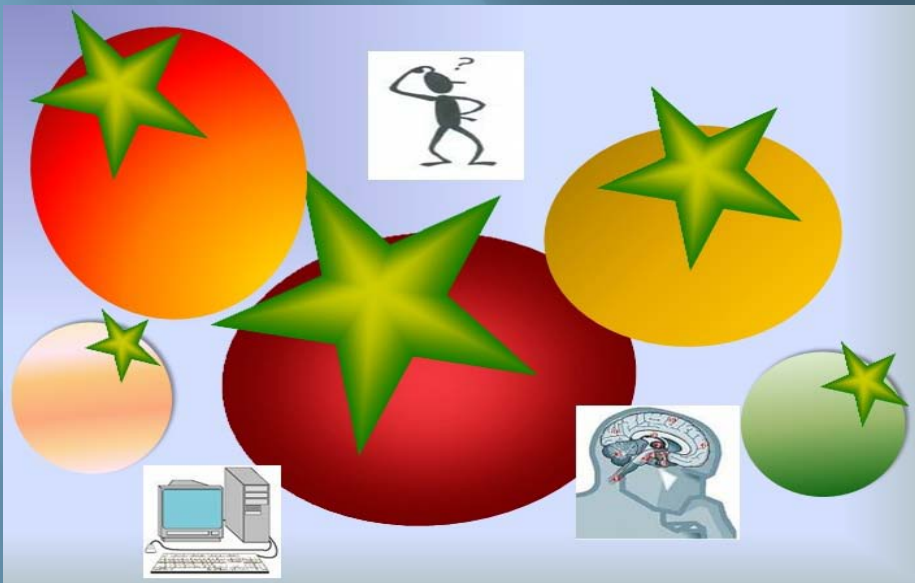


Escola Superior de Tecnologia i Ciències Experimentals
Departament de Ciències Agràries i del Medi Natural

Optimización del proceso de evaluación y selección de germoplasma de tomate por características de calidad organoléptica: uso de la tecnología NIR y sensores electrónicos



Tesis doctoral presentada por:
Mercedes Valcárcel Germes
Director: Salvador Roselló Ripollés

Castellón, Abril 2009



**UNIVERSITAT
JAUME·I**

Escola Superior de Tecnologia y Ciències Experimentals

Departament de Ciències Agràries i del Medi Ambient

**Optimización del proceso de evaluación y
selección de germoplasma de tomate por
características de calidad organoléptica:
uso de tecnología NIR y sensores
electrónicos**

Tesis Doctoral

Presentada por:

Mercedes Valcárcel Germes

Dirigida por:

Dr. Salvador Roselló Ripollés

EL DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Salvador A. Roselló Ripollés, Profesor Titular del Área de Producción vegetal del Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural de la Universitat Jaume I de Castellón.

HACE CONSTAR QUE:

La presente memoria de Tesis Doctoral, presentada por **Mercedes Valcárcel Germes**, titulada “**Optimización del proceso de evaluación y selección de germoplasma de tomate por características de calidad organoléptica: uso de tecnología NIR y sensores electrónicos**” realizada en el Área de Producción Vegetal de la Universitat Jaume I de Castellón, reúne las condiciones necesarias para su defensa,

Fdo. Dr. Salvador Roselló Ripollés

AGRADECIMIENTOS

Estos años dedicados a la realización de mi Tesis Doctoral han sido tan importantes para mí, y tantas personas han contribuido a ello, que es una necesidad agradecerles que de una forma u otra me hayan ayudado a recorrer este camino.

En primer lugar, a mi director de tesis, el Dr. Salvador Roselló por su inestimable ayuda en este trabajo, porque sin su guía y apoyo no hubiera podido llevarlo a cabo. A él le debo que me haya “picado el gusanillo” de la investigación y que no me ponga a temblar cada vez que oigo la palabra estadística. Por su confianza, sus buenos consejos y por saber siempre cuando necesitaba palabras de ánimo sin necesidad de pedir las.

A María, que empezó conmigo esta andadura y siempre ha tenido su mano tendida cuando lo he necesitado. Por ser mi incansable compañera de fatigas, tanto en el laboratorio como en esas incontables horas de tren. Gracias por estar siempre ahí.

A mis actuales compañeros de laboratorio, Alba, Almudena, Adriana, Rosa A., Josué, Carlos C., por compartir conmigo no solo un espacio físico sino unos momentos inolvidables. Y a los que, aunque ya no estén en el laboratorio, han dejado su huella en cada rincón: Javi, Vicent, Iván, Kelly, Iker, Laura, Joules, Zahed, María, Ximo y Diego. A Rosa P. y Aurelio, porque a pesar de ser “el anejo”, siempre me han tratado como a una más.

A los “vecinos de pasillo” de Fisiología Vegetal y Entomología, por echarme una mano siempre que lo he necesitado; a Sergio y Pilar T., por

mimar tanto mis tomates y al grupo de Química Analítica por la ayuda prestada.

A la Fundació Caixa Castelló – Bancaixa por la financiación (Proyecto PI-1B2005-26) que nos ha permitido desarrollar los ensayos que han dado lugar al primer capítulo de esta Tesis.

Por último, quiero agradecer a mi familia su apoyo incondicional. A mis padres, por su paciencia y comprensión, porque sin ellos nunca habría llegado donde estoy. A mis hermanos, Santi, Josevi y Lucia, porque han sido mi ejemplo a seguir desde que era la “pulga” de la familia y lo siguen siendo, cada día un poquito más. A Mayte, Laura y Quino, por ser mis “hermanos postizos”. A Aurora y Nina, por saber escucharme como nadie. Y como no, a mis siete soletes, Santi, Iván, Daniela, Pablo, Alejandro, Rodrigo y Lucia, porque siempre consiguen arrancarme una sonrisa y hacerme olvidar los problemas. Gracias de corazón.

A mi familia



Índice

ÍNDICE.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	v
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1. COMPONENTES DE CALIDAD ORGANOLÉPTICA EN TOMATE PARAFRESCO.....	3
2. ESTADO ACTUAL DE LA CALIDAD ORGANOLÉOTICA DEL TOMATE PARA CONSUMO EN FRESCO Y OBJETIVOS DE MEJORA	9
3. DIFICULTADES DE LA MEJORA DE LA CALIDAD ORGANOLPTICA EN TOMATE.....	11
4. PERSPECTIVAS DE FUTURO EN LA MEJORA DE LA CALIDAD ORGANOLÉPTICA DEL TOMATE PARA CONSUMO EN FRESCO.....	15
5. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CERCANO (NIR).....	18
5.1 Aspectos generales.....	18
5.2 Principios de medida.....	20
5.3 Partes del equipo.....	22
5.3.1 Fuente de radiación.....	23
5.3.2 Sistemas de detección de longitudes de onda.....	24
5.3.3. Detector.....	25
5.3.4 Compartimento para la muestra.....	25
5.4 Ventajas e inconvenientes.....	26
6. SISTEMAS MULTIORGANOLÉPTICOS.....	27
6.1 Definición.....	27
6.2 Partes de los equipos.....	29

6.2.1 Toma de muestra.....	30
6.2.2 Sensores.....	30
6.2.3 Técnicas quimiométricas.....	36
6.3 Ventajas e inconvenientes.....	42
7. BIBLIOGRAFÍA.....	43
OBJETIVOS GENERALES.....	51
CAPÍTULO 1.....	55
RESUMEN.....	57
1. INTRODUCCIÓN.....	59
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	61
2.1 Diseño del ensayo.....	61
2.2 Obtención del espectro NIR.....	63
2.3 Determinaciones analíticas.....	64
2.4 Análisis de datos.....	65
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	73
3.1 Modelos de predicción del contenido en sólidos solubles, azúcares y ácidos a partir de espectros NIR..	74
3.2 Modelos relacionados con aromas.....	80
3.3 Repetitividad de los modelos.....	85
4. CONCLUSIONES.....	90
5. BIBLIOGRAFÍA.....	91
CAPÍTULO 2.....	97
RESUMEN.....	99
1. INTRODUCCIÓN.....	101
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	107

2.1 Diseño del ensayo.....	107
2.2 Patrón sintético y material vegetal.....	109
2.3 Equipo y metodología de análisis del perfil aromático	113
2.4 Análisis de datos.....	115
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	122
4. CONCLUSIONES.....	136
5. BIBLIOGRAFÍA.....	138
CAPÍTULO 3.....	145
RESUMEN.....	147
1. INTRODUCCIÓN.....	149
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	153
2.1 Diseño experimental.....	153
2.2 Material vegetal.....	154
2.3 Análisis del perfil aromático.....	155
2.4 Análisis de datos.....	158
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	162
4. CONCLUSIONES.....	169
5. BIBLIOGRAFÍA.....	170
CONCLUSIONES GENERALES.....	175

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura C1.1: Representación geométrica del significado de los residuos Q y T ² de Hotelling en los modelos de regresión PLS...	68
Figura C1.2: Espectros NIR medios (Absorbancias calculadas) de los cvs estudiados: a) sin pretratar y b) pretratados (SNV).....	73
Figura C1.3: Representación gráfica de la bondad de ajuste del modelo PLS de predicción del contenido de °Brix a partir del espectro NIR pre tratado.....	75
Figura C1.4: Representación gráfica de la bondad de ajuste del modelo PLS de predicción del contenido de °Brix a partir del espectro NIR pre tratado y su eficacia de predicción.....	75
Figura C1.5: Intervalos IPLS que reducen el RMSECV del modelo de calibrado para la predicción del °Brix a partir del espectro NIR pre tratado.....	78
Figura C1.6: Predicción del contenido en glucosa de las muestras del primer ensayo a partir del modelo de calibrado de glucosa desarrollado con las muestras del segundo ensayo	87
Figura C1.7: Predicción del contenido en fructosa de las muestras del invernadero en el segundo ensayo (triángulos rojos) a partir del modelo de calibrado de fructosa (línea verde) desarrollado con las muestras de la parcela del segundo ensayo (puntos negros).....	89
Figura C2.1: Respuesta normalizada para el sensor PA/2 ante una muestra de tomate.....	114
Figura C2.2: Deriva de los sensores al analizar muestras de patrón sintético a lo largo de día.....	124
Figura C2.3: Deriva de los sensores al analizar muestras del cultivar Caramba a lo largo de día.....	125

Figura C2.4: Representación no paramétrica del patrón sintético frente al tiempo para el sensor LY2/gCTI correspondiente a la secuencia del primer día de trabajo.....	129
Figura C2.5: Evolución de los sensores con el tiempo del cultivar Caramba a lo largo de un día tras la corrección de la deriva.....	132
Figura C2.6: Representación de las dos primeras variables latentes obtenidas en el modelo de calibrado de la clasificación PLS-DA de las matrices de señal electrónica corregida obtenidas durante los tres días de trabajo y después de estandarizarlas.....	135
Figura C3.1: Respuesta dada por el sensor PA/2 a una muestra de tomate, representando la variación de resistencia (medido en K ohms) que sufre el sensor al entrar en contacto con la fracción volátil de la muestra frente al tiempo.....	157

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.1: Composición del fruto de tomate maduro.....	4
Tabla I.2: Algunos compuestos importantes en el aroma del tomate	6
Tabla C1.1: Resumen de los parámetros que definen la bondad de ajuste de los modelos de regresión PLS para predicción de las variables analíticas relacionadas con el sabor a partir de espectros NIR.....	76
Tabla C1.2: Resumen de los parámetros que definen la bondad de ajuste de los modelos de regresión PLS para predicción de los compuestos aromáticos que se han citado como más representativos del aroma del tomate.....	82
Tabla C1.3: Resumen de los parámetros que definen la bondad de ajuste de los modelos de regresión PLS para predicción de los compuestos aromáticos menos representativos del aroma del tomate.....	83

Tabla C1.4: Resumen de los parámetros que definen la bondad de ajuste de los modelos de regresión PLS para predicción de las variables analíticas relacionadas con el sabor a partir de espectros NIR en el segundo ensayo tanto al aire libre como en invernadero..	86
Tabla C2.1: Composición del patrón sintético de tomate utilizado en los ensayos.....	110
Tabla C2.2: Porcentajes de acierto (validación cruzada) en la clasificación PLS-DA para cada uno de los genotipos y el patrón sintético de las muestras analizadas para un día de trabajo tipo....	127
Tabla C2.3: Porcentajes de acierto de validación cruzada en la clasificación PLS-DA para cada uno de los cultivares en estudio y el patrón sintético con las respuestas obtenidas los tres días de trabajo, antes y después de la estandarización.....	134
Tabla C3.1: Porcentajes de acierto de la validación cruzada en la clasificación PLS-DA de los cinco cultivares estudiados en función del tiempo de incubación empleado en el análisis.....	162
Tabla C3.2: Variables seleccionadas para cada uno de los tiempos de incubación.....	164
Tabla C3.3: Porcentaje de aciertos de validación cruzada en la clasificación PLS-DA para cada uno de los genotipos analizados en el Capítulo 2.....	167



Introducción general

1. COMPONENTES DE CALIDAD ORGANOLÉPTICA EN TOMATE PARA FRESCO.

La calidad organoléptica se refiere fundamentalmente a las sensaciones que experimentamos al probar y consumir un alimento y se relaciona con los aspectos gustativos (dulzor, acidez, etc.), olfativos (aroma, perfume, etc.) y táctiles (firmeza, textura, etc.). Dentro de los factores que determinan la calidad organoléptica el sabor es el que normalmente tiene mayor impacto en la percepción de esta por el consumidor. El sabor del tomate guarda una relación directa con su composición química (Tabla I.1), especialmente con el contenido de azúcares reductores y ácidos orgánicos, que va a variar dependiendo de la especie considerada y del grado de madurez del fruto. Variaciones en las concentraciones de azúcares y ácidos contribuyen significativamente a las variaciones de sabor en tomate, siendo más intenso el sabor a mayores concentraciones de estos compuestos (Stevens, *et al.* 1977). Los azúcares reductores representan en el tomate aproximadamente entre el 1 y el 4,5% del peso fresco del fruto, lo que equivale aproximadamente al 50% de la materia seca y al 65% del contenido en sólidos solubles (CSS). La glucosa y la fructosa son los principales azúcares presentes aproximadamente en la misma proporción en el tomate maduro. La sacarosa, que es la principal forma de transporte de fotoasimilados de las hojas, no suele exceder el 0,1% del peso fresco (Thakur, *et al.* 1996, Mahakun, *et al.* 1979) Los ácidos orgánicos, principalmente cítrico y málico,

representan entre el 0,3 y el 1% del peso fresco del fruto y más del 10% de la materia seca (Mahakun, N., *et al.* 1979). Azúcares y ácidos orgánicos representan la casi totalidad de los sólidos solubles del fruto de tomate.

Tabla I.1: Composición del fruto de tomate maduro (Abushita, *et al.* 1997, Davies y Grant. 1987)

	Grupo	Constituyentes	Contenido (g/100 g peso seco)
Sólidos insolubles en alcohol	<i>Proteínas</i>		8
	<i>Pectinas</i>		7
	<i>Hemicelulosa</i>		4
	<i>Celulosa</i>		6
Sólidos solubles	<i>Ácidos orgánicos</i>	Ácido cítrico	9
		Ácido málico	4
	<i>Minerales</i>	K+, Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , P	8
	<i>Azúcares</i>	Glucosa	22
		Fructosa	25
		Sacarosa	1

Tabla I.1 Cont.: Composición del fruto de tomate maduro (Abushita, *et al.* 1997, Davies y Hobson. 1981)

Otros componentes importantes	<i>Lípidos</i>	(principalmente licopeno)	2
	<i>Aminoácidos dicarboxílicos</i>		2
	<i>Vitaminas</i>		0,5
	<i>Pigmentos</i>		0,4
	<i>Compuestos volátiles</i>		0,1

El aroma está determinado por sustancias volátiles que a pesar de su bajísima concentración (0,0003 % del peso fresco) son detectados por los órganos gustativos y olfatorios y confieren al tomate una personalidad particular. Estos constituyentes volátiles pertenecen a diferentes grupos orgánicos: alcoholes, ésteres, aldehídos, cetonas, ácidos, hidrocarburos, aminas, amidas, etc. En tomate se han identificado unos 400 compuestos volátiles de los que se considera que solamente una treintena son los principales responsables del aroma en el tomate fresco, siendo casi todos ellos derivados del metabolismo de los ácidos grasos y de aminoácidos o de la degradación de los carotenoides (Tabla I.2). El aroma típico de los tomates es el resultado de una combinación desconocida de muchos de estos compuestos volátiles (Cebolla-Cornejo, *et al.* 2006, Buttery y Ling. 1993) y además presenta importantes diferencias entre variedades.

Tabla I.2. Algunos compuestos importantes en el aroma del tomate (Grasselly, *et al.* 2000, Saliba Colombani, *et al.* 2001)





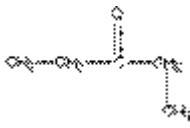


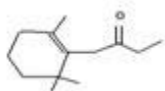

Origen metabólico	Compuesto	Estructura	Olor	Límite percepción (ppb)
Ácidos grasos	Hexanal 1		Verde, tomate verde, hierba	4,5
	(E)-Hex-2-enal		Manzana, almendra	17
	Cis-3-hexenol 2		Verde	70
	Cis-3-hexenal 3		Manzana verde	0,25
	1-Penten-3-ona 4		Químico, verde, plástico	
	Pentanal			
Degradación de pigmentos	6-metil-5-hepten-2-ona 3		Haba verde, perejil	50
	b-ionona 3		Floral, violeta	0,007
	Geranilacetona 4		Magnolia	60

Tabla I.2 Cont. Algunos compuestos importantes en el aroma del tomate (Grasselly, *et al.* 2000, Saliba Colombani, *et al.* 2001)

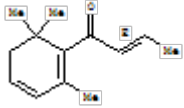
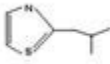


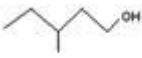

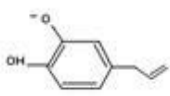
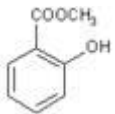



Origen metabólico	Compuesto	Estructura	Olor	Límite percepción (ppb)
Degradación de pigmentos	b-damascenona 3		Rosa	0,002
Aminoácidos	2-Isobutiltiazol 5		Tomate verde	3,5
	2-Feniletanol		Flor, rosa, verde	86
	2-Metilbut-2-enal			
	3- Metilpentan-1-ol			
	3-(Metiltio)propanal		Patata	
	3-Metilbutanol	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3\text{C}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	Alcohol	250
Compuestos fenólicos	Eugenol 2		Espicias, banana, clavo	6
	Salicilato de metilo		Menta	40

Tabla I.2 Cont. Algunos compuestos importantes en el aroma del tomate (Grasselly, *et al.* 2000, Saliba Colombani, *et al.* 2001)

Origen metabólico	Compuesto	Estructura	Olor	Límite percepción (ppb)
Compuestos fenólicos	Ortometoxifenol		Menta, verde, alcanfor, clavo	
Desconocido	Pentan-3-one			
	2-(Metiltio)etanol			

1 El de mayor contribución al olor del tomate

2 Diferencias importantes por el grado de madurez. Sin diferencias entre cultivares.

3 De alto valor aromático.

4 Diferencias entre cultivares. Sin diferencias por el grado de madurez

5 Importante para diferenciar entre cultivares. Se utiliza como intensificador del aroma de los productos a base de tomate.

La firmeza es una característica mecánica de la calidad de los tomates. Influye en la resistencia de los frutos a las manipulaciones y en su masticabilidad. Depende de la estructura de su pared celular y del grado de unión de sus células. El proceso de ablandamiento en el tomate es debido a enzimas pectinolíticas que causan la ruptura de sustancias pécticas y hemicelulosas, fundamentalmente, ocasionando un debilitamiento de la pared celular y de las fuerzas de unión entre las células (Angosto y Borja. 2000).

La textura es una característica que resulta de la percepción de la pulpa del fruto en la boca, de la presencia del gel contenido en los lóculos del fruto y del grosor o elasticidad de la piel. El gel tiene un papel muy

importante en la percepción global de la jugosidad del tomate. En el estado maduro, la proporción de gel en las variedades de calibre intermedio puede variar del 20 al 30% del peso total del fruto. Otros criterios utilizados para caracterizar la textura, hacen referencia a aspectos negativos tales como el grosor de la piel, la harinosidad de la pulpa, la aparición de zonas fibrosas dentro de la pulpa o la presencia de fibras a nivel del haz vascular central del fruto.

La textura, por diferentes aspectos y sobre todo debido a la heterogeneidad del fruto, es difícil de medir de manera instrumental y la valoración de la misma hoy en día se hace principalmente con análisis sensoriales.

2. ESTADO ACTUAL DE LA CALIDAD ORGANOLÉOTICA DEL TOMATE PARA CONSUMO EN FRESCO Y OBJETIVOS DE MEJORA.

Actualmente se pueden diferenciar dos grupos de material vegetal de tomate para consumo en fresco en función de su calidad organoléptica, las variedades tradicionales y los cultivares modernos. Es necesario describir las características propias de cada uno de estos tipos de material vegetal porque los objetivos de mejora para cada uno de ellos son distintos.

Los cultivares tradicionales presentan en general una excelente calidad organoléptica, aunque el aspecto del fruto, su uniformidad y la resistencia de la planta a patógenos sean deficientes en muchos casos. En ellos, los objetivos de mejora no incluyen generalmente la mejora de una

calidad interna, sino la inclusión de resistencias a patógenos, para poder disponer de cosecha. Este objetivo de mejora no es objeto de esta introducción. Sin embargo, si que es importante resaltar que por la amplia variabilidad genética que atesoran (Adalid, *et al.* 2008, Cebolla-Cornejo. 2005) son muy interesantes como fuente de variabilidad para la mejora de la calidad interna de los cultivares modernos.

Los cultivares modernos de tomate están adaptados a las cadenas de producción-consumo, presentan una gran diversidad de tipos, una corta vida media, suelen ser de naturaleza híbrida (especialmente los dedicados al cultivo intensivo), tienen incorporadas diversas resistencias a patógenos y producen fruta con buena calidad externa (forma, tamaño, color, uniformidad). Sin embargo, hace años que los consumidores se quejan de la pérdida de calidad organoléptica de estos cultivares, estando muy extendida la idea de que sus frutos son “un elegante contenedor de agua”. Esta pérdida de calidad organoléptica ha sido debida a que se ha dado prioridad a otras exigencias comerciales (buena presentación, uniformidad y tipificación de la fruta) y a la agresividad del mercado de nuevos cultivares (implantación rápida de las novedades y reemplazamiento continuo de las mismas). Además, la paulatina pérdida de calidad de estos cultivares también está asociada al cultivo fuera de estación y la recolección del fruto en un estado excesivamente verde para prolongar su vida comercial (Nuez. 1995).

Las exigencias de calidad organoléptica de los consumidores lo hacen un objetivo de mejora inaplazable en estos cultivares. De la descripción del concepto de calidad organoléptica del epígrafe anterior se deduce que para desarrollar este objetivo de mejora es importante incrementar el contenido en azúcares y ácidos orgánicos puesto que estos representan más del 60% de los sólidos solubles e influyen directamente sobre la intensidad de sabor (Stevens, *et al.* 1977). Resulta necesario

recuperar los perfiles aromáticos típicos de las variedades tradicionales, ya que estos compuestos volátiles condicionan en gran medida no solo el aroma sino también el sabor de los frutos de tomate (Buttery y Ling, 1993). Para los cultivares actuales se desean frutos de carne firme y cuyo proceso de maduración sea más lento ya que esto permitirá la maduración en mata y una mayor vida comercial. No obstante, este objetivo de mejora se ha logrado ampliamente, puesto que en el mercado existen cultivares modernos con características del larga vida, aunque algunos de ellos (los que llevan genes mutantes que afectan al proceso de maduración del fruto; *rin*, *nor*, *Nr* y *Nr-2* principalmente) tienen características deficientes de sabor y aroma (Chalukova y Manuehyan, 1991, McGlasson, *et al.* 1987).

3. DIFICULTADES DE LA MEJORA DE LA CALIDAD ORGANOLÉPTICA EN TOMATE

Actualmente existen dos grandes estrategias para transferir genes a líneas de mejora seleccionadas con el fin de incrementar su calidad organoléptica. La primera estrategia consiste en explotar la amplia variabilidad natural para componentes de sabor presentes en el género *Solanum* sección *Lycopersicon*. Los parentales donantes son seleccionados del germoplasma de tomate silvestre y cultivado (especialmente variedades tradicionales y líneas de tomate de industria) después de evaluar sus características de calidad organoléptica. Posteriormente, se inicia un programa de mejora que incluye cruzamientos con líneas de mejora, varias generaciones de retrocruzamientos (en ocasiones con generaciones de autofecundación intercaladas) y selección por características de sabor y comportamiento agronómico. Una segunda estrategia está empezando a

cobrar importancia debido al gran desarrollo de la ingeniería genética en las últimas décadas: la introducción artificial de genes (procedentes de otros organismos o sintetizados *in vitro*) en plantas de tomate. Estos genes foráneos pueden alterar varias rutas metabólicas y aumentar el contenido en uno o varios compuestos relacionados con la calidad interna.

Independientemente de las estrategias de mejora usadas para incrementar el sabor en tomate, durante los programas de mejora surgen dos dificultades principales. La primera es la dificultad de conseguir una caracterización del sabor rápida, amplia y precisa en líneas de tomate. La segunda es la elevada influencia ambiental en la expresión de las propiedades de sabor en tomate (Dorais, *et al.* 2001, Tandon, *et al.* 2000, Veit, *et al.* 1999). Estos dos factores hacen la selección de genotipos de élite muy compleja.

Como se ha indicado anteriormente, el sabor del tomate es un carácter muy complejo y por ello es muy difícil tener criterios claros e incuestionables para caracterizarlo. Hay muchos compuestos químicos implicados y no solo es importante la cantidad de cada compuesto, sino también la proporción entre ellos. La percepción más directa del sabor en tomate viene dada por la evaluación sensorial. Este criterio de evaluación, tradicionalmente llevado a cabo por los agricultores cuando seleccionaban sus variedades, es importante pero subjetivo, largo y tedioso. El uso de paneles de catadores en programas modernos de mejora de tomate es muy caro e inviable. Se consume mucho tiempo y dinero entrenando a los catadores en un carácter muy complejo con muchísimas variables implicadas, por lo que plantear la valoración de miles de muestras en sucesivas generaciones segregantes utilizando este método es poco realista. Los paneles de catadores deben emplearse para evaluar genotipos

seleccionados pero no pueden usarse como una herramienta de selección y caracterización rutinaria.

Para simplificar los criterios de selección y valoración, los mejoradores han intentado evitar las determinaciones sensoriales y las han reemplazado con determinaciones analíticas más fáciles de realizar y más rápidas de los principales compuestos químicos no volátiles involucrados en el sabor del tomate. De este modo, muchos trabajos se han llevado a cabo determinando variables que agrupan conjuntos de sustancias, como CSS (°Brix), pH o acidez titulable, las cuales están relacionadas con algunos aspectos de sabor (principalmente intensidad del sabor (Stevens, *et al.* 1977). Sin embargo el CSS, el pH y la acidez valorable no son medidas precisas (hay muchos compuestos químicos involucrados en cada uno de ellos) y su medida no puede explicar la contribución relativa de cada compuesto. Por eso, es imposible distinguir con estos determinados matices ácidos o azucarados, que vienen dados por componentes muy diferentes pero con contribuciones similares en los valores de grados Brix, pH o acidez valorable. Esta es la razón por la que la selección basada en estos parámetros no es eficiente.

Hoy en día las medidas de °Brix, pH o acidez valorable pueden ser sustituidas por determinaciones químicas precisas de cada uno de los componentes no volátiles involucrados en el sabor del tomate. Los ácidos orgánicos (principalmente cítrico, málico, oxálico y glutámico) y azúcares (principalmente glucosa, fructosa y sacarosa) involucrados en la intensidad del sabor pueden ser cuantificados de forma muy precisa con técnicas como la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (Baldwin, *et al.* 1991, Berg y Canessa. 1998, Takemoto, *et al.* 1985) o electroforesis capilar zonal (CZE) (Roselló, *et al.* 2002). De este modo, se consigue una mayor precisión

de la caracterización del sabor. No obstante, para aplicar estas técnicas son necesarios personal cualificado e instrumentación cara.

El análisis químico de sustancias volátiles implicadas en el sabor y el aroma en tomate tradicionalmente se ha evitado debido a su complejidad. Hoy en día, el gran avance científico en técnicas e instrumentos de cromatografía de gases y espectrometría de masas permite una cuantificación precisa y una identificación sensible de compuestos volátiles involucrados en el sabor y el aroma (incluso en las muestras con trazas de analitos y matrices complejas) (Brauss, *et al.* 1998, Rodríguez-Bernaldo de Quiros, *et al.* 1998, Song, *et al.* 1998, Beltrán, *et al.* 2006) En cualquier caso, también necesitan equipos muy caros y personal altamente cualificado.

Junto a las dificultades en la cuantificación química de los componentes del sabor del tomate, hay otro problema importante: la elevada influencia de las variables agronómicas y ambientales (tales como la estación, localidad, condiciones climáticas durante el crecimiento, precocidad del fruto) en las características del sabor de los frutos de tomate (Tandon, *et al.* 2000). Por ejemplo, alta conductividad eléctrica y valores de NaCl en soluciones acuosas propician aumentos en la intensidad de sabor (Dorais, *et al.* 2001). La reducción en el aporte de agua implica mayores niveles de azúcares, ácidos totales, algunos compuestos volátiles [aldehídos C6 (hexanal, (Z)-3-hexenal y (E)-2-hexenal)] y ácido ascórbico, los cuales incrementan la calidad de los frutos de tomate (Veit, *et al.* 1999). Por lo tanto, en los trabajos de evaluación y selección de líneas con alto valor organoléptico es preciso tener en cuenta las variables ambientales y agronómicas y controlarlas en la medida de lo posible. Por ello, junto con el desarrollo de métodos de cuantificación rápida y precisa de componentes de calidad interna son necesarios estudios que permitan modelizar las fluctuaciones causadas por factores como el ambiente (temperatura,

radiación, suministro de agua, etc.) y variables agronómicas (protección, suelo, sustrato, nutrientes, etc.) en el contenido de componentes de calidad interna en tomate. De esta forma se podría precisar cuál es la contribución del genotipo (separándola de la contribución del ambiente) en la expresión de propiedades de sabor y caracterizar genotipos de élite con más precisión. Esto también contribuiría a resolver uno de los problemas más comunes en los trabajos de identificación de marcadores moleculares (Bucheli, *et al.* 1999b, Bucheli, *et al.* 2001, Fridman, *et al.* 2000, Fridman, *et al.* 2002, Goldman, *et al.* 1995, Grandillo y Tanksley. 1996, Paterson, *et al.* 1988, Paterson, *et al.* 1991) al mejorar el “fenotipado” de generaciones segregantes.

4. PERSPECTIVAS DE FUTURO EN LA MEJORA DE LA CALIDAD ORGANOLÉPTICA DEL TOMATE PARA CONSUMO EN FRESCO.

El uso de germoplasma de *Solanum* sección *Lycopersicon* como fuente de variación para aumentar el sabor del tomate será una estrategia de mejora importante durante bastante tiempo. Se ha destapado una importante variabilidad en el germoplasma de *Solanum* sección *Lycopersicon* para estos caracteres pero todavía queda mucho germoplasma por evaluar por lo que será necesaria la identificación de nuevas fuentes de variabilidad, sobre todo entre las variedades tradicionales de tomate. También será necesario establecer métodos y criterios de selección más precisos. En la mejora de la calidad organoléptica, la selección no se realizará considerando valores de

CSS o de pH, que por ser complejos tienen baja heredabilidad, alta complejidad y baja eficiencia en la selección. Se llevará a cabo con caracteres simples, como el contenido de glucosa, fructosa, sacarosa, ácido málico, ácido cítrico, (Z)-3-hexenal, 1-penten-3-ona, 1-octen-3-ona, (E,E)-2,4 hexadienal, etc. Este enfoque se ve apoyado por el hecho de que algunos trabajos han sugerido que las diferencias entre donantes y receptores en el número de genes que controlan las rutas metabólicas de la acumulación de azúcares y ácidos se deben a un gen (Egashira, *et al.* 1999, Lambeth, *et al.* 1996, Stevens y Long. 1971, Walkof y Hyde. 1963, Yelle, *et al.* 1991) o a pocos genes (Lower y Thompson. 1967). Por tanto, estos caracteres pueden ser manejados como monogénicos u oligogénicos en programas de mejora. Además, algunos de estos genes están relacionados con marcadores moleculares (Egashira, *et al.* 1999, Tadmor, *et al.* 2002), lo cual significará el manejo de varios caracteres simples en lugar de uno o dos poligénicos. La identificación de marcadores moleculares abandonará completamente el “fenotipado” basado en caracteres envolventes complejos como el CSS y se apoyará cada vez más en el “fenotipado” de componentes individuales del sabor del tomate, tanto azúcares y ácidos como compuestos volátiles y propiedades físicas del fruto. Además, la precisión en el “fenotipado” se mejorará no solo por la mejora de las técnicas analíticas sino también por los estudios de modelización de la influencia del ambiente sobre la expresión de estos caracteres de calidad que permitirán precisar más en la estima de la contribución del genotipo a la expresión de los caracteres considerados.

En estrategias de mejora que usan transformación genética, los primeros resultados han revelado que este enfoque todavía es una posibilidad incipiente. El aumento o cambio en un componente no es suficiente para obtener una nueva variedad de tomate con más sabor (y además compensado). Además, la transformación no se hace siempre con éxito,

necesita más estudios hasta poder aplicarse de forma práctica. Por otro lado, como ya hemos indicado, la transgenia es rechazada por un importante sector de consumidores, por lo que aún pasará un tiempo hasta que pueda tener una incidencia comercial. Sin embargo, presenta posibilidades que resultan muy atractivas para el mejorador, por ejemplo, la expresión diferencial de secuencias en tejidos distintos y la inclusión de más de una secuencia para obtener un sabor compensado; la transgenia permitirá acelerar los programas de mejora del sabor en tomate para fresco.

Por otro lado, la caracterización analítica de las propiedades de sabor en líneas de tomate llegará a ser un aspecto muy importante en programas de mejora. Hasta ahora, la principal limitación era que no resulta posible analizar el elevado número de muestras que se manejan en programas de mejora. No obstante, el gran desarrollo de técnicas como la espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR) permite predecir en campo con un error razonable, de forma rápida y no destructiva la composición de varios compuestos de naturaleza química diversa implicados en la calidad interna del tomate. Por tanto, permitirá realizar una primera preselección en un número elevado de muestras y posteriormente, las muestras preseleccionadas podrán ser evaluadas con mayor precisión con otro tipo de técnicas. Para esta segunda etapa de evaluación tendrán cada vez más importancia las metodologías analíticas que permitan sustituir la evaluación sensorial humana por una caracterización instrumental equivalente pero con un mayor grado de sensibilidad, precisión, automatización y reproducibilidad. Esta tendencia se puede ver en la evaluación de volátiles implicados en el aroma del tomate usando sistemas de sensores electrónicos.

Dada la importancia creciente de estos dos enfoques de evaluación instrumental de características de calidad organoléptica en tomate y que la presente Tesis doctoral está enfocada a la optimización de estas

metodologías para su uso en la evaluación y selección de genotipos de tomate con características de calidad organoléptica sobresalientes se describirán a continuación con mayor detalle.

5. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CERCANO (NIR)

5.1 Aspectos generales

El descubrimiento de la región espectral del infrarrojo cercano, conocida habitualmente como NIR (del inglés, *Near-Infrared*), se atribuye a William Herschel (Herschel. 1800) cuando en 1800 observó que el efecto del calentamiento relativo que se generaba por las distintas porciones del espectro de la luz solar al atravesar un prisma continuaba aumentando cuando ponía el termómetro más allá del rojo del espectro visible.

Sin embargo, hasta casi un siglo después no se aplicó como técnica analítica, cuando Abney y Festing (1881) (Abney y Festing. 1881) registraron el espectro de líquidos orgánicos en la región espectral comprendida entre 700 y 1200 nm. La principal razón de su escasa aplicación era su complejidad en comparación con las regiones del infrarrojo medio (MIR) y lejano (FIR). Estas regiones proporcionan gran cantidad de información útil a través de la utilización de métodos univariantes de tratamiento de datos debido a que los picos espectroscópicos están resueltos y se pueden interpretar directamente. El espectro NIR, por el contrario, se caracteriza por bandas anchas, solapadas y de poca intensidad que dificultan la asignación visual de bandas a estructuras o grupos funcionales.

A mediados de los años 50, Wilbur Kaye presentó dos publicaciones en las que se determinaba humedad, proteínas y grasas en productos agrícolas (Kaye. 1955, Kaye. 1954). A partir de ese momento surgen otras publicaciones que describen diversas determinaciones cuantitativas en la región NIR (Ben-Gera y Norris. 1968a). Fue sobre el 1960 cuando el grupo de investigación de K.H. Norris en los Laboratorios Beltsville pertenecientes al USDA (*United States Department of Agricultura*) desarrolló un método usando espectroscopia NIR para el estudio de matrices complejas de origen natural. Aunque primero fue aplicado en el análisis de soja (Abney y Festing. 1881, Mitchell, *et al.* 1957) la aplicación más importante fue la determinación del contenido de proteínas en trigo. De hecho, hoy en día aún se utiliza de forma rutinaria (Williams. 1979, Osborne, *et al.* 1982, Downey y Byrne. 1983) A partir de ese momento, el interés por la espectroscopía NIR aumentó considerablemente.

Sobre 1980 hay un cambio importante en la tecnología NIR, cuando instrumentos NIR autónomos llegaron a estar ampliamente disponibles. Hasta entonces, el rango espectral del infrarrojo cercano solo se ofrecía como longitudes de onda bajas o altas añadidas a los espectrómetros de laboratorio de ultravioleta-visible (UV/Vis) o infrarrojo medio (MIR). Sin embargo, necesitó otra década de intensa convicción antes que la espectroscopia de infrarrojo cercano llegara a ser una técnica generalmente aceptada.

En los últimos 10 años, la espectroscopia de infrarrojo cercano ha llegado a ser una técnica muy popular para un amplio rango de análisis en varias industrias. La utilidad de esta técnica es principalmente atribuida a su capacidad de realizar análisis de forma rápida y no destructiva en gran cantidad de materiales. Por otro lado, mejoras en instrumentación y,

especialmente el desarrollo de softwares quimiométricos, han contribuido a la tremenda expansión y al actual estado de popularidad de esta técnica.

El tratamiento estadístico usado extensamente para solucionar problemas ha sido el mayor factor en el crecimiento del interés en la espectroscopía de infrarrojo cercano.

5.2 Principios de medida

La espectroscopía molecular se basa en la interacción entre la radiación electromagnética y las moléculas. Dependiendo de la región del espectro en la que se trabaje y por tanto de la energía de la radiación utilizada (caracterizada por su longitud de onda), esta interacción será de diferente naturaleza: excitación de electrones, vibraciones moleculares y rotaciones moleculares. (Herschel. 1800) De esta forma, la región del infrarrojo (que comprende el intervalo espectral entre 780 y 10^6 nm), puede dividirse en tres zonas: infrarrojo cercano (NIR), infrarrojo medio (MIR) e infrarrojo lejano (FIR). El infrarrojo lejano ($40000-10^6$ nm) se debe a las rotaciones moleculares, mientras que el medio (2500-40000 nm) proviene de las vibraciones moleculares fundamentales. El origen del infrarrojo cercano (780-2500 nm) se debe a los sobretonos y combinaciones de las bandas fundamentales del infrarrojo medio (Workman Jr., J.J. 1999, Goddu y Delker. 1960)

La radiación infrarroja no es suficientemente energética como para producir las transiciones electrónicas que se dan cuando se trata de las radiaciones ultravioleta y visible. La absorción de radiación infrarroja se limita a especies moleculares con pequeñas diferencias entre los distintos estados vibracionales.

Una molécula absorbe radiación infrarroja cuando experimenta un cambio neto en el momento dipolar como consecuencia de su movimiento de vibración o de rotación. Si esto ocurre, el campo eléctrico asociado a la radiación puede interactuar con el campo eléctrico originado por la fluctuación del momento dipolar de la molécula. Si la frecuencia de la radiación iguala exactamente a la frecuencia de vibración natural de la molécula, ocurre una transferencia neta de energía que da lugar a un cambio en la amplitud de la vibración molecular y como consecuencia se absorbe la radiación (Skoog, *et al.* 2001)

Cuando se trata de especies diatómicas (H_2 , O_2 , N_2 , etc.) el momento dipolar no se altera durante la vibración o rotación y, en consecuencia, este tipo de compuestos no absorben en el infrarrojo.

Los átomos en una molécula nunca se encuentran inmóviles. Su movimiento puede aproximarse al de un oscilador armónico: un átomo se desplaza de su posición de equilibrio con una fuerza proporcional al desplazamiento (ley de Hooke), variando continuamente su energía potencial, que se acerca a cero cuando está próxima al equilibrio y se hace máxima cuando la distancia entre los átomos es mínima o máxima.

Este modelo del oscilador armónico resulta incompleto para describir moléculas reales, ya que cuando dos átomos se aproximan la repulsión coulombica entre sus núcleos provoca un aumento más rápido de la energía potencial del que predice el modelo armónico y cuando la distancia interatómica se acerca a la distancia de rotura del enlace, el nivel de energía potencial se estabiliza. Las moléculas reales se acercan más al comportamiento de un oscilador anarmónico. Sólo cuando la energía potencial es baja (entorno a la posición de equilibrio) las moléculas tienen un comportamiento armónico.

En el modelo anarmónico los niveles energéticos no están igualmente espaciados: a niveles de energía más altos, la energía entre niveles consecutivos es menor. Las transiciones energéticas permitidas no se observan solamente para la banda fundamental sino que también se observan transiciones cuyas bandas se denominan sobretonos y aparecen a mayores longitudes de onda, en la región NIR. Además, la anarmonicidad hace que los niveles energéticos no estén espaciados de igual forma; es decir, a niveles de energía más altos el incremento de energía entre niveles consecutivos es menor, por lo que los sobretonos aparecen a frecuencias ligeramente inferiores que las predichas como múltiplos de las frecuencias fundamentales. Además de estos sobretonos, en la región NIR también pueden observarse otro tipo de bandas de absorción, llamadas bandas de combinación, debidas al cambio simultáneo en la energía de dos o más modos vibracionales.

Las bandas NIR son de intensidad menor que las que aparecen en la zona IR, además de ser anchas y no tan bien definidas debido al solapamiento de sobretonos y bandas de combinación (Ciurczak. 2001) Las bandas más frecuentes en NIR son debidas a enlaces que contienen átomos ligeros como C-H, N-H, O-H, S-H, debido a su mayor anarmonicidad. Las bandas de los grupos C=O, C-C, C-F o C-Cl, en general son más débiles o no aparecen en la región NIR. Las vibraciones fundamentales de estos grupos tienen bajas frecuencias en la región IR y por tanto los primeros sobretonos también aparecen en esa región (Simpson. 2005)

Una característica de la zona del infrarrojo cercano es que las interacciones entre moléculas, como puentes de hidrógeno, etc., afectan al espectro NIR, por lo que un espectro NIR también incorpora información sobre las interacciones moleculares de las sustancias.

5.3 Partes del equipo

En términos de instrumentación, la espectroscopía de infrarrojo lejano no es muy distinta de la espectroscopía visible o infrarroja. Los componentes básicos de este instrumento son:

5.3.1 Fuente de radiación

La fuente de radiación más utilizada es la lámpara halógena de filamento de tungsteno con ventana de cuarzo. Más económicas resultan las lámparas de tungsteno ordinarias sin gas halógeno, que también pueden utilizarse como fuentes de luz del infrarrojo cercano siempre que el material de la lámpara sea transparente en la región del infrarrojo cercano. Sin embargo, las lámparas halógenas tienen una vida más larga, temperatura más alta y mayor estabilidad. Estas lámparas emiten en una amplia región del espectro, entre 320-2500 nm.

Otras fuentes de radiación que pueden utilizarse son los diodos de emisión de luz (LEDs). Estos diodos, dependiendo de su composición, cubren regiones distintas del espectro: los hechos de arseniato de galio (GaAs) tiene un pico a la longitud de onda de 940 nm, los GaAlAs (el aluminio se añade al galio en una proporción adecuada) cubre una región de longitud de onda de 650 a 900 nm, mientras un LED hecho de InGaAs permite llegar a longitudes de onda más largas (1600 nm)

5.3.2 Sistema de detección de longitudes de onda

Excepto aquellos instrumentos cuya fuente de radiación esté constituida por LEDs, el resto necesita un sistema que descomponga el haz de luz policromada en longitudes de onda discretas. Este dispositivo debe proporcionar una anchura de banda estrecha con respecto a la banda de absorción que se mida y además dar una intensidad elevada en todo el rango de longitudes de onda. Básicamente, estos dispositivos se clasifican en dos tipos: dispersivos y no dispersivos.

Los monocromadores son sistemas dispersivos constituidos por dos colimadores, uno de ellos para hacer paralela la radiación cuando esta penetra por una rendija de entrada y el segundo para enfocar la radiación sobre la rendija de salida, junto con un elemento dispersante, que permite la descomposición del haz incidente debido a interacciones constructivas y destructivas. Lo que caracteriza a cada monocromador es el elemento dispersante, siendo muy utilizado en la actualidad la red de difracción.

Más utilizados son los sistemas no dispersivos. Entre ellos se encuentran los filtros convencionales, los filtros optoacústicos y los filtros de interferencia óptica. Los filtros convencionales emplean un elemento semitransparente entre la fuente de radiación y la muestra permitiendo el paso de ciertas longitudes de onda. Dentro de este tipo de filtros se encuentran los filtros de absorción, en los que las longitudes de onda transmitidas dependen del material con el que están fabricados y los filtros de interferencia óptica, en los que las longitudes de onda dependen tanto del índice de refracción del material como de su grosor. Los filtros optoacústicos se basan en la interacción de la luz con las ondas sonoras. Consta de unos transductores piezoeléctricos que transforman la señal de radiofrecuencia en una señal acústica y un cristal birrefringente (normalmente de TeO_2).

Cuando un haz de luz policromada incide en el cristal y se aplica la señal acústica, se generan dos haces adicionales de luz monocromática polarizada, ambos con igual longitud de onda, y sólo uno de ellos es utilizado con fin analítico. Debido a su elevado coste económico no están muy extendidos. Por último, los instrumentos de interferencia óptica filtran las longitudes de onda en función de su índice de refracción y grosor, siendo los más utilizados los de transformación de Fourier.

5.3.3. Detector

Los principales detectores utilizados en la espectroscopía de infrarrojo cercano están contruidos por elementos semiconductores (PbS, PbSe, HgCdTe...) en los que debido al efecto de fotoconducción la resistencia disminuye cuando penetran los rayos infrarrojos. Uno de los más utilizados es el de PbS, que es capaz de detectar fotones en un amplio rango del espectro infrarrojo (900-2600 nm) con una alta sensibilidad. Entre los detectores de tipo fotovoltaico (Ge, InAs, InSb, InGaAs) destaca el detector de arseniuro de Indio y Galio (InGaAs) para medidas de transmisión en sólidos.

5.3.4 Compartimento para la muestra

Los instrumentos NIR permiten registrar el espectro de muestras sólidas así como el de muestras líquidas o gaseosas. Dependiendo de la naturaleza de las muestras, éstas deberán ser presentadas de distinta forma. Para las muestras sólidas y semisólidas, se llevan a cabo medidas de reflectancia difusa, en las que el haz de luz es reflejado por la muestra y

llega al detector. Por el contrario, las muestras líquidas suelen medirse en modo transmitancia, llegando la luz al detector tras haber atravesado la muestra. Un caso intermedio sería la medida por transflectancia, en la que parte de la luz incidente es reflejada por la muestra mientras que otra parte la atraviesa, siendo reflejada por un material colocado en la cara opuesta de la muestra y recogida por el detector.

Debido a la diversidad de estados en que puede presentarse la muestra, se han diseñado accesorios que pueden ser acoplados a los espectrómetros para facilitar el registro de espectros. Para el análisis de productos sólidos por reflectancia existen sondas de fibra óptica, dispositivos de cubeta, etc. Para el análisis de muestras líquidas, sobre todo en el caso de las medidas de transflectancia, se desarrollan cada vez más diseños como las cubetas de cuarzo con una cara reflectante para que refleje la luz que ha atravesado la muestra a través de la otra cara de la cubeta que es transparente o las sondas de fibra óptica con una placa reflectante a cierta distancia de la salida de la sonda, de forma que ésta actúa como elemento transmisor tanto del haz de luz incidente como del reflejado.

5.4 Ventajas e inconvenientes

Entre las ventajas que presenta el uso de tecnología NIR se encuentra la escasa o nula preparación de la muestra requerida, además de la rapidez (entre 15 y 90 segundos) y simplicidad del análisis. Por otro lado, se trata de una técnica limpia ya que para su uso no es necesario el empleo de reactivos químicos. El hecho de que el sistema de detección conste de materiales sólidos y no presente zonas móviles, así como la compactación y miniaturización a la que están tendiendo estos instrumentos, hace que esta técnica pueda ser aplicada directamente en campo. Por último, las ventajas

más destacables de esta técnica son el hecho de tratarse de una técnica no destructiva y la posibilidad de determinar gran cantidad de compuestos de forma simultánea, sin necesidad de tener que seguir un procedimiento analítico distinto para cada uno de ellos.

Pero la tecnología NIR también presenta una serie de inconvenientes. A pesar del ahorro que supone no tener que gastar reactivos químicos para su uso, la adquisición de la instrumentación es relativamente cara. Por otro lado, la complejidad de la señal NIR obliga a utilizar técnicas quimiométricas para procesarla, complicando así su manejo. Además, se trata de una técnica poco sensible, por lo que el análisis de compuestos minoritarios se ve muy limitado. Aunque sin duda, el mayor inconveniente es la necesidad de realizar calibrados con un número de muestras relativamente elevado, que deben ser relacionadas con una serie de técnicas de referencia.

6. SISTEMAS MULTIORGANOLÉPTICOS

6.1 Definición

En 1920 comenzaron a aparecer las primeras teorías relacionadas con el olfato artificial. Éstas se basaban en la posibilidad de detectar olores midiendo la carga eléctrica de una difusión de agua con la sustancia olorosa en cuestión, pero no se llegó a fabricar ningún dispositivo basado en esa idea. El primer "olfato electrónico" experimental se desarrolló en los años 50 y consistía en un sensor electroquímico basado en un electrodo mecánico en contacto con la superficie de una barra porosa saturada con un electrolito

diluido. En esa misma época otros investigadores desarrollaron dispositivos similares basados en el uso de termistores recubiertos con distintos materiales. A mediados de los años 60 se propusieron detectores cuyo funcionamiento estaba basado en los cambios de conductividad o del potencial de contacto. Sin embargo, fue en 1982 al presentar G. Dodd y K. Persaud (Dood y Persaud. 1982) sus publicaciones científicas en Nature, cuando se anunció el comienzo de una nueva tecnología: la olfatometría electrónica. Estos autores publicaron el diseño de una nariz electrónica basada en un conjunto de sensores reversibles pero semi-selectivos con distintas propiedades químicas. La selectividad la consiguieron aplicando técnicas de reconocimiento de patrón a las respuestas obtenidas por dichos sensores.

Gardner y Bartlett (1993) (Gardner y Bartlett. 1993) definieron la nariz electrónica como un instrumento que consiste en un conjunto de sensores electroquímicos con especificidad parcial y un sistema de reconocimiento de patrón adecuado, capaz de reconocer olores simples o complejos. Si se compara con el sistema olfativo humano, vemos que éste también consta de un sistema de detección de olores (receptores olfativos humanos) y un sistema de procesado de datos (el cerebro). De hecho, en ambos casos, el funcionamiento se basa en relacionar el aroma percibido con una respuesta que, una vez almacenada en la memoria, actuará de modelo en posteriores análisis. En el caso de la nariz electrónica, esa memoria consiste en bases de datos creadas a partir de muestras anteriormente analizadas por el instrumento e información externa que permita describir la calidad o identificar la muestra. De esta forma se "entrena" el sistema de reconocimiento para obtener buenas clasificaciones que permitan identificar el olor. Otra similitud con los sistemas biológicos es que el aroma percibido se procesa de forma global, sin identificar cada uno de los compuestos que lo

constituyen, de forma que la clasificación se hace en base a la similitud aromática percibida al reconocer el modelo de componentes.

Basadas en el mismo principio que las anteriores, las "lenguas electrónicas" han sido utilizadas para tratar de reproducir de forma artificial la sensación del sabor. Estos equipos también constan de un conjunto de sensores químicos no específicos y de baja selectividad que presentan una especificidad parcial a ciertos compuestos presentes en la muestra en estudio. Otro aspecto que comparte con la nariz electrónica es la de obtener una huella digital (en este caso del sabor) sin conocer cada uno de los componentes que lo constituyen. La diferencia más destacada que presentan estas técnicas es el tipo de sustancias detectadas y el medio en el que se presentan dichas sustancias. En el caso de la nariz electrónica es necesario obtener una fase vapor (espacio de cabeza) a la que deben incorporarse los compuestos volátiles a determinar generados por calentamiento mientras que la lengua electrónica analiza la presencia de todas las especies químicas presentes directamente en un medio normalmente líquido.

6.2 Partes de los equipos

Los sistemas multiorganolépticos constan de tres partes bien diferenciadas. En primer lugar es necesario un dispositivo de toma de muestra desde el que se haga llegar al conjunto de sensores las sustancias a determinar. Los sensores actúan como receptores, dando como respuesta un cambio en sus propiedades físico-químicas al entrar en contacto con dichas sustancias. Por último, las técnicas quimiométricas son las encargadas de transformar en información analítica las respuestas de los sensores, proporcionando una huella digital del aroma o el sabor medido.

6.2.1 Toma de muestra

El primer paso en toda nariz electrónica consiste en acondicionar la muestra por medio de métodos de extracción de volátiles que permitan el paso de la fracción volátil a analizar al conjunto de sensores. El sistema de muestreo está formado por una zona destinada a contener la muestra, un sistema de control y un sistema de transporte del flujo generado a las cámaras que contienen los sensores. Los principales sistemas de muestreo utilizados son los sistemas de muestreo por espacio de cabeza, ya sean dinámicos o estáticos. En el caso de la lengua electrónica este dispositivo de toma de muestra es mucho más sencillo, ya que como se ha comentado anteriormente las sustancias responsables del sabor son detectadas directamente en la muestra.

6.2.2 Sensores

6.2.2.1 Nariz electrónica

La diferencia fundamental entre los sistemas de olfato electrónico reside en la tipología de los sensores utilizados. El objetivo es encontrar conjuntos de sensores con perfiles de selectividad amplios que sean distintos pero a la vez se solapen para el rango de compuestos volátiles de interés. Este conjunto de sensores debe generar un modelo de reconocimiento de respuesta capaz de diferenciar distintas muestras. Además, un sensor individual debe ser capaz de responder a un amplio rango de compuestos pero no ser demasiado específico en su respuesta. Las respuestas del conjunto de sensores a un compuesto específico deben ser tan

independientes como sea posible (en un sentido estadístico) para juntar la máxima información posible sobre dicho compuesto.

Dependiendo del tipo de medidas en las que basen su respuesta estos sensores, se pueden clasificar en:

- *Sensores de conductividad*

Sensores semiconductores de óxidos metálicos (MOS): Estos sensores están basados en cambios en la conductancia inducidos por la absorción o reacción de los gases en su superficie. Estos sensores están formados por el depósito de una fina capa porosa de un material de óxidos metálicos dentro de una pieza cerámica calentada eléctricamente y fortalecida a alta temperatura. Estos dispositivos están hechos de SnO_2 , ZnO , In_2O_3 , WO_3 , Fe_2O_3 , Ga_2O_3 y TiO_2 , normalmente barnizados con una pequeña cantidad de un metal catalítico como platino o paladio. La absorción de oxígeno en la superficie se lleva a cabo capturando un electrón del material, por lo que dicho electrón deja de estar disponible para la conducción, de forma que ésta pasa a ser menor y la resistencia aumenta. Una vez que el sensor está estable bajo la atmósfera oxigenada, es capaz de alcanzar una condición de equilibrio con el oxígeno absorbido en la superficie del material, obteniéndose así un valor característico de la resistencia que es lo que se conoce como línea base.

Estos sensores son capaces de trabajar a altas temperaturas (200-400°C) y su sensibilidad es bastante alta (5-500 ppm), sin embargo presentan importantes problemas de deriva y contaminación.

- *Polímeros conductores*

Estos sensores de gas están basados en los cambios de resistencia en una fina película polimérica. Polímeros basados en muy distintos tipos de

monómeros se han utilizado en este tipo de sensores: pirroles, anilinas, indoles, furanos. Al igual que los anteriores, la propiedad medida es el cambio de conductividad de estos polímeros cuando las moléculas volátiles interactúan con ellos. Variaciones en la estructura o en los grupos funcionales incorporados en los polímeros y el uso de distintos iones de recubrimiento conducen a cambios en la selectividad y sensibilidad. Este amplio rango de composiciones disponibles hace que sean muy versátiles y que puedan responder a un amplio rango de vapores orgánicos. Otras características de estos sensores son:

- Pueden trabajar a temperatura ambiente, simplificando su construcción y reduciendo su consumo.
- Su tiempo de respuesta es del orden de 10 segundos
- Sus respuestas son normalmente reversibles a temperatura ambiente
- Son de pequeño tamaño
- Son sensibles a la humedad y a la luz, presentan deriva con el tiempo, son susceptibles a la contaminación y presentan falta de reproducibilidad en la respuesta.

A pesar de estas limitaciones, el hecho de su bajo coste, su versatilidad y su precisión hace que en la actualidad sean los más extendidos comercialmente.

- *Sensores piezoeléctricos:*

Sensores de cristal de cuarzo QCM: Los sensores QCM pertenecen a los sensores de tipo piezoeléctrico y miden la masa de absorción de las moléculas. El elemento activo es un cristal piezoeléctrico con una frecuencia de resonancia fundamental que está recubierto con una fina película de material absorbente químicamente selectiva que forma una membrana sensitiva. Cuando las moléculas se absorben en dicha membrana, aumenta la masa del sistema y, por tanto, la frecuencia de resonancia disminuye, lo que

es fácilmente medible. Entre las características de estos sensores destacan: alta sensibilidad, linealidad de respuesta como una función de la concentración del analito, alta reproducibilidad, alta estabilidad a lo largo del tiempo, pequeño tamaño, trabajo a temperatura ambiente y bajo consumo.

Dispositivo de onda acústica superficial (SAW): Se trata de otro tipo de sensor piezoeléctrico. Están fabricados formando electrodos interdirigidos en un sustrato piezoeléctrico como el cuarzo. Una fina película cubierta de un material absorbente selectivo se deposita en la superficie. Cuando se aplica un voltaje de radiofrecuencia se produce una onda de superficie acústica (onda Rayleigh). La absorción de moléculas en la superficie aumenta su masa perturbando la onda y cambiando su frecuencia, midiéndose dicho cambio. El control de temperatura en estos sensores es imprescindible para reducir la deriva. Al igual que en los sensores QCM, su respuesta puede alterarse utilizando distintas especies en la membrana. Sin embargo, estos dos tipos de sensores presentan ciertas diferencias:

- Los sensores SAW trabajan a frecuencias más elevadas (cientos de MHz) y tienen áreas muy pequeñas, por lo que tienen mayor sensibilidad y responden más rápido que los sensores QCM.
 - Estos sensores pueden medir cambios de masa del mismo orden de magnitud que los QCM, aunque el cambio de frecuencias es mayor, por lo que la relación superficie-volumen también lo es. Esto hace que sean menos sensibles que los sensores QCM en algunos casos.
- *Sensores basados en efecto de campo:*

Los sensores semiconductores de óxidos metálicos basados en efecto de campo (MOSFET) consisten en un semiconductor y un aislante (un óxido) cubierto con un metal catalítico. La señal obtenida con estos sensores

deriva del cambio de potencial en el sensor debido a la polarización eléctrica cuando las moléculas reaccionan en la superficie catalítica. La sensibilidad y selectividad de los dispositivos se pueden optimizar variando el tipo y grosos del metal catalizador y haciéndolos trabajar a distinta temperatura. Estos sensores trabajan a temperaturas comprendidas entre 100 y 200°C. Los sensores MOSFET presentan problemas de deriva similares a los sensores de tipo MOS.

- *Sensores ópticos:*

Los sensores ópticos se basan en el uso de fibras ópticas que modifican sus propiedades de absorbancia, reflectancia, fluorescencia o quimioluminiscencia en presencia de sustancias químicamente activas. Una de las ventajas de este tipo de sensores es que no son sensibles a interferencias electrónicas. Además, existen gran cantidad de tintes y pigmentos que se utilizan en investigación biológica que hacen que estos sensores sean baratos y fáciles de fabricar, aunque la complejidad del dispositivo de medida encarece el sistema. Otra desventaja de estos sensores es que tienen un tiempo de vida limitado ya que pierden color con el tiempo.

6.2.2.2 Lengua electrónica

Existen distintos principios de medida con el potencial suficiente para ser utilizados en las lenguas electrónicas, pero los más importantes se basan en técnicas electroquímicas como potenciometría y voltametría. Ambas técnicas requieren la presencia de al menos dos electrodos y una solución electrolítica. Un electrodo responde a la sustancia que se pretende analizar (electrodo de trabajo) mientras que el otro mantiene un potencial constante (electrodo de referencia)

La potenciometría es una técnica basada en corriente cero, en la que se mide el potencial a lo largo de la superficie del electrodo de trabajo, siendo necesario para ello un electrodo selectivo de iones, un electrodo de referencia y un mecanismo capaz de medir el potencial. Se han desarrollado distintos tipos de materiales de membrana, presentando distintas propiedades de reconocimiento. Esta membrana suele ser no porosa, insoluble en agua, mecánicamente estable y con una afinidad alta y selectiva para el ión que debe ser medido. En cuanto al electrodo de referencia, es muy común para este tipo de mecanismos un electrodo de plata-cloruro de plata. Estos mecanismos se utilizan para medir una gran cantidad de especies iónicas. Un ejemplo de este tipo de electrodos es el empleado para medir el pH, así como los que miden calcio, potasio, sodio y cloro.

En las técnicas voltamétricas, el potencial del electrodo se utiliza para conducir una reacción de transferencia de electrones y se mide la corriente resultante. El tamaño del potencial del electrodo determina si las moléculas a analizar ganarán o perderán electrones. Este tipo de técnicas pueden medir además cualquier tipo de especie química que sea electroactiva. Este mecanismo de medida aporta ciertas ventajas como su alta sensibilidad, versatilidad, simplicidad y robustez. Además, este método también permite medir conductividad y la cantidad de compuestos polares en la disolución.

Además de estos dos principios básicos, existen otras técnicas que resultan interesantes para ser usadas en las lenguas electrónicas, como son las técnicas ópticas y las basadas en los cambios de masa.

Las técnicas ópticas se basan en la absorción de luz a unas longitudes de onda específicas, desde el ultravioleta via la región visible hasta el infrarrojo cercano y el infrarrojo. Muchos compuestos tienen distintos espectros de absorción y escaneando a ciertas longitudes de onda,

se obtendrá un espectro específico para la muestra analizada. Estas técnicas presentan alta reproducibilidad y una buena estabilidad a largo plazo.

Las técnicas basadas en cristales piezoeléctricos también son útiles. Un cristal de cuarzo resuena a determinada frecuencia y por la absorción de ciertos compuestos en la superficie del cristal aumenta su masa y su frecuencia se verá alterada. En el caso de los sensores de onda de superficie acústica (SAW) una onda se propaga en la superficie del mecanismo y debido a la absorción de un compuesto en este camino las propiedades superficiales cambiarán. Estos mecanismos son muy generales y ofrecen la posibilidad de detectar un gran número de compuestos diferentes.

6.2.3 Técnicas quimiométricas

La interpretación de los datos con variables múltiples como varios sensores y múltiples muestras requiere el uso de métodos de interpretación estadística. Las técnicas quimiométricas proporcionan un camino para presentar los datos de una forma comprensible diseñada para una necesidad específica: clasificación, cuantificación, etc.

Estas técnicas podrían clasificarse en dos grupos, dependiendo del fin perseguido con su uso:

6.2.3.1 Técnicas para el pre-procesado de señal

El pre-procesado de señal se utiliza para tratar de compensar desviaciones de los sensores, comprimir los datos dados por el conjunto de sensores y reducir posibles variaciones entre la medida de una muestra y la siguiente. Las técnicas típicas en estos casos incluyen:

- Manipulación de la línea base, que es una transformación basada en el valor inicial de los sensores.
- Normalización de las respuestas obtenidas: el escalado es capaz de reajustar los valores de las respuestas de los sensores a un punto de partida común, para evitar que algunas variables tengan más peso que otras en el resultado obtenido. Por ejemplo, el vector de autoescalado normaliza las dimensiones de cada muestra a media cero y desviación típica 1. Los métodos de normalización son capaces de evitar variaciones experimentales y reducir los errores computacionales cuando se aplican técnicas de reconocimiento de patrón (Gardner y Bartlett. 1993)
- Selección de las zonas de la respuesta del sensor que proporcionan información discriminadora sin eliminar la información esencial. Si se trabajara con todos los datos obtenidos de la respuesta de un sensor se obtendrían matrices de datos de grandes dimensiones, siendo necesario reducirlas para alcanzar dimensiones razonables. Muchos autores han utilizado diversos algoritmos para este fin (Hermle, *et al.* 1999) aunque un equipo comercial normalmente utiliza un único dato por sensor (respuesta al alcanzar la estabilidad, respuesta máxima, etc.)

6.2.3.2 Técnicas de reconocimiento de patrón

Los objetivos buscados con la utilización de estas técnicas son básicamente dos: el primero de ellos está relacionado con la reducción de los datos y el análisis de su estructura (reconocimiento de patrón no supervisado) mientras que el segundo se encarga de modelizar los datos (reconocimiento de patrón supervisado) por medio de regresiones o de modelos de clasificación.

Técnicas de reconocimiento de patrón no supervisadas

Normalmente la matriz de datos obtenida con estas técnicas de análisis es de grandes dimensiones. Para que estos datos se puedan interpretar de una forma más sencilla y reducir la presencia de ruido en ellos es necesario obtener una matriz de dimensiones más reducida, de forma que contenga la información útil para el fin buscado. Este tipo de técnicas no utilizan información relacionada con respuestas experimentales predefinidas. El método más utilizado para la reducción de datos es probablemente el Análisis de Componentes Principales (PCA) (Jackson. 1991, Joliffe. 1986). PCA proyecta los datos en un hiperespacio reducido, definido por los componentes principales. Los componentes principales (PCs) son combinaciones lineales de las variables originales, siendo el primer PC el que mayor varianza presenta, seguido del segundo PC y así sucesivamente.

Regresión multivariante y modelos de clasificación

Los métodos de regresión y clasificación tienen como objetivo encontrar modelos matemáticos capaces de describir una respuesta (variables dependientes) por medio de las variables independientes. Los métodos de regresión modelizan respuestas cuantitativas con respecto a un grupo de variables explicativas, mientras que los métodos de clasificación se encargan de modelizar respuestas cualitativas indicando a que clase pertenecen las muestras analizadas. La obtención de estos modelos permite predecir a que clase pertenece una muestra desconocida posteriormente analizada.

Dentro de los métodos de regresión multivariantes, los que se utilizan con más frecuencia son la regresión de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS) (Martens y Naes. 1989, Geladi y Kowalski. 1986, Lorber, *et al.* 1987, Höskuldsson. 1996) y la Regresión por Componentes Principales (PCR). En PCR se establece una regresión entre propiedades de las variables

medidas y los scores de los componentes principales de dichas variables. En la técnica PLS se buscan variables latentes que presentan la máxima covarianza con las respuestas, relacionándolas con una variable dependiente (PLS1) o con varias (PLS2)

Como técnicas de clasificación, cabe destacar por ser una de las más conocidas, el Análisis Discriminante (DA). Se trata de una técnica de clasificación paramétrica que maximiza la varianza entre categorías y la minimiza dentro de una categoría (McLachlan. 1992). Basándose en esto, el Análisis Lineal Discriminante (LDA) y el Análisis Cuadrático Discriminante (QDA) son utilizados dependiendo de la linealidad o no linealidad de la separación entre clases (Scampicchio, *et al.* 2005, Buratti, *et al.* 2004, Ivarsson, *et al.* 2001). Si el tamaño de las clases es pequeño en comparación con el número de variables, ambos métodos son difíciles de aplicar. Además, si las variables están muy correlacionadas entre si, el Análisis Discriminante puede sufrir sobreajuste.

La combinación del algoritmo de regresión PLS2 con el Análisis Discriminante da lugar a un nuevo método de clasificación (PLS-DA) (Wise, *et al.* 2006) en el que se realiza una reducción de dimensiones igual que en el PLS pero las predicciones obtenidas se utilizan para clasificar muestras desconocidas.

Redes Neuronales Artificiales (ANN)

Las redes neuronales artificiales (Zupan, 1994) imitan el funcionamiento de una red de neuronas biológicas, donde cada neurona acepta distintas señales que provienen de las neuronas cercanas y las procesa. En general, son técnicas no paramétricas que requieren de una fase de entrenamiento para optimizar la estructura del modelo. Esta técnica es capaz de solucionar los problemas presentes en métodos supervisados y no

supervisados, realizando tanto agrupaciones como modelizaciones de respuestas tanto cualitativas como cuantitativas. Sin embargo, una de sus mayores desventajas está relacionada con la optimización de la red, ya que este procedimiento sufre cierta arbitrariedad y en algunos casos puede consumir mucho tiempo.

Selección de variables

La selección de variables se utiliza para seleccionar de toda la información existente solamente la que es interesante para el objetivo buscado. Esto se lleva a cabo por medio de técnicas multivariantes capaces de preservar sólo las variables que aporten información relevante para el fin perseguido. Entre las técnicas de selección de variables más utilizadas en la actualidad destacan los algoritmos genéticos (GA) y el intervalo PLS (IPLS).

Los algoritmos genéticos están basados en los principios de selección y evolución natural (Holland. 1992, Lucasius y Kateman. 1994, Lucasius y Kateman. 1993), donde variaciones al azar en el mapa genético de una población combinado con la supervivencia de los individuos de mejor adaptación llevan a una mejora progresiva de la especie. En estos algoritmos, la selección de un subgrupo de variables de un conjunto inicial más amplio se basa en el valor del error mínimo cuadrático de validación cruzada (RMSECV) obtenido en un modelo de regresión.

Para ello, el primer paso consiste en generar al azar un gran número de subgrupos de variables y calcular para cada uno de ellos el RMSECV del modelo desarrollado. Cada subgrupo de variables se representa como una serie de ceros y unos, indicando estos números la presencia (1) o ausencia (0) de la variable en el modelo. En términos genéticos, estos unos y ceros reciben el nombre de gen mientras que un subgrupo de variables representa un individuo. La población está formada por todos los individuos probados.

A continuación, tiene lugar la selección de individuos. Esta se basa en los valores de RMSECV, que indican como de bueno es el modelo obtenido con cada individuo probado. Los modelos de menor RMSECV indican un mejor ajuste del individuo en la población por lo que esos individuos son conservados para continuar con el análisis. Sin embargo, aquellos cuyo modelo presenta un ajuste mayor que el ajuste medio son descartados, quedando reducida la población inicial a la mitad. Para conseguir que la población tenga el número de individuos original, se generan individuos nuevos a partir de los retenidos por medio de sobre-cruzamiento y mutación. El sobre-cruzamiento consiste en una combinación de dos individuos, en la que los genes de ambos se dividen al azar, intercambiándose entre si las zonas cortadas. Si la generación de nuevos individuos se diera sólo por sobre-cruzamiento, los nuevos individuos nunca tendrían variables que no estuvieran presentes en por lo menos uno de los individuos de la población inicial. Por ello es necesario introducir mutaciones al azar que provocan cambios en los genes, pasando de 0 a 1 o viceversa. Una vez la población ha vuelto a su tamaño original se comienza de nuevo el proceso con el cálculo de RMSECV de los modelos de cada subgrupo. El proceso continuará hasta que se hayan realizado un número finito de iteraciones o cuando un determinado porcentaje de individuos de la población utilice subgrupos de variables idénticas.

En cuanto al segundo de los métodos probados, el intervalo PLS (Wise, *et al.* 2006), hace una búsqueda secuencial y exhaustiva entre todas las variables de un set de datos, seleccionando aquellas variables que mejor modelo de predicción obtienen. Este método permite trabajar en modo “forward” o en modo “reverse”. En el primer caso, comienza creando modelos PLS usando solo uno de los intervalos de variables definidos. Se calcula el valor de RMSECV de cada modelo y se selecciona el intervalo de

variables cuyo modelo ha obtenido el menor RMSECV. Este intervalo se irá combinando con cada uno de los intervalos restantes y se obtendrán nuevos modelos PLS, de los que se seleccionará aquel que tenga un menor RMSECV. De esta forma va incrementándose el número de intervalos seleccionados, que finalizará cuando el valor de RMSECV del último modelo seleccionado supere al obtenido en el modelo anterior. El modo “reverse” funciona de modo contrario. Inicialmente, se parte del conjunto completo de intervalos. El algoritmo selecciona un intervalo y lo elimina, obteniendo sin él un nuevo modelo PLS. Uno por uno son quitados todos los intervalos y el valor RMSECV de sus modelos se compara, eliminando de forma permanente el intervalo que ha sido quitado del modelo que mejor valor de RMSECV ha obtenido, ya que lo considera el peor intervalo. Al igual que en el caso anterior, este ciclo se repite hasta que el último modelo obtenido da peor resultado que el anterior.

6.3 Ventajas e inconvenientes

La respuesta dada por estas técnicas de sensores electrónicos es una huella digital del aroma (en el caso de la nariz electrónica) o del sabor (si se trata de la lengua electrónica) de un producto, de forma que su respuesta se parezca más a la dada por un panel sensorial que la obtenida por las técnicas analíticas que determinan cada uno de sus constituyentes por separado. Aunque estas últimas son más precisas en sus resultados, los sensores electrónicos presentan una serie de ventajas, como la rapidez en el análisis, la escasa o nula preparación de la muestra y la facilidad en el manejo del equipo. Además, si se compara con un panel sensorial, sus resultados son objetivos y no se da el efecto de saturación tras un tiempo de análisis como ocurre en el caso de los catadores, pudiéndose realizar el análisis a lo largo

de todo un día de trabajo y permitiendo analizar olores y sabores que resultarían desagradables para el catador. En cuanto a la sensibilidad del equipo, los umbrales de detección son tan buenos o incluso mejores que los del ser humano.

Sin embargo, estas técnicas también presentan una serie de inconvenientes, siendo uno de los más importantes la presencia de deriva en los sensores. La deriva es un cambio temporal en la respuesta del sensor a pesar de que éste trabaje en condiciones físicas y químicas constantes debido a procesos dinámicos desconocidos en el sistema de sensores.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abney, W.; Festing, E. R.** 1881 On the influence of the atomic grouping in the molecules of organic bodies on their absorption in the infra-red region of the spectrum. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 172, 887-910.
- Abushita, A. A.; Hebshi, E. A.; Dado, H. G.; Biacs, P. A.** 1997 Determination of antioxidant vitamins in tomatoes. *Food Chemistry*, 20, 207-212.
- Adalid, A.; Roselló, S.; Cebolla-Cornejo, J.; Nuez, F.** 2008 Evaluation and selection of *Lycopersicon* accessions for their high carotenoid and vitamin C content. *Acta Horticulturae*, 789, 221-227.
- Angosto, T.; Borja, A.** 2000; *Mejora biotecnológica de la calidad de fruto*. En Lozano, R., Cuadrado, I., Eds.; Almería., p 125.
- Baldwin, E. A.; Niesperos, M. O.; Mozonas, M. G.** 1991 Quantitative analysis of flavor and other volatiles and for other constituents of two tomato varieties during ripening. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 116, 265-269.

- Beltran, J.; Serrano, E.; López, F. J.; Valcárcel, M.; Roselló, S.** 2006 Comparison of two quantitative GC-MS methods for analysis of tomato aroma based on purge-and-trap and on solid-phase microextraction. *Anal Bioanal Chem.* , 385, 1255-1264.
- Ben-Gera, I.; Norris, K. H.** 1968a Determination of moisture content of soybeans by direct spectrophotometry. *Israel Journal of Agricultural Research* , 18, 125-132.
- Berg, K. A.; Canessa, C. E.** 1998; *HPLC applications in food and nutritional analysis*. En Katz, E., Eksteen, R., Schoenmakers, P. and Miller, N., Eds.; Chromatographic Science Series 78: Marcel Dekker, NY., .
- Brauss, M. S.; Linforth, R. S. T.; 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*). *J. Agr. Food Chem.* , 46, 2287-2292.
- Bucheli, P.; Lopez, J.; Voirol, E.; Petiard, V.; Fulton, T. M.; Tanksley, S. D.; Hartz, T. K.** 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. *Proceedings of the Seventh International Symposium on The Processing Tomato No.542, Sacramento, CA.* , 379-385.
- Bucheli, P.; Voirol, E.; Torre, R. R.; Lopez, J.; Rytz, A.; Tanksley, S. D.; Petiard, V.; de la Torre, R.** 1999b Definition of nonvolatile markers for flavor of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as tools in selection and breeding. *J. Agr. Food Chem.* , 47, 659-664.
- Buratti, S.; Benedetti, S.; Scampicchino, M.; Pangerod, E. C.** 2004 Characterization and classification of italian barbera wines by using an electronic nose and an amperometric electronic tongue. *Anal. Chem. Acta* , 525, 133.
- Buttery, R. G.; Ling, L. C.** 1993 Volatile components of tomato fruit and plants. *Bioactive volatile compounds from plants* , 525, 24-34.

- Cebolla-Cornejo, J.** 2005 Recuperación de variedades tradicionales de tomate y pimiento. Caracterización y mejora genética. Universidad Politécnica de Valencia .
- Cebolla-Cornejo, J.; Roselló, S.; Beltran, J.; Serrano, E.; Nuez, F.** 2006 Análisis de perfiles aromáticos en variedades tradicionales y comerciales de tomate.. *Actas de Horticultura* , 45, 61-62.
- Chalukova, M.; Manuehyan, H.** 1991; *Breeding for carotenoid pigments in tomato*. En Kalloo, G., Ed.; Springer-Verlag: Berlin, .
- Ciurczak, E. W.** 2001; *Principles of near-infrared Spectroscopy*; En In Burns, D. A., Ciurczak, E. W., Eds.; Marcel Dekker Inc.: New Cork, p 9.
- Davies, A. M. C.; Grant, A.** 1987 Review: Near infra-red analysis of food. *International Journal of Food Science and Technology* , 22, 191-207.
- Davies, J. N.; Hobson, G. E.** 1981 The constituents of tomato fruit. The influence of environment, nutrition and genotype. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* , 81, 205-279.
- Dood, G. H.; Persaud, K. C.** 1982 *Neture*, 299, 352-355.
- Dorais, M.; Dorsal, R.; Demers, D. A.; Micevic, D.; Turcotte, G.; Hao, X.; Papadopoulos, A. P.; Ehret, D. L.; Gosselin, A.; Hao, X. M.; Sonneveld, C.; Berhoyen, M. N. J.** 2001 Improving tomato fruit quality by increasing salinity: effects on ion uptake, growth and yield. . *Acta Hort.* , 511, 185-195.
- Downey, G.; Byrne, S.** 1983 Determination of protein and moisture in ground wheat by near infrared reflectance spectroscopy. *Israel Journal of Food Science and Technology* , 7, 135-146.
- Egashira, H.; Takahashi, S.; Doi, H.; Nishizawa, T.; Escalante, A.; Takashina, T.; Imanishi, S.** 1999 Genetic analysis of sucrose-accumulating ability in *Lycopersicon peruvianum*. *Breeding Sci.* , 49, 155-159.
- Fridman, E.; Liu, Y. S.; Carmel, G. L.; Gur, A.; Shores, M.; Pleban, T.; Eshed, Y.; Zamir, D.** 2002 Two tightly linked QTLs modify

- tomato sugar content via different physiological pathways. . *Mol. Genet. Genomics.* , 266, 821-826.
- 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. *Proc Natl. Acad Sci USA* , 97, 4718-4723.
- Gardner, J. W.; Bartlett, P. N.** 1993 A brief history of electronic noses. *Sens. Actuators B* , 18, 211-220.
- Geladi, P.; Kowalski, B. R.** 1986 Partial least-squares regression: a tutorial. *Analytica Chimica Acta* , 185, 1-17.
- Goddu, R. F.; Delker, D. A.** 1960 Spectra-Structure Correlations for Near-Infrared Region. *Anal. Chem.* , 32, 140-141.
- 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. *Theor. Appl. Genet.* , 90, 925-932.
- Grandillo, S.; Tanksley, S. D.** 1996 QTL analysis of horticultural traits differentiating the cultivated tomato from the closely related species *Lycopersicon pimpinellifolium*. *Theor. App. Genet.* , 92, 935-951.
- Grasselly, D.; Navez, B.; Letard, M.** In *Tomate, pour un produit de qualité*, Ctifl: 2000; .
- Hermle, T.; Weimar, U.; Mitrovics, J.; Rosenmistiél, W.; Göpel, W.** 1999 GasFETS incorporating conducting polymers as gate materials. *Sens Actuators B* , 65, 253-256.
- Herschel, W.** 1800 Investigation of the powers of the prismatic colours to heat and illuminate objects. *Philosophical Transactions of the Royal Society* , 90, 255.
- Holland, J. H.** 1992 Genetic algorithms. *Scientific american* , 267, 66.
- Höskuldsson, A.** In *Prediction Methods in Science and Technology*, Thor Publishing: Denmark, 1996; .

- Ivarsson, P.; Holmin, S.; Hojer, N. E.; Krantz-Rülcker, C.; Winquist, F.** 2001 Discrimination of tea by means of a voltametric electronic tongue and different applied waveforms. *Sens Actuators B* , 76, 449.
- Jackson, J. E.** 1991 A user's guide to principal components.
- Joliffe, I. T.** 1986 Principal component analysis.
- Kaye, W.** 1954 **Near-infrared spectroscopy. I. Spectral identification and analytical applications.** *Spectrochimica Acta* , 6, 257.
- Kaye, W.** 1955 **Near-infrared spectroscopy. II. Instrumentation and technique a review.** *Spectrochimica Acta* , 7, 181-204.
- Lambeth, V. N.; Straten, E. F.; Fields, M. L.** 1996 Fruit quality attributes of 250 foreign and domestic tomato accessions. *Missouri Res. Bull.* , 908.
- Lorber, A.; Wangen, L. E.; Kowalski, B. R.** 1987 A Theoretical Foundation for the PLS Algorithm. *J. Chemometrics* , 1.
- Lower, R. L.; Thompson, A. E.** 1967 Inheritance of acidity and solids content of small-fruited tomatoes. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* , 91, 486-494.
- Lucasius, C. B.; Kateman, G.** 1993 Understanding and using genetic algorithms. Part 1. Concepts, properties and context. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* , 19, 1-33.
- Lucasius, C. B.; Kateman, G.** 1994 Understanding and using genetic algorithms. Part 2. Representation, configuration and hybridization. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* , 25, 99-145.
- Mahakun, N.; Leeper, P. W.; Burns, E. E.** 1979 Acidic constituents of various tomato fruit types. *J.Food.Sci* , 44, 1241-1244.
- Martens, H.; Naes, T.** In *Multivariate Calibration*, John Wiley and Sons: New York, 1989; .

- 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.
- McLachlan, G.** 1992 Discriminal analysis and statistical pattern recognition.
- Mitchell, J. A.; Bockman, C. D.; Jr. Lee, A. V.** 1957 Determination of acetyl content of cellulose acetate by near infrared spectroscopy. *Anal. Chem.* , 29, 499-502.
- Nuez, F.** 1995; *Desarrollo de nuevos cultivares*. En Nuez, F., Ed.; Mundi Prensa: Madrid, .
- Osborne, B. G.; Douglas, S.; Fearn, T.; Willis, K. H.** 1982 The development of universal calibrations for measurement of protein and moisture in UK home-grown wheat by near-infrared reflection analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture* , 33, 736-740.
- Paterson, A. H.; Damon, S.; Hewitt, J. D.; Zamir, D.; Rabinowitch, H. D.; Lincoln, S. E.; Lander, E. S.; Tanksley, S. D.** 1991 Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato: comparison across species, generations, and environments. *Genetics* , 127, 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, 721-726.
- Rodriguez-Bernaldo de Quiros, A.; Gonzalez-Castro, M. J.; Lopez-Hernandez, J.; Simal-Lozano, J.** 1998 Analytical techniques used for the determination of aromatic compounds in vegetables foods. *Alimentaria* , 298, 73-79.
- Roselló, R.; Galiana-Balaguer, L. G.; 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, 1-6.
- Saliba Colombani, V.; Causse, M.; Langlois, D.; Philouze, J. B., M.** 2001 Genetic analysis of organoleptic quality in fresh market tomato. 1.

- Mapping QTLs for physical and chemical traits. *Theor. Appl Genet* , 102, 259-272.
- Scampicchio, M.; Mannino, s.; Zima, j.; Wang, J.** 2005 Chemometrics on microchips: towards the classification of wines. *Electroanalysis* , 17, 1215.
- Simpson, M. B.** 2005; *Near-Infrared Spectroscopy for process analytical chemistry: Theory, echnology and implementation*; En Bakeev, K., Ed.; Backwell Publishing: Oxford, p 39.
- Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A.** In *Principios de análisis instrumental*, McGraw-Hill: 2001; .
- Song, J.; Fan, L.; Beaudry, R. M.; Song, J.; Fan, L. H.** 1998 Application of solid phase microextraction and gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry for rapid analysis of flavor volatiles in tomato and strawberry fruits. *J. Agr. Food Chem.* , 46, 3721-3726.
- Stevens, M. A.; Kader, A. A.; Albright-Holton, M.; Algazi, M.** 1977 Genotypic variation for flavor and composition in fresh market tomatoes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci* , 102, 680-689.
- Stevens, M. A.; Long, M. A.** 1971 Inheritance of malate in tomatoes. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* , 96, 120-122.
- Stevens, M. A.; Kader, A. A.; Albright-Holton, M.; Algazi, M.** 1977 Genotypic variation for flavor and composition in fresh market tomatoes. *J.Amer.Soc.Hort.Sci* , 102, 680-689.
- Tadmor, Y.; Fridman, E.; Gur, A.; Larkov, O.; Lastochkin, E.; Ravid, U.; Zamir, D.; Lewinsohn, E.** 2002 Identification of malodorous, a wild species allele affecting tomato aroma that was selected against during domestication. *J. Agric. Food Chem.* , 50, 2005-2009.
- Takemoto, H.; Hase, S.; Ikenaka, T.** 1985 Microquantitative analysis of neutral and amino sugars as fluorescent pyridylamino derivatives by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* , 145, 245-250.

- Tandon, K. S.; Abegaz, E.; Shewfelt, R. L.; Baldwin, E. A.; Scott, J. W.** 2000 Interrelationship of sensory descriptors and chemical composition as affected by harvest maturity and season on fresh tomato flavor. *Proc. Florida State Hort. Soc.* , 113.
- Thakur, B. R.; Singh, R. K.; Tieman, D. M.; Handa, A. K.** 1996 Tomato product quality from transgenic fruits with reduced pectin methylesterase. *J. Food Sci.* , 61, 85-87.
- TuanLiang Hong, C. T., S.** 1998 Quality analysis of tomato using near infrared spectroscopy. *J. Chin. Agric. Chem. Soc.* , 36, 418-424.
- Veit, K. U.; Krumbein, A.; Kosegarten, H.** 1999 Effect of different water supply on plant growth and fruit quality of *Lycopersicon esculentum*. . *J. Plant Nutr. Soil Sc.* , 162, 583-588.
- Walkof, C.; Hyde, R. B.** 1963 Inheritance of acidity in tomatoes. *Canadian Journal of Plant Sci.* , 48, 528-533.
- Williams, P. C.** 1979 Screening wheat for protein and hardness by near infrared spectroscopy. *Cereal Chemistry* , 56, 169-172.
- Wise, B. M.; Gallagher, N. B.; Bro, R.; Shaver, J. M.; Windig, W.; Koch, R. S.** 2006 PLS_Toolbox Version 4 for use with MATLAB™. *Eigenvector Research, Inc.* .
- Workman Jr., J. J.** 1999 Review of process and non-invasive near infrared and infrared spectroscopy: 1993-1999. *Appl. Spectrosc. Reviews* , 34, 1-89.
- 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 Physiol.* , 95, 1026-1035.
- Zupan, J.** 1994 Introduction of an artificial neural network (ANN) methods: what they are and how to use them. *Acta Chimica Slovenica* , 41, 327.



Objetivos generales

1. Desarrollar una metodología de trabajo adecuada que permita predecir por medio de metodología NIR la composición de las principales sustancias químicas, tanto volátiles como no volátiles, que intervienen en la calidad organoléptica de los frutos de tomate. Además, una vez desarrollada, esta metodología será puesta en práctica en distintas situaciones con el objetivo de acotar su campo de aplicación.
2. Establecer una metodología de corrección de la deriva de los sensores de una nariz electrónica comercial durante un día de trabajo, así como lograr la estandarización entre muestras analizadas en distintas secuencias que permita desarrollar librerías de muestras que vayan ampliándose con el tiempo de forma que se mejore la identificación y clasificación de muestras de tomate analizadas.
3. Optimizar el método de clasificación para variedades de tomate por medio de una nariz electrónica. Esta optimización se va a llevar a cabo tanto desde el punto de vista de la obtención del tiempo óptimo de generación del espacio de cabeza como de la determinación de las variables que favorecen una buena clasificación de diferentes cultivares de tomate.

Capítulo 1

Preselección rápida en campo: predicción de características de sabor y aroma en tomate mediante tecnología NIR.

RESUMEN

La espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR) es una técnica prometedora para la predicción de la composición de sustancias químicas de diversa naturaleza implicadas en la calidad interna del tomate. Se trata de una técnica rápida y no destructiva que permite predecir en campo con un error razonable, por lo que es muy útil para realizar una primera preselección cuando se trabaja con un número elevado de muestras. Uno de los inconvenientes de esta técnica es la necesidad de calibración con otros métodos analíticos por la distorsión que provocan diversas propiedades físicas de los alimentos en el espectro obtenido. La obtención de modelos de predicción efectivos pasa por establecer una metodología de trabajo adecuada, tanto de procesado de señal como de establecimiento de los modelos de calibrado. En este estudio se ha desarrollado una metodología de trabajo para predecir por medio de regresiones de tipo PLS la composición de las sustancias volátiles y no volátiles que intervienen en la calidad organoléptica de los frutos de tomate. La utilización de esta metodología permitió obtener predicciones con errores que pueden considerarse aceptables para todos los tipos de sustancias utilizados. Para acotar el campo de aplicación de la metodología desarrollada, ésta fue aplicada a distintas situaciones (variación de material vegetal y de ambiente de cultivo), observándose que la extrapolación de los modelos de calibrado de un ensayo a otro aumenta considerablemente el error de predicción.

1. INTRODUCCIÓN

La mejora de la calidad organoléptica resulta muy compleja y laboriosa ya que el número de compuestos, tanto sólidos solubles como volátiles, que contribuyen a ella es elevado. Los programas de mejora se enfrentan con la dificultad de obtener una caracterización rápida, amplia y precisa del sabor en cultivares de tomate. Esto hace que la selección de genotipos de élite sea muy complicada y este objetivo de mejora se haya visto postergado.

Actualmente, el mercado demanda tomates con elevada calidad organoléptica, deseando que los nuevos cultivares incorporen el sabor incomparable de las variedades tradicionales. Para retomar este objetivo de selección en el contexto moderno de mejora no es realista plantearse el uso de paneles de cata ni de técnicas analíticas modernas (HPLC, CZE, cromatografía G-M) puesto que el número de genotipos a evaluar en cada ciclo de selección lo hace inviable. No obstante, tienen mucho futuro las metodologías de predicción de componentes de calidad organoléptica que usando como referentes técnicas más precisas pueden hacer predicciones no destructivas en campo.

Con este objetivo, diversos grupos de investigación han empezado a utilizar la espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR) para caracterizar propiedades químicas en alimentos con resultados prometedores. La utilización de esta técnica se basa en la absorción de radiación electromagnética (entre 780 y 2500 nm) en enlaces de tipo C-H, O-H y N-H, ello ha permitido asociar estas medidas espectrales con concentraciones de constituyentes como agua, proteínas, grasas y carbohidratos (Osborne, *et al.*

1993). Sin embargo, para la mayoría de alimentos, la información de composición química que puede proporcionar el espectro de radiación infrarroja está distorsionada por cambios que provocan en este espectro diversas propiedades físicas de la muestra por lo que para el uso de espectroscopia NIR se requiere la calibración del método con otros métodos analíticos de cuantificación del constituyente de interés. Esta calibración se realiza relacionando la variable o variables analíticas medidas con el espectro de infrarrojo cercano medido y convenientemente transformado para eliminar ruido e interferencias en la señal medida. Como consecuencia de las características físicas de la transmisión difusa y de la reflectancia en que se basa esta técnica y de la complejidad del espectro, la calibración se realiza normalmente utilizando análisis estadísticos multivariantes complejos. Esta calibración debe hacerse con un número de muestras considerable pero una vez realizada se puede predecir el valor de la variable o variables en estudio del resto de muestras cultivadas. Si el número de plantas en campo es, por ejemplo, de varios miles únicamente sería necesario procesar en laboratorio las muestras que conformen el calibrado (unas 100) mientras que las restantes podrían predecirse de forma relativamente rápida y sin destruir el fruto. Otra ventaja importante es que se puede utilizar para determinar simultáneamente diferentes tipos de compuestos de naturaleza química diversa.

Por lo tanto, la espectroscopía NIR es una técnica muy prometedora para el análisis rutinario de la composición de alimentos, en particular de frutas y verduras. Esta metodología ha sido empleada para determinar el estado de madurez o el contenido en sólidos solubles totales en tomates, naranjas, melocotones, arándanos, papayas, kiwis y caquis (Birth, *et al.* 1984, Chee, *et al.* 1994, Chuma, *et al.* 1976, McClure, *et al.* 1975, Kawano, *et al.* 1992, Miyamoto y Yoshinobu. 1995, Osborne, *et al.* 1996, Jordan, *et*

al. 1997, Saito, *et al.* 1993, Slaughter, *et al.* 1996, Ventura y De Jager. 1997) sin embargo, el uso de métodos de referencia poco precisos (por ejemplo la medida de °Brix) para el calibrado hace que no se haya aprovechado todo su potencial.

El objetivo de este estudio es desarrollar una metodología de trabajo adecuada que permita predecir por medio de metodología NIR la composición de las principales sustancias químicas, tanto volátiles como no volátiles, que intervienen en la calidad organoléptica de los frutos de tomate. Además, una vez desarrollada, esta metodología será puesta en práctica en distintas situaciones con el objetivo de acotar su campo de aplicación.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Diseño del ensayo

Para desarrollar y comprobar la utilidad de los modelos de predicción de componentes de calidad organoléptica se han llevado a cabo dos ensayos en campañas consecutivas. El primer ensayo se desarrolló en 2007 en cultivo de primavera-verano en la parcela de la Universitat Jaume I al aire libre. Se utilizaron ocho cultivares tradicionales y como referenciales dos híbridos comerciales, Royesta (Seminis Vegetable sedes, Almería, España) y Zayno RZ (Rijk Zwaan Iberica, Almería, España) de tomate para ensalada. Las plantas se dispusieron en campo según un diseño de bloques al azar en el que se emplearon cuatro bloques por cultivar, cada uno con cuatro plantas. Se recogieron dos frutos por planta, de los racimos inferiores (1 a 3), en estado completamente maduro. Ensayos previos de puesta a punto de

la metodología de predicción demostraron la importancia de muestrear de una zona concreta de la planta y en estado completamente maduro, ya que de otro modo se incrementa considerablemente la variabilidad del contenido en componentes de calidad organoléptica de la muestra lo que afecta muy negativamente a la bondad de ajuste de los modelos de predicción. Con los frutos muestreados en cada bloque de cada cultivar se hicieron dos lotes homogéneos de modo que en total se analizaron 80 muestras. Estas 80 muestras se dividieron a su vez en dos grupos, uno (el de calibrado formado por 60 muestras) destinado a desarrollar los modelos y el otro (el de validación formado por 20 muestras) empleado para comprobar la bondad de los modelos y estimar el error que realmente se comete al utilizarlos para predecir. Tanto el grupo de muestras de calibrado como el de validación eran muestras representativas de todo el ensayo puesto que contenían muestras de todos los cultivares seleccionados al azar. En las muestras de este primer ensayo se realizaron mediciones de espectros NIR y determinaciones analíticas de sólidos solubles totales, azúcares, ácidos orgánicos y aromas.

El segundo ensayo se llevó a cabo en 2008 también en cultivo de primavera-verano en la parcela de la Universitat Jaume I al aire libre y en invernadero de cristal con sistemas de climatización adecuados. Este segundo ensayo se hizo replicado, es decir, se dispusieron los mismos cultivares al aire libre que en invernadero con el fin de evaluar si las diferencias de ambiente de cultivo afectaban a la validez de los modelos de predicción desarrollados y al error que se comete en estas predicciones. Al elegir el material vegetal de este ensayo se buscó disponer de cultivares que mostraran una mayor variabilidad en el contenido de compuestos implicados en la calidad organoléptica y por ello se seleccionaron los híbridos comerciales Zayno RZ (Rijk Zwaan Ibérica, Almería, España) y Caramba (De Ruiter sedes, Almería, España), una variedad local de tomate para

ensalada, otra de tomate de colgar y tres variedades tradicionales (una de tipo Muchamiel, otra de frutos amarillos y otra de tipo morado) cedidas por el Banco de Germoplama del Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana de la Universidad Politécnica de Valencia y que en ensayos anteriores (Cebolla-Cornejo. 2005, Cebolla-Cornejo, *et al.* 2006) mostraron grandes diferencias en el contenido de componentes de calidad organoléptica. En este ensayo, por cada cultivar se dispusieron tres bloques de cuatro plantas cada uno. Para el muestreo se eligieron las tres mejores planta de cada bloque y se recogieron frutos por planta (4), formando dos muestras de cada planta (126 en total). El procedimiento de muestreo y formación del grupo de calibrado (80 muestras) y validación (46 muestras) sigue los criterios indicados para el ensayo anterior.

2.2 Obtención del espectro NIR

Las medidas del espectro NIR se han llevado a cabo en cuatro puntos distintos de la zona periférica media de cada fruto (Hahn. 2002). Se ha utilizado un espectrómetro NIR portátil (Ocean Optics, Dunedin, FL, USA) con un detector de InGaAs (indio galio arsénico) que cubre el rango entre 900 y 2100 nm y una sonda de fibra óptica que permite el realizar medidas directamente sobre frutos (reflectancia difusa). Se tomaron 175 medidas espaciadas 6,80 nm, eliminando una de ellas ya que en el equipo utilizado la longitud de onda a la que corresponde esa medida no trabaja correctamente. Como referencia para calibrar el equipo se ha utilizado un disco de teflón, del que se han ido tomando espectros espaciados durante el tiempo de medida de las muestras para evitar variaciones de reflectancia debidas al propio equipo.

Para mejorar la correlación entre los espectros NIR y las variables analíticas medidas se realizó un primer pretratamiento del espectro NIR con la función espectroscópica que permite transformar las reflectancias difusas medidas en absorbancias calculadas ($\log [1/R]$) ya que estas absorbancias están mejor correlacionadas con la composición química que las reflectancias (Chen, *et al.* 1999). Posteriormente se procedió a eliminar las interferencias de señal de tipo multiplicativo, las debidas al tamaño de partícula y las asociadas a los cambios de longitud de onda, con el algoritmo de corrección SNV (Chu, *et al.* 2004). Este método trabaja centrando cada espectro alrededor de cero (restando el valor de la media) y dividiendo después cada valor de señal por la desviación estándar de todo el espectro.

2.3 Determinaciones analíticas

Una vez tomados los espectros NIR en el fruto intacto, los tomates fueron triturados y homogeneizados. Con el zumo de tomate sin diluir se realizó la determinación del contenido en sólidos solubles (A.O.A.C. 1984) por medio de un refractómetro (DR-101 Brix, Comecta, Barcelona). La muestra restante fue almacenada a -80°C hasta que se realizaron las demás determinaciones analíticas.

La cuantificación de los principales azúcares reductores (fructosa y glucosa) y ácidos orgánicos (cítrico, málico y glutámico) responsables de la intensidad de sabor en tomate se realizó mediante Electroforesis Capilar Zonal (Roselló, *et al.* 2002). Se utilizó un equipo P/ACE MDQ (Beckman Instruments, Fullerton, CA).

La determinación de los compuestos volátiles la realizó el grupo de Química Analítica del Instituto Universitario de Plaguicidas y Aguas (IUPA) de la Universitat Jaume I, siguiendo el protocolo que pusieron a punto para

la cuantificación de aromas en tomate (Beltrán, *et al.* 2006). En primer lugar se llevó a cabo una extracción por purga y trampa de las muestras adicionando el correspondiente patrón interno o “surrogate” para corregir posibles problemas derivados del proceso de retención y aislamiento de los aromas en el extracto. El posterior análisis por GC-MS se realizó por triplicado. En cada secuencia se analizaron los extractos de las muestras en estudio, blancos de procedimiento y 3 calibrados. Todos los extractos de las muestras requirieron una dilución 1/25 para la correcta cuantificación de los compuestos más concentrados. El equipo utilizado para el análisis fue un cromatógrafo de gases CP3800 (Varian Inc., Palo Alto, CA) acoplado a espectrómetro de masas con analizador de trampa de iones MS4000 (Varian Inc., Palo Alto, CA).

2.4 Análisis de datos

Los modelos de predicción del contenido de cada uno de estos parámetros analíticos a partir de los espectros NIR pretratados se obtienen por regresión parcial mínimo cuadrática (PLS) (Lorber, *et al.* 1987, Geladi y Kowalski. 1986, Martens y Naes. 1989, Höskuldsson. 1996). Las regresiones PLS tratan de encontrar variables latentes que maximicen la varianza explicada por las variables de predicción (X, en este caso los espectros NIR) que es relevante para predecir la variable respuesta (Y, para nosotros cada una de las variables analíticas medidas). En el cálculo de los modelos se utiliza la matriz de espectros pretratados y los valores de la variable respuesta del subgrupo de muestras de calibrado. Para poder elegir el número óptimo de variables latentes que se utilizarán se realiza el cálculo del modelo aplicando el procedimiento de validación cruzada llamado de ventana veneciana (venetian blinds) que selecciona subgrupos de datos para

calcular varios submodelos similares con los que contrastar la validez del modelo general y disponer de valores de errores mínimo cuadráticos de validación cruzada (RMSECV). Para cada ensayo se ha utilizado un número de subgrupos coincidente con el número de muestras de cada cultivar con el fin de que en cada subgrupo haya información de todos los cultivares. Estos RMSECV se obtienen con la expresión:

$$RMSECV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_{cvi} - y_i)^2}{n}}$$

Siendo y_i los valores medidos e \hat{y}_{cvi} los calculados por el modelo para los subgrupos de validación cruzada.

La secuencia de valores RMSECV calculados se utiliza como uno de los criterios de selección del número de variables latentes a incluir en el modelo, de modo que se dejan de incluir variables latentes cuando la reducción de RMSECV es inferior al 2%. El segundo criterio es utilizar el menor número posible de variables latentes.

Dado que este tipo de regresión utiliza el cálculo de componentes principales para la búsqueda de variables latentes que expliquen la variabilidad de la variable respuesta se ven muy influidos por la presencia de puntos anómalos, por lo que es necesario, antes de utilizar los citados modelos, proceder a la detección y eliminación de estos puntos anómalos si los hubiera. Los puntos anómalos pueden aparecer tanto en la matriz de medidas espectrales pretratadas (X) como en las variables analíticas medidas (Y), siendo distinto el procedimiento de detección en cada caso. Para la

detección de espectros NIR anómalos se comprueban los valores de los estadísticos T^2 de Hotelling y los residuos Q que se obtienen a partir de las fórmulas:

$$T_i^2 = t_i \lambda^{-1} t_i^T = X_i P_k \lambda^{-1} P_k^T X_i^T$$

$$Q_i = e_i e_i^T = X_i (I - P_k P_k^T) X_i^T$$

Siendo X_i la i -ésima fila de la matriz de m muestras x n longitudes de onda de espectro NIR pretratado, P_k la k -ésima columna de la matriz de coordenadas de las longitudes de onda de espectro NIR pretratado referidas a las variables latentes utilizadas en el modelo PLS, λ la matriz diagonal que contiene los valores propios (desde λ_1 a λ_k) correspondientes a los k vectores propios (variables latentes) utilizados en el modelo, t_i la i -ésima fila de la matriz T_k con los k vectores de coordenadas de la muestras referidas a las variables latentes retenidas en el modelo, e_i la i -ésima fila de la matriz E de residuos e I la matriz identidad ($n \times n$).

El estadístico Q muestra el residuo entre una muestra y su proyección dentro del hiperespacio que definen las variables latentes que se incluyen en el modelo (Figura C1.1). El estadístico T^2 muestra la contribución de una muestra a la variabilidad dentro del hiperespacio que definen las variables latentes que se incluyen en el modelo. Tanto para el conjunto de residuos Q como T^2 se pueden calcular límites de confianza (Jackson y Mudholkar. 1979) por lo que se suele revisar los puntos que caen

fuera de estos límites de confianza al 95% como sospechosos de ser anómalos y se eliminan aquellos que confirmen su anomalía.

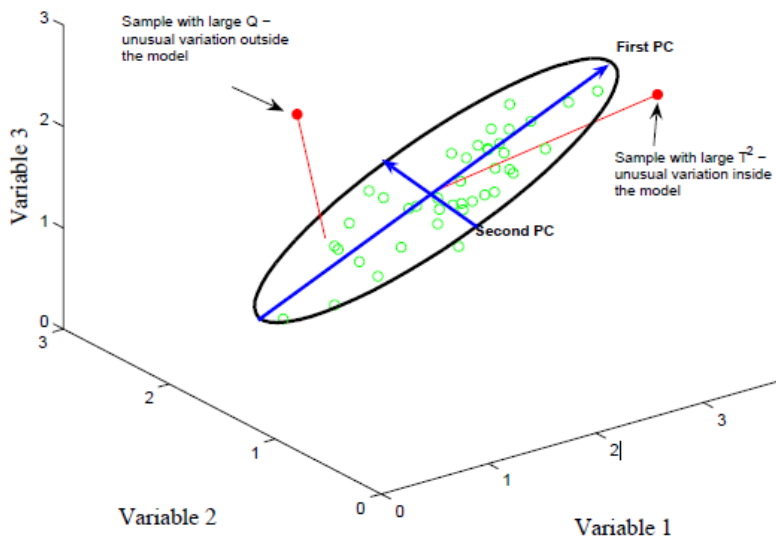


Figura C1.1: Representación geométrica del significado de los residuos Q y T^2 de Hotelling en los modelos de regresión PLS (tomado de Wise et al., 2006).

En el caso de puntos anómalos en la variable dependiente a predecir se comprueban los valores de los residuos normalizados de Y (media 0 y varianza 1) frente a los parámetros leverage obtenidos a partir de la siguiente expresión:

$$h_i = \frac{1}{n} + \sum_{a=0}^k \frac{t_{ia}^2}{t_a^T t_a}$$

Siendo h_i el parámetro leverage de la muestra i , k el número de variables latentes utilizadas en el modelo y t_{ia} el coeficiente del vector propio de la muestra i en la variable latente a .

Por tanto, la escala de medida de los residuos Y normalizados representa el número de desviaciones típicas de error en el valor Y de una muestra (siendo considerados anómalos valores iguales o mayores que ± 3). Los parámetros leverage definen la influencia que una determinada muestra puede tener en el modelo y está relacionado con el valor del residuo T^2 de Hotelling. Para ellos también se pueden obtener límites de confianza, por lo que, al igual que en el caso anterior, se suele revisar los puntos que caen fuera de estos límites de confianza al 95% como sospechosos de ser anómalos y se eliminan aquellos que confirmen su anomalía.

Tras eliminar los puntos anómalos y recalcular el modelo se procede a utilizarlo para predecir con el valor de la variable respuesta que tendrían las muestras del grupo de validación y se compara el valor predicho con el realmente medido para obtener una estima del error medio esperado asociado con futuras predicciones. Esta estima se obtiene a partir del RMSEP que se define como:

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_{pi} - y_i)^2}{n}}$$

Siendo y_i los valores medidos e \hat{y}_{pi} los calculados por el modelo para los subgrupos de validación cruzada.

Aunque no resulta tan informativo como el RMSEP, se han incluido también los cálculos de las estimas directas del error de modelado expresado por medio de las raíces cuadradas del error cuadrático medio de la calibración (RMSEC) para poder comparar nuestros resultados con los de otros trabajos en los que se incluye este parámetro:

$$RMSEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_{ci} - y_i)^2}{n}}$$

Siendo y_i los valores medidos e \hat{y}_{ci} los calculados para el modelo.

Es importante resaltar que los tres parámetros de estima de error calculados (RMSEC, RMSECV y RMSEP) está expresados en las unidades de medida de la variable original por eso son una estima “directa” del error que se comete y resultan muy útiles y fáciles de interpretar.

Dado que la mejor forma de contrastar la bondad del modelo es realizar una predicción y que es posible que existan diferencias sistemáticas entre los valores medios de las muestras utilizadas para calibrado y las de validación (*Bias*), resulta importante calcular el valor de estas diferencias para poder corregir las predicciones que realiza el modelo. Para ello se utiliza la expresión:

$$Bias = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_{pi} - y_i)}{n}$$

Siendo y_i los valores medidos e \hat{y}_{pi} los predichos.

Cuando el *Bias* no resulta despreciable es conveniente utilizar el error típico de la predicción (SEP) en lugar del RMSEP:

$$SEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_{pi} - y_i - Bias)^2}{n}}$$

Por último, ya que la utilidad que se pretende dar a esos modelos es la preselección no destructiva en campo de genotipos con contenidos elevados de componentes de calidad organoléptica, se incluye el parámetro:

$$\frac{SEP}{Máximo\ valor\ variable\ medida} * 100$$

Para disponer de una comparación relativa directa del nivel de precisión medio de las predicciones con respecto al valor que se buscará en la selección.

Adicionalmente, con el fin de ganar en precisión a la hora de utilizar los modelos de predicción desarrollados a partir de espectros NIR se procederá a realizar una selección de longitudes de onda del espectro NIR eliminando aquellas que aporten excesivo ruido y disminuyan la precisión de cada modelo. Para este propósito se utilizará el cálculo de intervalos PLS (IPLS) (Wise, *et al.* 2006) tanto con el método de selección incremental (“forward selection”) como con el de eliminación reversa (“reverse” o “backward elimination”). En el primer caso, el algoritmo comienza creando modelos PLS usando solo uno de los intervalos de variables definidos. Se

calcula el valor de RMSECV de cada uno de los modelos y se selecciona el intervalo de longitudes de onda cuyo modelo ha obtenido el menor RMSECV. En la segunda etapa, este intervalo se irá combinando con cada uno de los intervalos restantes y se obtendrán nuevos modelos PLS, de los que se seleccionará aquel que tenga un menor RMSECV. De esta forma, en etapas sucesivas, va incrementándose el número de intervalos seleccionados, finalizando la búsqueda cuando el valor de RMSECV del mejor modelo de la última etapa tiene mayor RMSECV que el seleccionado en la etapa anterior. El modo de eliminación reversa funciona al contrario. Inicialmente, se parte del conjunto completo de longitudes de onda. En la primera etapa, el algoritmo selecciona un intervalo y lo elimina, obteniendo sin él un nuevo modelo PLS para el que calcula el valor RMSECV. Esta operación se repite secuencialmente con todos los intervalos para obtener n modelos con $n-1$ intervalos. Para cada uno de ellos se calcula el valor de RMSECV y se comparan, eliminando permanentemente el intervalo que ha sido quitado del modelo que menor valor de RMSECV ha obtenido, ya que lo considera el peor intervalo. Al igual que en el caso anterior, este ciclo se repite hasta que en la última etapa, el mejor modelo obtenido da peor resultado que el de la etapa anterior.

Desde el punto de vista práctico, para el cálculo de intervalos se han utilizado ventanas de tres longitudes de onda adyacentes, ya que por la naturaleza de las variables X utilizadas (longitudes de onda NIR espectroscópicamente correlacionadas) resulta útil reducir el número total de intervalos y no se pierde precisión con ello (Wise, *et al.* 2006).

Todos los cálculos de pretratamiento de señal, obtención de modelos de regresión PLS, detección de puntos anómalos, obtención de parámetros de error y bondad de ajuste y selección de intervalos de longitud de onda para cada modelo desarrollado se han realizado en entorno Matlab v 7.6.0

(Mathworks Inc, Natick, MA, USA) mediante la aplicación PLS_Toolbox v 5.0 (Eigenvector Research Inc, Wenatchee, WA, USA).

3. RESULTADOS Y DISCUSION

Los espectros pretratados de las muestras objeto del estudio (Figura C1.2b) muestran que existen bastantes zonas con amplia variabilidad (zonas más anchas de la banda del espectro y con abundantes picos de absorción) a lo largo de todo el espectro para las distintas muestras estudiadas.

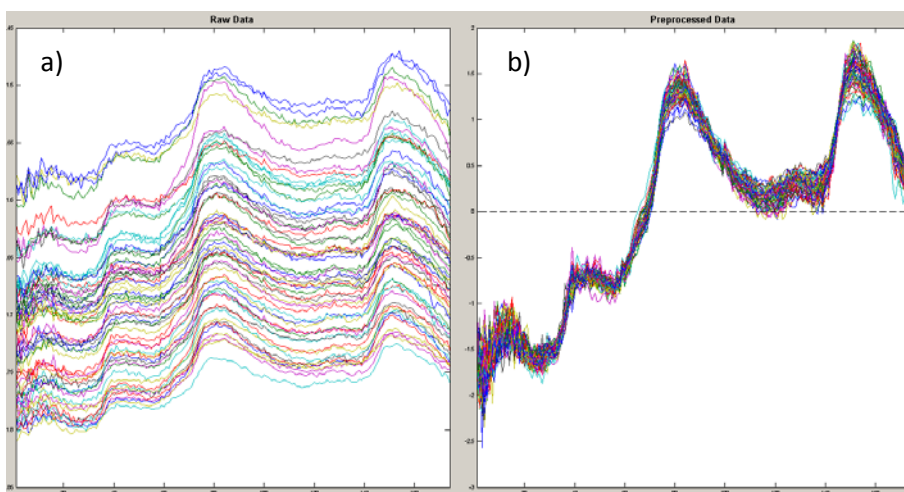


Figura C1.2: Espectros NIR medios (Absorbancias calculadas) de los cvs estudiados: a) sin pretratar y b) pretratados (SNV) para eliminar ruido y errores en la señal y mejorar la correlación con las variables analíticas objeto de estudio.

La matriz de estos espectros pretratados (X) es la que se utiliza como matriz de variables de predicción para desarrollar los modelos PLS de las diferentes variables analíticas (Y) a predecir (segunda columna Tablas C1.1 a C1.3).

3.1 Modelos de predicción del contenido en sólidos solubles, azúcares y ácidos a partir de espectros NIR.

El modelo de predicción del contenido en °Brix a partir de los espectros NIR medidos en frutos utiliza 7 variables latentes (Tabla C1.1) que recogen el 71.60% de la variabilidad presente en el espectro NIR medido para explicar el 93.21% de la variabilidad del contenido en °Brix cuantificado. Antes de obtener este modelo definitivo ha sido necesario eliminar dos puntos anómalos de la matriz de espectros y uno del vector de valores de °Brix medidos para que no distorsionasen la regresión PLS. En este caso, la bondad de ajuste del modelo (Figura C1.3) es muy buena ($R^2_c = 0.93$), no obstante, en las regresiones PLS, es conveniente comprobar la bondad de ajuste del subgrupo de muestras que se utiliza para validar el modelo mediante predicción, ya que estas muestras no se han utilizado para calcular el modelo y representan adecuadamente el comportamiento de éste cuando se emplea para predecir. Para el modelo de °Brix, el ajuste de la predicción (triángulos rojos, Figura C1.4) es menor que el de calibrado ($R^2_p = 0.69$). Esta disminución en el ajuste de los puntos de predicción al modelo de calibrado no se debe a que los puntos del subgrupo de predicción no se encuentren en el mismo espacio que los del modelo (se comprueba porque el valor del Bias de predicción es muy pequeño, -0.07), sino a que la dispersión de estos puntos es mayor. No obstante, el valor de este ajuste se puede considerar aceptable para este tipo de modelos (predicción a partir de medidas no destructivas de reflectancia difusa) y la variable analítica utilizada (una variable compleja que no se mide con mucha precisión).

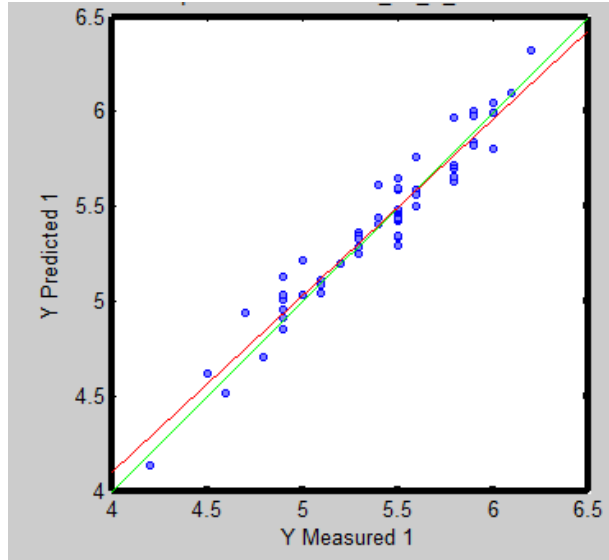


Figura C1.3: Representación gráfica de la bondad de ajuste del modelo PLS de predicción del contenido de °Brix a partir del espectro NIR pre tratado. La línea verde representa el ajuste ideal, la roja el ajuste del modelo calculado y los puntos circulares la posición de las muestras del lote de calibrado en el modelo calculado.

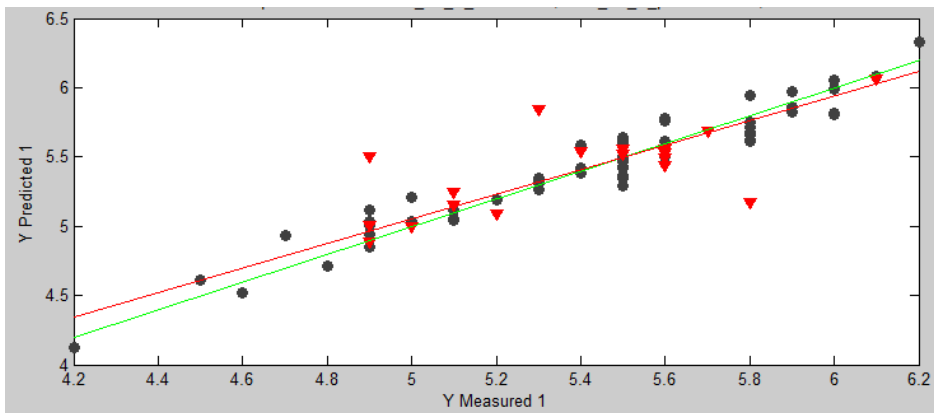


Figura C1.4: Representación gráfica de la bondad de ajuste del modelo PLS de predicción del contenido de °Brix a partir del espectro NIR pre tratado y su eficacia de predicción. La línea verde representa el ajuste ideal, la roja el ajuste del modelo calculado, los puntos circulares la posición de las muestras del lote de calibrado en el modelo calculado y los triángulos rojos las muestras utilizadas para contrastar la capacidad de predicción del modelo.

Capítulo 1

Tabla C1.1: Resumen de los parámetros que definen la bondad de ajuste de los modelos de regresión PLS para predicción de las variables analíticas relacionadas con el sabor a partir de espectros NIR. Para cada modelo se dan los parámetros obtenidos con todas las variables (174 longitudes de onda) y tras la selección de variables con el método IPLS reverso (entre paréntesis)

MODELO	Intervalo variación *	Nº VL	Nº pa X [Y]	R ² _c	R ² _p	RMSEC*	RMSECV*	RMSEP*	Bias _p *	SEP*	SEP/M ax (%)
BRIX	4,2 - 6,2	7 (7)	2 [1]	0.93 (0.96)	0.69 (0.75)	0.11 (0.09)	0.38 (0.23)	0.44 (0.40)	-0.07 (-0.06)	0.43 (0.39)	7.24 (6.59)
Fructosa	1384,91 - 2360,25	5 (9)	0 [1]	0.88 (0.96)	0.79 (0.88)	85.62 (45.59)	217.04 (113.02)	167.35 (143.84)	42.07 (-26.38)	161.99 (141.40)	6.86 (5.99)
Glucosa	1102,48 - 2210,73	5 (7)	1 [1]	0.90 (0.96)	0.83 (0.88)	86.23 (56.58)	233.88 (159.61)	178.57 (170.29)	71.58 (8.81)	163.60 (170.06)	7.40 (7.69)
Cítrico	283,45- 611,98	5 (9)	0 [0]	0.83 (0.98)	0.73 (0.86)	33.39 (11.00)	60.87 (31.94)	61.85 (58.92)	4.82 (7.80)	61.66 (58.40)	10.07 (9.54)
Málico	72,21 - 267,70	5 (6)	0 [0]	0.88 (0.94)	0.80 (0.86)	17.06 (11.91)	31.15 (26.26)	33.41 (24.89)	5.10 (6.79)	33.02 (23.94)	12.33 (8.94)
Glutámico	92,02 - 288,45	5 (7)	1 [0]	0.86 (0.97)	0.80 (0.84)	14.14 (7.08)	30.78 (18.64)	33.38 (33.28)	-8.64 (-4.63)	32.24 (32.96)	11.18 (11.42)

* Las unidades de medida de estos parámetros son de °Brix en el caso de los Brix y de mg/100g en las otras variables analíticas medidas.

De cualquier modo, para tener una idea más realista de la utilidad del modelo para predicción en campo, se debe mirar los valores del error medio que cabe esperar tener en futuras predicciones (RMSEP o SEP si el Bias fuera grande) y la proporción que este representa respecto del valor máximo medido para el calibrado. Para el modelo de predicción de °Brix esta estima de error promedio es de 0.44°Brix que para refractómetros de campo sería un valor de error aceptable. El error de predicción representa un 7.24% del valor máximo medido, porcentaje que deberemos tener en cuenta al fijar los umbrales de selección a partir de este valor máximo y que es perfectamente asumible en un programa de mejora. En comparación con los resultados obtenidos por otros autores (Slaughter, *et al.* 1996, Shao, *et al.* 2007, Suparlan y Kazuhiko. 2004, Walsh, *et al.* 2004) al trabajar con tomate en condiciones similares, se observa que la bondad de ajuste de nuestro modelo de calibrado es similar, siendo algo peor la bondad de ajuste de la predicción, aunque la estima del error medio que se comete en futuras predicciones resulta similar (la mayor diferencia es de 0.1°Brix). Posiblemente, el menor ajuste de la predicción de nuestro modelo se deba a que hemos utilizado menor número de muestras, tanto para la validación como para la predicción. En nuestro caso, este menor número de muestras se debe a que la mayor cantidad de variables analíticas a determinar (especialmente la cuantificación de aromas) eran un factor muy limitante del número total de muestras con el que podíamos trabajar. Sin embargo, la utilidad del modelo calculado resulta muy parecida, siendo bastante similar también a la encontrada para otros cultivos, tales como kiwi (McGlone y Kawano. 1998) manzana (Temma, *et al.* 2002, Lu, *et al.* 2000) y mandarina (Walsh, *et al.* 2004, Hernandez, *et al.* 2006) y mejor que las citadas para cereza, albaricoque (Carlini, *et al.* 2000), sandía (Hai-qing, *et al.* 2007),

melón, piña (Maul, *et al.* 1998), melocotón (Walsh, *et al.* 2004) y mango (Schmilovitch, *et al.* 2000).

No obstante, se puede intentar mejorar la utilidad del modelo de predicción de °Brix eliminando las longitudes de onda que aporten excesivo ruido o disminuyan la precisión del modelo por estar poco correlacionadas con el contenido en sólidos solubles medido en los frutos. Para ello, se han calculado los intervalos IPLS de longitudes de onda que reducen el RMSECV del modelo de calibrado (barras verdes de la Figura C1.5).

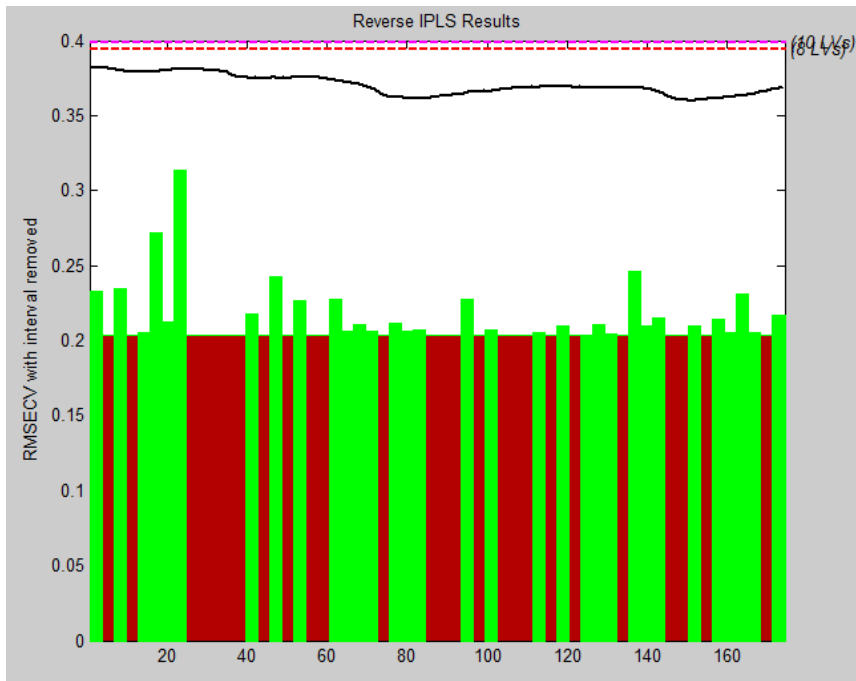


Figura C1.5: Intervalos IPLS que reducen el RMSECV del modelo de calibrado para la predicción del °Brix a partir del espectro NIR pre tratado. Las barras verdes indican los intervalos (con longitudes de onda agrupadas de 3 en 3) seleccionados. La altura de la barra indica la frecuencia de inclusión del intervalo en los modelos de selección (a mayor altura mayor importancia del intervalo).

Posteriormente se ha recalculado el modelo de calibrado utilizando solamente las longitudes de onda seleccionadas, comprobándose los parámetros de bondad de ajuste y error explicados anteriormente (datos entre paréntesis en primera fila de la Tabla C1.1). Se observa que al seleccionar las longitudes de onda del espectro NIR que se incluyen en el modelo de calibrado mejora el ajuste tanto del modelo como de la predicción, reduciéndose también las estimas de error medios de futuras predicciones. No obstante, el incremento de precisión conseguido no es grande, solamente el 4% en los errores medios de futuras predicciones.

Se han calculado también los modelos de predicción de contenido en fructosa, glucosa y ácidos cítrico, málico y glutámico (Tabla C1.1). En general se observa que los ajustes, tanto de los modelos de calibrado como los de las predicciones pueden considerarse satisfactorios para este tipo de modelos de predicción siendo el porcentaje del error medio que se espera cometer en futuras predicciones del mismo orden que el calculado para el modelo de °Brix, entre un 6.89 y un 12.33 % del valor máximo que se buscaría en la selección. En la bibliografía no se encuentran modelos de predicción del contenido en azúcares y ácidos individuales en tomate a partir del espectro NIR medido por reflectancia. Se ha desarrollado modelos de predicción para glucosa y fructosa en kiwi (Zude, *et al.* 2006) y, a pesar de que los parámetros de bondad de ajuste no son del todo comparables a los nuestros (proporcionan el error de calibrado como porcentaje de peso seco), son bastante parecidos. Por otro lado, al igual que para el modelo de predicción de sólidos solubles totales, para los modelos de azúcares y ácidos individuales se puede hacer una selección de las longitudes de onda más idóneas para cada modelo (Tabla C1.1, valores entre paréntesis de las filas 3 a 7). En general, se observa que al seleccionar longitudes de onda el modelo gana en precisión, aunque poca (cerca de un 3% para el caso del modelo de

málico). Para los modelos de glucosa y glutámico no se consigue mejora alguna. Por tanto, el proceso de selección de variables no aporta mejoras sustanciales y, aunque es relativamente rápido de calcular no resulta esencial.

Por consiguiente, los modelos de predicción de sólidos solubles, azúcares y ácidos orgánicos desarrollados, aunque no son métodos analíticos precisos permiten la predicción de estos componentes de intensidad de sabor en frutos de tomate con un error asumible (en promedio cerca del 10% de valor máximo que se buscará en la selección). Además, teniendo en cuenta que, tras el calibrado con una cien muestras, la toma de espectros en campo es relativamente rápida y que con programas específicos que transporten los modelos de calibrado se puede predecir los valores de estos componentes en campo resulta factible y muy interesante ésta predicción para los miles de plantas que habitualmente se manejan en programas de mejora.

3.2 Modelos relacionados con aromas

Una vez obtenidos los modelos para sólidos solubles (°Brix, ácidos y azúcares), se ha aplicado la metodología anterior para establecer modelos con los compuestos volátiles que se han citado como más influyentes en la evaluación del aroma del tomate por paneles de cata (Buttery y Ling. 1993, Tandon, *et al.* 2000, Yilmaz. 2001). En la Tabla C1.2 aparecen los parámetros de bondad de ajuste y error promedio de predicciones, así como el porcentaje que este error representa respecto de valor máximo. Es de destacar que, a pesar de que la variable de calibrado se encuentra en concentraciones mucho más bajas que para las variables constituyentes del grupo de sólidos solubles, en todos los casos, los errores cometidos para la

predicción de los distintos compuestos se encuentran en una magnitud similar a los obtenidos para ácidos y azúcares. En la bibliografía, el único intento de establecer correlaciones entre aspectos aromáticos y los espectros NIR de tomate fue llevada a cabo por Peirs et al. (Peirs, *et al.* 2003) quienes obtuvieron resultados que consideran interesantes al relacionar el espectro NIR con las valoraciones de un panel de cata. No tenemos noticia de que se hayan desarrollado modelos de predicción del contenido en aromas de tomate (ni de otros cultivos) a partir de espectros NIR, por lo que no se puede comparar la bondad de nuestros modelos con otros. No obstante, la comparación con los modelos anteriores de azúcares y ácidos pone de relieve suficientemente que la utilidad de estos modelos de predicción de aromas es similar a la descrita a los de azúcares y ácidos, por lo que resulta útil incorporarlos a la batería de modelos de predicción en campo.

De igual forma se han obtenido los modelos para compuestos volátiles del tomate que, aunque detectados y cuantificados habitualmente, no se han citado como tan determinantes como los del grupo anterior, aunque pueden ser importantes en ciertos matices aromáticos particulares (Tabla C1.3). En este grupo, aunque hay modelos para los que el error de predicción es muy bajo (1-octanol, benzaldehído, Isoeugenol) comparado con el valor máximo medido, en general los errores son mayores que para el grupo anterior (para 1-hexanol, linalool, E,E-2,4-hexadienal esta relación es cercana al 20%). Si estos modelos se utilizan para predicción en campo hay que ser conscientes del mayor error que se comete pero también es factible incorporarlos a la batería de modelos de predicción en campo.

Tabla C1.2: Resumen de los parámetros que definen la bondad de ajuste de los modelos de regresión PLS para predicción de los compuestos aromáticos que se han citado como más representativos del aroma del tomate (Buttery y Ling. 1993, Tandon, *et al.* 2000, Yilmaz. 2001)

MODELO	Intervalo (ng/g)	Nº VL	R ² _c	R ² _p	RMSEC	RMSEP	SEP	SEP/Max (%)
E-2 heptenal	6,69-45,80	6	0.94	0.85	1.29	3.43	3,36	7,35
Z 3 hexenal	55,8-1688,85	8	0.96	0.89	40.24	133.99	133,33	7,89
E_2 hexenal	61,53 - 2217	6	0.92	0.77	94.15	271.03	260,2	11,74
Z-citral	25,01- 163,36	5	0.85	0.77	8.60	15.09	15,09	9,23
E_citral	14,93- 143,36	5	0.93	0.84	7.13	18.72	18,62	12,99
Hexanal	108,71-3574,94	7	0.95	0.91	164.57	372.59	370,37	10,36
Phenyl acetaldehyde	2,42- 33,66	8	0.96	0.92	1.20	3.27	3,24	9,63
6 Methyl 5 hepten 2 ona	27,16- 261,92	7	0.96	0.91	7.10	18.13	17,71	6,76
Beta inona	1,27 - 10,34	4	0.86	0.80	0.57	0.66	0,66	6,35
Geranyl acetona	1 - 328,24	6	0.92	0.81	13.93	41.22	40,9	12,46
2 Isobutiltiazol	1,98 - 111,21	8	0.98	0.90	2.87	8.78	8,55	7,69
2_3_metil_1_butanol	65,27- 1606,55	7	0.95	0.87	52.64	147.90	140,81	8,76
2-phenyl etanol	128,25- 348,39	7	0.95	0.85	8.53	30.74	27,49	7,89
Z_3_hexenol	247,03 - 3349,28	6	0.91	0.79	225.24	596.82	596,82	17,82

Tabla C1.2 Cont.: Resumen de los parámetros que definen la bondad de ajuste de los modelos de regresión PLS para predicción de los compuestos aromáticos que se han citado como más representativos del aroma del tomate (Buttery y Ling. 1993, Tandon, *et al.* 2000, Yilmaz. 2001)

MODELO	Intervalo (ng/g)	Nº VL	R ² _c	R ² _p	RMSEC	RMSEP	SEP	SEP/Max (%)
Alpha pinene	1,30 - 16,48	5	0.87	0.75	1.03	2.10	2,07	12,55
Eugenol	0,76 - 225,92	8	0.96	0.84	9.77	35.77	35,69	15,8
Methyl salicylate	1-43,07	6	0.96	0.85	0.49	1.68	1,67	3,87

Tabla C1.3: Resumen de los parámetros que definen la bondad de ajuste de los modelos de regresión PLS para predicción de los compuestos aromáticos menos representativos del aroma del tomate

MODELO	Intervalo (ng/g)	Nº VL	R ² _c	R ² _p	RMSEC	RMSEP	SEP	SEP/Max (%)
2-carene	0 - 11.90	9	0.97	0.85	0.70	1.59	1,55	9,59
3-carene	0.32 - 6.30	6	0.97	0.87	0.17	0.62	0,60	7,95
R-limonene	0.32 - 10.07	6	0.88	0.80	0.67	1.19	1,19	14,71
E-2-hexenol	0 - 104.68	5	0.88	0.77	2.81	5.96	5,77	5,51
1-octanol	0 - 61.73	5	0.89	0.85	0.72	0.93	0,78	1,35
6-metil-5-hepten-2-ol	1.16 - 7.20	5	0.84	0.73	0.48	1.01	1,00	15,47
1-hexanol	57.70 - 1279.83	4	0.76	0.66	132.24	199.53	199,10	18,18
alfa-terpineol	0 - 2.11	4	0.79	0.76	0.27	0.36	0,33	16,14

Tabla C1.3 Cont: Resumen de los parámetros que definen la bondad de ajuste de los modelos de regresión PLS para predicción de los compuestos aromáticos menos representativos del aroma del tomate

MODELO	Intervalo (ng/g)	Nº VL	R ² _c	R ² _p	RMSEC	RMSEP	SEP	SEP/Max (%)
linalool	0 - 3.88	3	0.80	0.76	0.56	0.76	0,69	18,76
benzaldehido	11.83 - 53.12	5	0.85	0.78	3.32	6.39	5,79	4,12
2-hidroxibenzaldehido	1.05 - 7.41	4	0.87	0.84	0.92	1.02	0,99	14,14
E-2-octenal	11.47 - 62.18	4	0.80	0.75	3.40	4.80	4,09	7,99
beta-ciclocitral	0.88 - 5.28	6	0.92	0.86	0.28	0.53	0,53	9,54
nonanal	11.11 - 44.77	4	0.76	0.67	5.21	6.88	6,84	16,99
E,E-2,4-hexadienal	0 - 4.97	5	0.88	0.79	0.48	1.07	1,07	21,52
E,E-2,4-heptadienal	2.68 - 17.88	4	0.81	0.75	1.13	1.50	1,48	9,20
E,E-2,4-decadienal	4.38 - 99.11	4	0.76	0.69	7.18	10.02	8,93	9,17
Isoeugenol	0 - 12,37	4	0.78	0.69	0.30	0.47	0,46	3,74
Guaiacol	2,27 - 212,50	6	0.91	0.84	15.32	30.25	30,23	14,58
3-metiltiopropional	0 - 61.91	5	0.86	0.81	5.90	8.88	8,74	11,70
difenil éter	0,11 - 1,83	5	0.86	0.82	0.15	0.21	0,20	11,07

3.3 Repetitividad de los modelos

Para comprobar el alcance de la aplicación de los modelos desarrollados se va a tratar de predecir los resultados de ácidos y azúcares de las muestras obtenidas en un segundo ensayo de tomate. Este ensayo de comprobación se ha realizado replicado (los mismos cultivares se han ensayado al aire libre y en invernadero) para comprobar si las diferencias de ambiente de cultivo afectaban a la validez de los modelos de predicción desarrollados y al error que se comete en estas predicciones. En este segundo ensayo se han elegido cultivares que presentan una mayor variabilidad que los utilizados en el primer ensayo para obtener modelos más amplios y, en principio, más generales.

En primer lugar se han desarrollado los modelos de predicción para sólidos solubles totales y para sus azúcares y ácidos individuales en cada una de las réplicas de ese segundo ensayo (Tabla C1.4). Se ha comprobado de este modo que la metodología de desarrollo de modelos de predicción utilizada funciona muy bien, siendo los resultados de bondad de ajuste y estima de errores de predicción similares a las obtenidas en los modelos del primer ensayo.

Posteriormente se ha intentado utilizar un modelo desarrollado con los datos de un ensayo para predecir la composición de los frutos de otro. Por ejemplo, si se utiliza el mejor modelo de calibrado del segundo ensayo a aire libre (glucosa) para predecir el contenido en glucosa de las muestras del primer ensayo (desarrollado también al aire libre y que incluía cultivares con menor variabilidad) se observa que, aunque estos puntos (triángulos rojos de la Figura C1.6) entran sin problemas en el espacio de puntos del segundo ensayo la precisión de la predicción es mucho menor que cuando se utiliza su propio modelos de calibrado. El RMSEP de esta predicción es de 512.19

Capítulo 1

mg/100g, frente al que tenía con su modelo de calibrado era de 178.57 mg/100g (Tabla C1.1). En esta predicción combinada el Bias de la predicción en este caso es de 148.42 mg/100g, mientras que en su modelo de calibrado era de 71.58 mg/100g (Tabla C1.1). Es decir, al utilizar el mejor modelo del segundo ensayo al aire libre para predecir la composición de los frutos del primer ensayo el RMSEP se multiplica por 2.86 alcanzando valores inaceptables y el Bias por 2.

Tabla C1.4: Resumen de los parámetros que definen la bondad de ajuste de los modelos de regresión PLS para predicción de las variables analíticas relacionadas con el sabor a partir de espectros NIR en el segundo ensayo tanto al aire libre como en invernadero (valores entre paréntesis).

MODELO	Intervalo *	Nº VL	R ² _c	R ² _p	SEP*	SEP/Max (%)
Brix	2.9-9.5 (3.1 - 6.8)	6 (6)	0.86 (0.77)	0.68 (0.65)	0.67 (0.65)	7.05 (11.20)
Fructosa	2878.35 - 4355.55 (920.08-4022.57)	6 (7)	0.92 (0.89)	0.90 (0.76)	275.26 (286.37)	6.32 (7.12)
Glucosa	2562.18 - 4215.72 (434.85- 3963.28)	8 (5)	0.95 (0.88)	0.88 (0.74)	374.60 (385.23)	8.88 (9.72)
Cítrico	452.95 - 676.45 (205.99 - 989.27)	6 (5)	0.89 (0.83)	0.79 (0.70)	80.85 (101.23)	11.95 (10.23)
Málico	64.42-155.35 (65.79 - 373.81)	6 (4)	0.85 (0.78)	0.84 (0.71)	22.49 (30.81)	14.48 (12.05)
Glutámico	131.24 - 227.13 (72.86 - 301.95)	4 (3)	0.80 (0.74)	0.75 (0.69)	34.99 (40.25)	15.01 (13.35)

* Las unidades de medida de estos parámetros son de °Brix en el caso de los Brix y de mg/100g en las otras variables analíticas medidas.

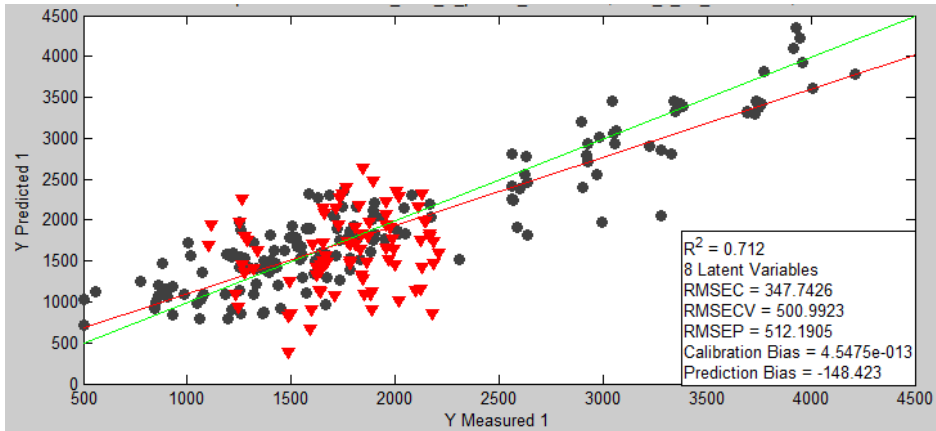


Figura C1.6: Predicción del contenido en glucosa de las muestras del primer ensayo (triángulos rojos) a partir del modelo de calibrado de glucosa (línea verde) desarrollado con las muestras del segundo ensayo (puntos negros).

Algunos autores ya apuntaron en sus estudios la dificultad de aplicar los modelos en ensayos distintos al aconsejar continuas actualizaciones de los mismos al ser utilizados para material vegetal distinto al usado en su desarrollo o para cambios relacionados con la época de cosecha (Guthrie, *et al.* 1998, Golic y Walsh. 2006). Scanlon et al. (Scanlon, *et al.* 1999) utilizaron el modelo desarrollado en un ensayo para la predicción de materia seca y gravedad específica en muestras de patata cultivadas un año después. Aunque los resultados obtenidos fueron buenos, previamente tuvieron que corregir Bias y la desviación, recomendando la necesidad de incluir muestras de prueba en cada nuevo año de cultivo para poder realizar la corrección y obtener modelos de calibrado adecuados.

Pero esta dificultad de aplicación no solo se debe a estos cambios (material vegetal o época de cosecha) sino que otros aspectos como el ambiente de cultivo también contribuyen a ella. Este aspecto se ha comprobado al tratar de predecir la composición en fructosa de las muestras del invernadero en el segundo ensayo a partir del modelo de calibrado de

fructosa desarrollado con las muestras de la parcela de este segundo ensayo (Figura C1.7). Al igual que en el caso anterior, el RMSEP de esta predicción es de 957.99 mg/100g, frente al que tenía con su modelo de calibrado era de 167.35 mg/100g (Tabla C1.1). En esta predicción combinada el Bias de la predicción en este caso es de 798.87 mg/100g, mientras que en su modelo de calibrado era de 42.07 mg/100g (Tabla C1.1). Es decir, al utilizar el modelo del segundo ensayo al aire libre para predecir la composición de los frutos de la réplica del invernadero el RMSEP se multiplica por 5.72 y el Bias por 18.98 alcanzando valores mucho más inaceptables que en el caso anterior.

A una conclusión similar llegaron Peirs et al. (Peirs, *et al.* 2001) al tratar de establecer modelos conjuntos para el contenido en sólidos solubles e índice de Streif (relación entre firmeza, sólidos solubles y almidón) en manzanas cultivadas en campos diferentes. Estos autores establecieron que estas determinaciones parecen ser dependientes del campo de cultivo y que por tanto los modelos de predicción desarrollados no tienen la suficiente precisión. Por el contrario, Clark et al. (Clark, *et al.* 2004) establecieron modelos de calibrado robustos para materia seca, contenido en sólidos solubles y color de la pulpa en muestras de kiwi cultivadas en distintos campos de la Bahía de Plenty, aunque apuntaron la necesidad de nuevas medidas para poder asegurar su fiabilidad entre estaciones distintas.

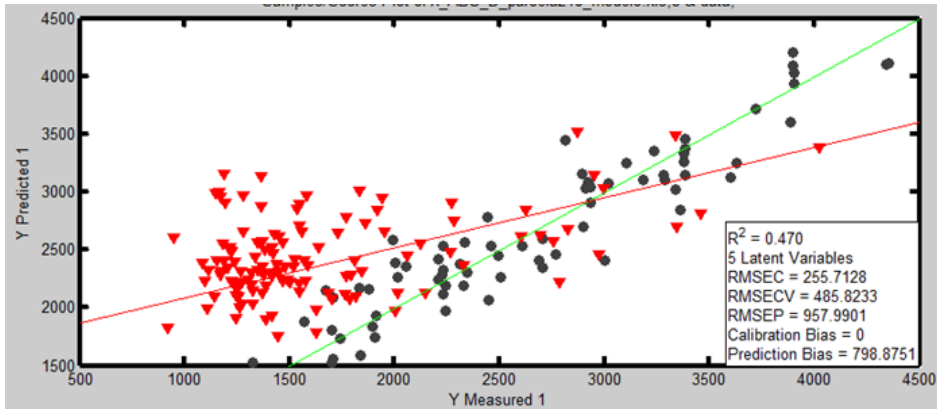


Figura C1.7: Predicción del contenido en fructosa de las muestras del invernadero en el segundo ensayo (triángulos rojos) a partir del modelo de calibrado de fructosa (línea verde) desarrollado con las muestras de la parcela del segundo ensayo (puntos negros).

Teniendo en cuenta los resultados de estos estudios, incluyendo el presente trabajo, parece razonable pensar que la metodología NIR es adecuada para predecir la composición de las muestras pertenecientes al ensayo en el que se ha realizado el modelo, pero no es aconsejable utilizarla para muestras de ensayos distintos. Puesto que el objetivo de la metodología NIR es la predicción de determinadas variables de interés en las muestras analizadas, la necesidad de trabajar con los datos de ensayos por separado no supone ningún inconveniente. Se podría considerar como tal el hecho de tener que desarrollar los modelos de predicción para cada ensayo, pero la necesidad de realizar actualizaciones en los modelos debidas a posibles cambios entre unos ensayos y otros (material vegetal, época de cosecha, etc.) o de volver a realizar los modelos incluyendo las muestras de un nuevo ensayo (no garantizando que los resultados obtenidos sean tan precisos como los de cada modelo por separado) requieren desarrollar igualmente modelos nuevos. Además, el hecho de tener que realizar estos modelos cada vez no parece tan laborioso si se tiene en cuenta que evita analizar en laboratorio

gran cantidad de muestras (por ejemplo, en un ensayo de 1000 plantas sólo haría falta analizar en laboratorio 100-150 plantas, y predecir el resto con los modelos desarrollados para ese ensayo).

4. CONCLUSIONES

1. El uso de la técnica de espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR) permite predecir con unos errores aceptables la composición de sustancias químicas de diversa naturaleza implicadas en la calidad interna del tomate. El hecho de que sea una técnica rápida y no destructiva junto con la posibilidad de predecir la composición de gran número de sustancias (en este caso tres ácidos, dos azúcares y 38 compuestos volátiles) con una simple medida, hacen de ella una técnica muy útil para la preselección de genotipos de tomate, ya que cuando se trabaja con grandes cantidades de muestras es impensable llevarla a cabo por medio de técnicas más precisas.
2. Es necesario realizar calibrados con otros métodos analíticos debido a la distorsión que diversas propiedades físicas de los frutos provocan en los espectros. Esta calibración no es generalizable de unos ensayos a otros, ya que aspectos como diferencias en material vegetal o ambiente de cultivo hacen que al usar estos modelos de unos ensayos a otros los errores de predicción aumenten considerablemente. Por lo tanto, estos modelos de calibrado deben hacerse para cada ensayo. Lo que si es generalizable es la utilización de la metodología desarrollada en este trabajo para la obtención de estos modelos, que permite obtener unos resultados satisfactorios.

5. BIBLIOGRAFÍA

A.O.A.C 1984 Official methods of analysis (15 th ed.).

Beltran, J.; Serrano, E.; López, F. J.; Valcárcel, M.; Roselló, S. 2006 Comparison of two quantitative GC-MS methods for analysis of tomato aroma based on purge-and-trap and on solid-phase microextraction. *Anal Bioanal Chem.*, 385, 1255-1264.

Birth, G. S.; Dull, G. G.; Magee, J. B.; Chan, H. T.; Cavaletto, C. G. 1984 An optimal method for estimating papaya maturity. . *Am. Soc. Hort. Sci* , 109, 62-66.

Buttery, P. G.; Ling, L. C. 1993 Volatile components of tomato fruit and plants parts. Relationships and biogenesis. *Amer. Chem. Soc.* , 525, 23-34.

Carlini, P.; Massantini, R.; Mencarelli, F. 2000 Vis-NIR measurement of soluble solids in cherry and apricot by PLS regression and wavelength selection. *J. Agric. Food Chem.* , 48, 5236-5242.

Cebolla-Cornejo, J. 2005 Recuperación de variedades tradicionales de tomate y pimiento. Caracterización y mejora genética. Universidad Politécnica de Valencia .

Cebolla-Cornejo, J.; Roselló, S.; Beltran, J.; Serrano, E.; Nuez, F. 2006 Análisis de perfiles aromáticos en variedades tradicionales y comerciales de tomate.. *Actas de Horticultura* , 45, 61-62.

Chee, A. A.; Osborne, S.; Mowat, A. D. 1994; *Non-destructive analysis of fruit quality in Fuyu persimmon using Near Infrared Spectroscopy*; En Clark, C. J., Chee, A. A., Osborne, S. and Mowat, A. D., Eds.; HortResearch Client report: p 15.

Chen, J.; Shin, Y.; Shi, S. 1999 Noises analysis od digital ultrasonic nondestructive evaluation system. *Int.J. Pressure Vessels Piping* , 76, 619-630.

- Chu, X. L.; Yaun, H. F.; Lu, W. Z.** 2004 Progress and application of spectral data pretreatment and wavelength selection methods in NIR analytical technique. *Prog. Chem* , 16, 528-542.
- Chuma, Y.; Kawano, S.; Kyam, S.** 1976 Optical properties of fruits to serve the automatic selection in the packing house line (2) Light reflectance of Satsuma orange. *J. Japan Soc. Agr. Machinery* , 37, 587-592.
- Clark, C. J.; McGlone, V. A.; Silva, H. N. d.; Manning, M. A.; Burdon, J.; Mowat, A. D.** 2004 Prediction of storage disorders of kiwifruit (*Actinidia chinensis*) based on visible-NIR spectral characteristics at harvest. *Postharvest Biology & Technology* , 32, 147-158.
- Geladi, P.; Kowalski, B. R.** 1986 Partial least-squares regression: a tutorial. *Analytica Chimica Acta* , 185, 1-17.
- Golic, M.; Walsh, K. B.** 2006 Robustness of calibration models based on near infrared spectroscopy for the in-line grading of stonefruit for total soluble solids content. *Anal. Chim. Acta* , 555, 286-291.
- Guthrie, J.; Wedding, B.; Walsh, K.** 1998 Robustness of NIR calibrations for soluble solids in intact melon and pineapple. *J. Near Infrared Spectrosc.* , 6, 259-265.
- Hahn, F.** 2002 Multi-spectral prediction of unripe tomatoes. *Biosynthesis engineering* , 81, 145-147.
- Hai-qing, T.; Yi-bin, Y.; Hui-shan, L.; Xia-ping, F.; Hai-yan, Y.** 2007 Measurement of soluble solids content in watermelon by Vis/NIR diffuse transmittance technique. *Journal of Zhejiang University - Science B* , 8, 105-110.
- Hernandez, A.; Yong, H.; Garcia, A.** 2006 Non-destructive measurement of acidity, soluble solids and firmness of Satsuma mandarin using Vis/NIR-spectroscopy techniques. *J. Food Eng.* , 77, 313-319.
- Höskuldsson, A.** In *Prediction Methods in Science and Technology*, Thor Publishing: Denmark, 1996; .

-
- Jackson, J. E.; Mudholkar, G. S.** 1979 Control procedures for residuals associated with Principal Component Analysis. *Technometrics* , 47, 64-79.
- Jordan, R. B.; Osborne, S. D.; Kunnemeyer, R.; Seelye, R. J.** 1997; *Harvest time prediction of eating time properties of Kiwifruit using NIR transmission.Proc.Conference "sensors for nondestructive testing";* Orlando, p 18.
- Kawano, S.; Sato, T.; Iwamoto, M.** 1992; *Determination of sugars in satsuma orange using NIR transmittance;* En Murray, I., Cowe , A., Eds.; Weinheim, NY, p 387.
- Lorber, A.; Wangen, L. E.; Kowalski, B. R.** 1987 A Theoretical Foundation for the PLS Algorithm. *J. Chemometrics* , 1.
- Lu, R.; Guyer, D. E.; Beaudry, R. M.** 2000 Determination of firmness and sugar content of apples using near-infrared diffuse reflectance. *J. Texture Stud.* , 31, 615-630.
- Martens, H.; Naes, T.** In *Multivariate Calibration*, John Wiley and Sons: New York, 1989; .
- Maul, F.; Sargent, S. A.; Balaban, M. O.; Baldwin, E. A.; Huber, D. J.; Sims, C. A.** 1998 Aroma volatile profiles from ripe tomatoes are influenced by physiological maturity at harvest: An application for electronic nose technology. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* , 123, 1094-1101.
- McClure, W. F.; Rohrbarsch, R. P.; Kushman, L. J.; Ballinger, W. E.** 1975 Design of high-speed fiber optic blueberry sorter. *Trans. Amer. Soc. Hort. Sci.* , 1, 445-490.
- McGlone, V. A.; Kawano, S.** 1998 Firmness, dry-matter and soluble-solids assessment of postharvest kiwifruit by NIR spectroscopy. *Postharvest Biology & Technology* , 13, 131-141.
- Miyamoto, K.; Yoshinobu, K.** 1995 Non-destructive determinations of sugar content in Satsuma mandarin fruit by Near Infrared Transmittance Spectroscopy. *J. Near Infrared Spectroscopy* , 3, 227-237.

- Osborne, B. G.; Fearn, T.; Hindle, P. H.** 1993 Practical NIR Spectroscopy, 49-78.
- Osborne, S. D.; Jordan, R. B.; Künnemeyer, R.** 1996 Using Near-Infrared (NIR) light to estimate the soluble solids and dry matter content of kiwifruit. *PH'96 International Postharvest Science Conference* .
- Peirs, A.; Lammertyn, J.; Ooms, K.; Nicolai, B. M.** 2001 Prediction of the optimal picking date of different apple cultivars by means of VIS/NIR-spectroscopy. *Postharvest Biology and Technology* , 21, 189-199.
- Peirs, A.; Desmet, M.; Nicolai, B.; Buysens, S.** 2003 Relations between sensory analysis, instrumental quality and NIR measurements of tomato quality, 471-477.
- 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, 1101-1106.
- Saito, T.; Kotobuki, K.; Sato, Y.; Abe, K.** 1993 Near Infrared analysis of sugar and starch content in chesnut. *Proc. of the Int. Congress on Chesnut* , 20-23, 437-440.
- Scanlon, M. G.; Pritchard, M. K.; Adam, L. R.** 1999 Quality evaluation of processing potatoes by near infrared reflectance. *J Sci Food Agric* , 79, 763-771.
- Schmilovitch, Z.; Mizrach, A.; Hoffman, A.; Egozi, H.; Fuchs, Y.** 2000 Determination of mango physiological indices by near-infrared spectrometry. *Postharvest Biology and Technology* , 19, 245-252.
- 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' (*Lycopersicum esculentum*) quality characteristics. *Journal of Food Engineering* , 81, 672-678.
- Slaughter, D. C.; Barrett, D.; Boersig, M.** 1996 Nondestructive determination of soluble solids in tomatoes using near infrared spectroscopy. *J. Food Sci.* , 61, 695-697.

- Suparlan; Kazuhiko** 2004 Application of visible and near infrared spectroscopy for non-destructive analysis of tomato quality. *Jurnal Enjiniring Pertain* , II, 35-42.
- Tandon, K. S.; Baldwin, E. A.; Shewfelt, R. L.** 2000 Aroma perception of individual volatile compounds in fresh tomatoes (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) as affected by the medium of evaluation. *Postharvest Biology and Technology* , 20, 261-268.
- Temma, T.; Hanamatsu, K.; Shinoki, F.** 2002 Measuring the sugar content of apples and apple juice by Near Infrared Spectroscopy. *Optical Review* , 9, 40-44.
- Ventura, M.; De Jager, A.** 1997 Determinazione “non-distruttiva” dei solidi solubili mediante riflettanza “NIR”: esperienze sulle mele. *Frutticoltura* , 12, 67-70.
- Walsh, K. B.; Golic, M.; Greensill, C. V.** 2004 Sorting of fruit using near infrared spectroscopy: application to a range of fruit and vegetables for soluble solids and dry matter content. *J. Near Infrared Spectrosc.* , 12, 141-148.
- Wise, B. M.; Gallagher, N. B.; Bro, R.; Shaver, J. M.; Windig, W.; Koch, R. S.** 2006 PLS_Toolbox Version 4 for use with MATLAB™. *Eigenvector Research, Inc.* .
- Yilmaz, E.** 2001 The chemistry of fresh tomato flavor. *Turk J Agric For* , 25, 149-155.
- Zude, M.; Herold, B.; Roger, J. M.; BellonMaurel, V.; Landahl, S.** 2006 Non-destructive tests on the prediction of apple fruit flesh firmness and soluble solids content on tree and in shelf life. *J. Food Eng.* , 77, 254-260.

Capítulo 2
Evaluación de características
aromáticas de frutos de
tomate mediante una nariz
electrónica: corrección de
efectos de deriva.

RESUMEN

La nariz electrónica es una alternativa muy prometedora para la determinación de perfiles aromáticos en frutos de tomates, permitiendo su identificación y clasificación de forma rápida y sencilla. El principal problema en el uso rutinario de esta técnica es la presencia de deriva tanto a corto (dentro de una secuencia de trabajo) como a largo plazo (entre secuencias de trabajo distintas) en los sensores, distorsionando las evaluaciones realizadas. Por ello, para aprovechar todo el potencial que puede proporcionar su uso es necesario corregir la deriva a corto plazo y estandarizar las muestras analizadas en distintas secuencias de trabajo. En este estudio se han evaluado dos técnicas distintas para la corrección de deriva a corto plazo. Una de ellas está basada en la presencia de un patrón sintético (que simula la composición de una muestra real de tomate) que permita obtener coeficientes de corrección que se aplicarán a las muestras de tomate y otra basada en corrección de componentes por medio de una regresión parcial mínimo cuadrática (PLS). Para corregir la deriva a largo plazo se estudia el uso de un método basado en la técnica Piece-wise Direct Standardization (PDS) que trabaja estandarizando una matriz de datos a partir de otra matriz tomada como referencia, en este caso la matriz correspondiente al primer día de análisis. Los resultados indican que para muestras de tomate y en las condiciones de este estudio, el método basado en el uso de patrón sintético no consigue corregir la deriva, mientras que la corrección de componentes basada en PLS muestra unos resultados muy satisfactorios. En cuanto a la deriva a largo plazo, la técnica PDS permite eliminar las diferencias significativas entre repeticiones de una misma muestra analizadas en días de trabajo distintos. Las muestras corregidas con esta metodología muestran mejoras en la clasificación.

1. INTRODUCCIÓN

El sabor, compuesto por el gusto y el aroma, es un atributo de calidad muy importante. La queja de los consumidores por la falta de características de sabor en los tomates existentes en el mercado ha hecho que determinados atributos del tomate, como el aroma, estén siendo investigados cada vez más. El problema es que las principales técnicas existentes hoy en día para determinar el aroma, paneles sensoriales y técnicas instrumentales como cromatografía de gases-espectroscopía de masas (GC-MS), presentan serios inconvenientes para su aplicación rutinaria en mejora. Del análisis sensorial se desprende la información más cercana a la percepción del hombre, pero se trata de una técnica muy subjetiva y de alto coste que requiere un importante entrenamiento de los paneles de cata y en la que los resultados no son reproducibles ni estandarizables. Además, la capacidad sensitiva de los catadores se ve limitada con el tiempo debido a la saturación de los órganos receptores (Berna, *et al.* 2004).

En cuanto a las técnicas analíticas, utilizadas de forma rutinaria en laboratorios de evaluación de la calidad, son caras, consumen mucho tiempo y además requieren personal especializado para su funcionamiento. La nariz electrónica supone una alternativa muy interesante para la determinación de aromas en frutos de tomate. De hecho, en el campo de la horticultura, ya ha sido utilizada con resultados interesantes en la evaluación del aroma de melocotones y nectarinas (Di Natale, *et al.* 2001b, Young, *et al.* 1999), manzanas (Saevels, *et al.* 2004, Young, *et al.* 1999, Brezmes, *et al.* 2001, Di

Natale, *et al.* 2001a), bananas (Llobet, *et al.* 1999), mandarinas (Hernández Gómez, *et al.* 2007, Hernández Gómez, *et al.* 2006b), peras (Oshita, *et al.* 2000) e incluso tomate (Di Natale, *et al.* 1998, Berna, *et al.* 2005, Berna, *et al.* 2005, Maul, *et al.* 1998, Hernández Gómez, *et al.* 2006a). Este instrumento, diseñado para imitar el sistema olfativo humano, consiste en un conjunto de sensores químicos que reaccionan de distinta forma ante la presencia de aromas. La respuesta dada por cada uno de estos sensores a los distintos compuestos volátiles presentes en la muestra conformarán una huella característica del aroma de la muestra analizada. De esta forma, el resultado obtenido está más cercano al que proporciona un panel sensorial que al que se obtiene con técnicas analíticas, ya que éstas últimas analizan cada uno de los compuestos por separado con precisión pero se pierde la información relativa a la “percepción” del conjunto, aspecto que si que se mantiene en las “huellas electrónicas”. Además, la implementación del uso de una nariz electrónica comparada con el uso de la cromatografía de gases-masas, ofrece importantes ventajas, tales como el menor costo del equipo y de los análisis de muestras, la mayor rapidez de análisis, la sencillez en el manejo y, por tanto, la menor necesidad de especialización del personal y, sobre todo, la posibilidad de ir elaborando librerías que recojan las evaluaciones realizadas durante largos periodos de trabajo, conformando una base de datos que permite una mejor comparación y clasificación de los nuevos genotipos a evaluar.

Sin embargo, a pesar de estas posibilidades tan prometedoras, en los últimos años se está cuestionando la utilidad real del uso de los olfatómetros electrónicos. El motivo es que a la hora de utilizar este tipo de técnica de forma rutinaria en muchos casos se observan efectos de deriva en los sensores que distorsionan las evaluaciones realizadas (Brezmes, *et al.* 2001, Mielle y Marquis. 1999, Frank, *et al.* 2000). La deriva se define como un

cambio temporal en la respuesta del sensor a pesar de que éste trabaje en condiciones físicas y químicas constantes. La presencia de la deriva se debe a procesos dinámicos desconocidos en el sistema de sensores, como contaminación o envejecimiento de los sensores a medida que éstos van trabajando o cambios ambientales, como variaciones de temperatura, humedad o presión (Holmberg, *et al.* 1997). Si se representara geoméricamente los puntos de medida correspondientes a una misma muestra, estos deberían coincidir en un mismo punto del espacio de datos. Sin embargo, cuando existe deriva se ve una distorsión en la representación de esos puntos en el espacio de datos, en forma de distribuciones lineales o exponenciales (ascendentes o descendentes) de los datos e incluso saltos de algunos de los valores en el conjunto de datos (Holmberg y Artusson. 2003). Esta variación se puede observar tanto en los datos obtenidos dentro de una misma secuencia de trabajo como en los obtenidos para secuencias de trabajo distintas (Haugen, *et al.* 2000). La presencia de deriva en una secuencia dificulta la clasificación de muestras. En ocasiones hace que repeticiones de una misma muestra pueden llegar a considerarse muestras distintas o incluirse en el grupo de datos correspondientes a otra muestra. Además, la deriva entre secuencias de trabajo complicará la identificación de muestras de características similares (en ocasiones se clasifican como bastante distintas) o, al contrario, la separación de muestras con diferencias marcadas (en ocasiones se clasifican como próximas o incluso con algún solape). Por lo tanto, para poder trabajar correctamente y explotar adecuadamente todos los beneficios posibles de una nariz electrónica es necesario realizar la corrección de la deriva de los sensores existente en una secuencia de trabajo así como la estandarización entre diferentes días de trabajo.

La corrección de la deriva del sensor ha sido abordada por medio de distintos métodos. En algunos estudios se ha tratado de eliminar la deriva utilizando gases de referencia cuya medida y corrección ha proporcionado unos coeficientes de corrección con los que corregir las muestras analizadas (Haugen, *et al.* 2000, Fryder, *et al.* 1995, Artursson, *et al.* 2000, Goodacre y Kell. 1996). En este tipo de métodos se asume que existe una fuerte correlación entre la deriva en la respuesta de los sensores para el gas de referencia y para las muestras. Esto no siempre ocurre, puesto que en el caso de matrices, la deriva de los sensores frente al gas de referencia puede comportarse de manera muy distinta a como lo hace en el caso de las muestras reales. No obstante, si en lugar de utilizar como gases de referencia varios patrones de gases simples se utilizara un patrón sintético de composición similar al del producto a analizar podría ser una aproximación útil. Cuando es difícil encontrar un gas de referencia adecuado a las muestras en estudio, algunos autores han utilizado un pseudo-gas de referencia (Salit y Turk. 1998), cuyo principio es el mismo que en el caso anterior pero se utilizan réplicas de una muestra para generar el gas de referencia. Esto puede hacerse si esas muestras son estables a largo plazo, es decir, si no se degradan con el tiempo, y si todas las réplicas a emplear para generar el gas de referencia son muy homogéneas entre sí. Aún así, este método presenta el inconveniente de tener que disponer de grandes cantidades almacenadas de esa muestra, lo que no es muy realista en el caso de trabajar con frutas y hortalizas, puesto que no siempre se puede obtener tanta cantidad de muestra como se desea y cuando se renueve el stock de muestra patrón, aunque se utilice el mismo genotipo, la influencia del ambiente hará que haya diferencias bastante apreciables en su composición con respecto al lote anterior, por lo que se distorsiona la comparación con análisis anteriores. Además, en este tipo de muestras es muy difícil conseguir alícuotas

totalmente homogéneas, lo que provocaría la existencia de variaciones en el análisis de estos pseudo-gases que no sean debidas únicamente a la deriva. En otros casos se ha tratado de corregir la deriva obteniendo modelos que permitieran explicar el comportamiento del sensor basándose en las reacciones que ocurren en él (Jamash, *et al.* 1998, Pearce y Gardner. 1998) o estudiando cómo se comporta el sensor en determinadas condiciones de trabajo y asumiendo que siempre se comportará igual si está expuesto al mismo ambiente (Pearce y Gardner. 1998). Pero estos modelos son muy difíciles de conseguir para sensores de gases puesto que, si bien en un sistema completamente controlado con muy pocos gases quizá se llegara a conocer las reacciones que podrían ocurrir en los sensores o a establecer su comportamiento en unas condiciones determinadas, en aplicaciones reales el sistema no está tan controlado y además hay gran cantidad de gases y combinaciones entre ellos. Esto hace que sea muy difícil poder considerar este comportamiento como repetible y, por tanto, modelizar la deriva a través de él con el fin de aplicarla a otros casos. Por otra parte, el hecho de que la deriva del sensor está correlacionada entre los distintos sensores, ha hecho que algunos autores (Wilson y DeWeerth. 1995, Bednarczyk y DeWeerth. 1995, Holmberg, *et al.* 1996) se planteen técnicas de clasificación basadas en el reconocimiento de patrón de variación. Estas técnicas (basadas fundamentalmente en el uso de redes neuronales) asumen que cada grupo evaluado en una clasificación tiene un patrón típico de variación, que está definido por la respuesta de los sensores y que se conserva a lo largo del tiempo. Esta conservación viene dada por la relación relativa entre los sensores más que por la respuesta del sensor en sí misma. Si esta relación relativa permaneciera constante a lo largo del tiempo una simple normalización sería suficiente. No obstante, el análisis con muestras reales no es tan simple, ya que la presencia de ruido y el hecho de que unos

sensores tengan más deriva que otros, hacen que el patrón típico de variación no siempre se conserve. Para evitar esto, se ha propuesto la utilización de modelos autoadaptativos (Vlachos, *et al.* 1997, Davide, *et al.* 1994, Gardner, *et al.* 1996), en los que los modelos de reconocimiento del patrón de variación se actualizan con la entrada de nuevos datos. El planteamiento de estas técnicas ofrece una alternativa interesante en la corrección de la deriva, ya que tratan de encontrar información subyacente que permita la identificación y clasificación de las muestras evitando los efectos de dispersión que la deriva introduce en la señal electrónica de una secuencia de trabajo. Sin embargo, esta técnica sigue compartiendo con la anterior el problema de no ser capaz de diferenciar entre deriva y cambios de la muestra con el tiempo, por lo que pueden cometer errores cuando tanto la muestra como el sistema de sensores sufre cambios a lo largo del tiempo.

Otro tipo de modelos autoadaptativos conocidos como “corrección de componentes” (CC) están basados en los métodos de corrección ortogonal de señal (OSC) (Wold, *et al.* 1998) cuyo fundamento consiste en asumir que la deriva no se distribuye aleatoriamente, sino que se recoge preferentemente en unas pocas direcciones del espacio de medida y que, por la propia definición de deriva, estas están correlacionadas con el tiempo. Basándose en este planteamiento, una posible estrategia de supresión de deriva sería la de utilizar la regresión parcial mínimo cuadrática (PLS) para encontrar esas direcciones del espacio de medida que están correlacionadas con el tiempo y que recogen los efectos de deriva para eliminarlos. Artursson *et al.* (Artursson, *et al.* 2000) han aplicado con éxito este planteamiento a la eliminación de efectos de deriva en secuencias repetidas de gases simples de referencia. No obstante, aunque se trata de una estrategia de corrección de deriva prometedora falta por comprobar con muestras reales más complejas y en secuencias de trabajo rutinario la utilidad de este planteamiento.

De lo expuesto anteriormente se desprende que, aunque el uso de olfatómetros electrónicos comerciales para la evaluación, clasificación y selección en programas de mejora de tomate de genotipos con características de calidad organoléptica sobresalientes tiene un enorme potencial, es necesario en primer lugar desarrollar una metodología de uso que los haga eficaces y resuelva los problemas de deriva que se plantean. Por ello, el objetivo general del presente trabajo es establecer una metodología de corrección de la deriva de los sensores durante un día de trabajo así como lograr la estandarización entre muestras analizadas en distintas secuencias que permita desarrollar librerías de muestras que vayan ampliándose con el tiempo de forma que se mejore la identificación y clasificación de muestras de tomate analizadas.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Diseño del ensayo

Se estudiará en primer lugar el proceso de deriva de los sensores del olfatómetro electrónico comercial FOX 4000 (Alpha MOS, Toulouse, France) al evaluar muestras de tomate de forma rutinaria. Una vez establecida la magnitud de esta deriva en secuencias diarias de trabajo (corto plazo) y entre distintos días de trabajo (largo plazo) se evaluarán diferentes estrategias de corrección de la misma.

Para la corrección de la deriva dentro de una misma secuencia de trabajo (corto plazo) se ha decidido probar dos estrategias distintas. La primera es una modificación del método inicialmente desarrollado por Salit

y Turk (1998) (Salit y Turk. 1998). En nuestro caso se basa en el uso de un “patrón sintético” de referencia con una composición lo más similar posible (en sólidos solubles y en compuestos volátiles) a la de los frutos de tomate. Se evaluarán varias muestras de este patrón sintético a lo largo del día, se determinará la evolución de la deriva de los sensores representada por la desviación respecto de una respuesta constante, se calculará la corrección necesaria para que la “huella electrónica” de las diferentes repeticiones del patrón sintético resulte constante y finalmente se comprobará la utilidad de extrapolar esta corrección a muestras reales de tomate. La segunda estrategia es una adaptación aplicada a muestras reales de tomate de la estrategia de corrección de deriva por componentes (CC) propuesta por Artursson et al (Artursson, *et al.* 2000). En esta estrategia usamos el patrón sintético como una muestra más, para comprobar si la metodología de corrección de deriva permite obtener resultados similares en patrones y en muestras reales y si en estas últimas resulta eficaz. Como se ha comentado anteriormente esta estrategia está basada en el uso de la regresión PLS para, partiendo de la matriz de señales electrónicas proporcionadas por los sensores, encontrar variables latentes que recojan los efectos de deriva ocurridos a lo largo de la secuencia para posteriormente eliminar estas variables latentes de deriva y obtener así una matriz de “huellas electrónicas” limpias de deriva en toda la secuencia de trabajo.

Para la corrección de la deriva entre diferentes días de trabajo (largo plazo) se ha decidido utilizar un método multivariante de transferencia de calibrados (Piecewise direct standarization o PSD) (Wang, *et al.* 1991, Wang, *et al.* 1992, Wang, *et al.* 1994, Bouveresse, *et al.* 1996, Wise, *et al.* 2006) aplicado a estandarizar la respuesta de un mismo equipo en dos momentos de tiempo diferentes.

Por tanto, para poder llevar a cabo los objetivos específicos indicados se ha planteado el siguiente diseño de ensayo. En cada secuencia de trabajo se evaluará el patrón sintético y siete cultivares de tomate. De cada cultivar se analizarán siete muestras, mientras que del patrón sintético se utilizarán nueve. Aunque en primer lugar nos interesa estudiar la evolución a lo largo de la secuencia del patrón sintético es mejor intercalar este con muestras reales para someter a los sensores a condiciones de evaluación lo más parecidas posible a las que se encontrará normalmente. Para aplicar la estrategia de corrección basada en la corrección de la deriva del patrón sintético, la secuencia de trabajo debe de empezar y acabar analizando muestras del patrón sintético, además el resto de muestras de éste deben de analizarse a intervalos de tiempo fijos y equidistantes en la secuencia de trabajo (Haugen, *et al.* 2000, Salit y Turk. 1998). Por ello, cada secuencia de trabajo empieza y finaliza con un vial de patrón sintético y está dividida en siete segmentos en cada uno de los cuales se dispone una de las repeticiones de cada cultivar a analizar. En cada segmento de la secuencia, la disposición de las muestras de los cultivares de tomate se ha realizado completamente al azar (para evitar que los resultados se vieran sesgados por condiciones externas al análisis). El análisis de la secuencia de trabajo descrita se ha repetido tres días, para disponer de resultados de contraste y para poder realizar las estandarizaciones entre días distintos (corrección de deriva a largo plazo).

2.2 Patrón sintético y material vegetal

La forma de obtener una muestra de referencia muy similar al tomate pero con mayor estabilidad y reproducibilidad es elaborar un patrón sintético que simule la composición media del fruto de tomate. En este caso, la

Capítulo 2

composición del patrón sintético de referencia (Tabla C2.1) está basada en las concentraciones de sólidos solubles dadas por Salles et al. (2003) para zumo de tomate (Salles, *et al.* 2003) y un valor promedio de las concentraciones de compuestos volátiles obtenidas tras el análisis de cultivares de tomate con perfiles aromáticos diversos (Beltrán, *et al.* 2006).

Tabla C2.1: Composición del patrón sintético de tomate utilizado en los ensayos.

Sólidos solubles		Cantidad (mg/L)	Volátiles		Cantidad (ng/mL)
1	Ac. cítrico (H ₂ O)	5622	30	acetato de E-2-hexenilo	0,7
2	Ac. málico	4370	31	3-metiltiopropional	1,116
3	Glucosa	21700	32	terpineol (alfa+beta-gamma)	0,556
4	Fructosa	22000	33	E-2-hexenol	1,1
5	UMP-Na (H ₂ O)	34	34	1-hexanol	2,016
6	AMP-Na (H ₂ O)	64	35	3-carene	2,112
7	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	58	36	acetato de 3-metilbutilo	2,04
8	K ₂ HPO ₄ (3H ₂ O)	1909	37	alfa-pinene	1,98

Tabla C2.1 Cont.: Composición del patrón sintético de tomate utilizado en los ensayos.

Sólidos solubles		Cantidad (mg/L)	Volátiles		Cantidad (ng/mL)
9	CaCl ₂ ·2H ₂ O	33	38	gamma-terpinene	2,076
10	MgCl ₂ ·6H ₂ O	789	39	2-carene	7,2
11	KOH	9,1	40	linalool	6,6
12	Ac. Aspártico	419	41	fenilacetaldehído	9,2
13	Treonina	153	42	2-feniletanol	12,04
14	Serina	148	43	6-metil-5-hepten-2-ol	13,64
15	Ac. glutámico	1370	44	beta-ionona	13,16
16	Glutamina	1280	45	eugenol	13,92
17	Glicina	18	46	nonanal	11,12
18	Alanina	100	47	2-isobutiltiazol	26,4
19	Valina	40	48	E-2-heptenal	24,96
20	Metionina	110	49	salicilato de metilo	892
21	Cisteina	18	50	guaiacol	480
22	Isoleucina	70	51	E-2-hexenal	702
23	Leucina	65	52	6-metil-5-hepten-2-ona	590
24	Tirosina	38	53	hexanal	800
25	Fenilalanina	186	54	Z-3-hexenal	824
26	Ac. gamma-aminobutírico	1190	55	E-2-octenal	102

Tabla C2.1 Cont.: Composición del patrón sintético de tomate utilizado en los ensayos.

Sólidos solubles		Cantidad (mg/L)	Volátiles		Cantidad (ng/mL)
27	Lisina	92	56	citral (Z+E)	170,4
28	Histidina	165	57	R-limonene	98
29	Arginina	89	58	Z-3-hexen-1-ol	216,8
			59	geranylacetone	114,8

Como muestras reales de tomate para reproducir las condiciones normales de trabajo se han analizado frutos de siete cultivares de tomate (*Solanum lycopersicon L.*) cultivados al aire libre en las instalaciones de la Universitat Jaume I de Castellón. La elección del material vegetal se ha hecho de forma que existan frutos con características organolépticas variadas: dos híbridos comerciales (Zayno RZ de Rijk Zwaan y Caramba de De Ruiter) utilizados como referenciales; dos variedades locales, una de ellas de tomate para ensalada (UJI11) y otra de tomate de colgar (UJI23) y tres variedades tradicionales, una de tipo morado (BGV005477), otra de tipo Muchamiel (BGV005651) y otra de frutos amarillos (BGV005718), cedidas por el banco de germoplasma de Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana de la Universidad Politécnica de Valencia. Los cultivares de ensalada son los que muestran mayores semejanzas entre ellos, mientras que el tomate de colgar, el cultivar de tipo Muchamiel, el morado y el amarillo de Ademuz muestran bastantes diferencias entre sí y con el resto de cultivares. El muestreo se realizó siguiendo los criterios explicados en el capítulo anterior (ver epígrafe 2.1). Se cosecharon cuatro frutos de cada cultivar en estado completamente maduro y posteriormente fueron

procesados en el laboratorio (triturado y homogeneización de las muestras), siendo almacenados a -80°C hasta su posterior análisis.

2.3 Equipo y metodología de análisis del perfil aromático

Se ha utilizado la nariz electrónica FOX 4000 (Alpha MOS, Toulouse, France). Este sistema consta de 18 sensores de gas de óxidos metálicos semiconductores (MOS, *Metal Oxide Semiconductors*) distribuidos en tres cámaras, un sistema de autoinyección (CombiPAL HS100, CTC Analytics, Zwingen, Switzerland) y un software (AlphaSoft v9) para el control y procesado inicial de datos. La respuesta dada por los sensores de tipo MOS es una variación de resistencia debida a la reacción que causan las especies químicas de la muestra en la superficie de la capa activa del sensor. En esas curvas (Figura C2.1) puede apreciarse un aumento brusco de señal hasta alcanzar un punto máximo, cuyo tiempo de aparición depende de cada sensor, y un descenso menos pronunciado hasta que se estabiliza la señal. En este estudio se va a trabajar con la variación de resistencia normalizada en el punto de señal máxima (R_{norm}). Este valor viene dado por la ecuación:

$$\frac{R_i - R_{max}}{R_i}$$

donde R_i es la resistencia a tiempo cero y R_{max} es la resistencia alcanzada por el sensor en el punto de máxima señal (este punto se alcanza a distinto tiempo, dependiendo de cada sensor)

Esta forma de cuantificar la respuesta es utilizada con frecuencia para los sensores de tipo MOS (Holmberg y Artusson. 2003, Skov y Bro. 2005, Maricou, *et al.* 1998) y es la recomendada por el fabricante del equipo.

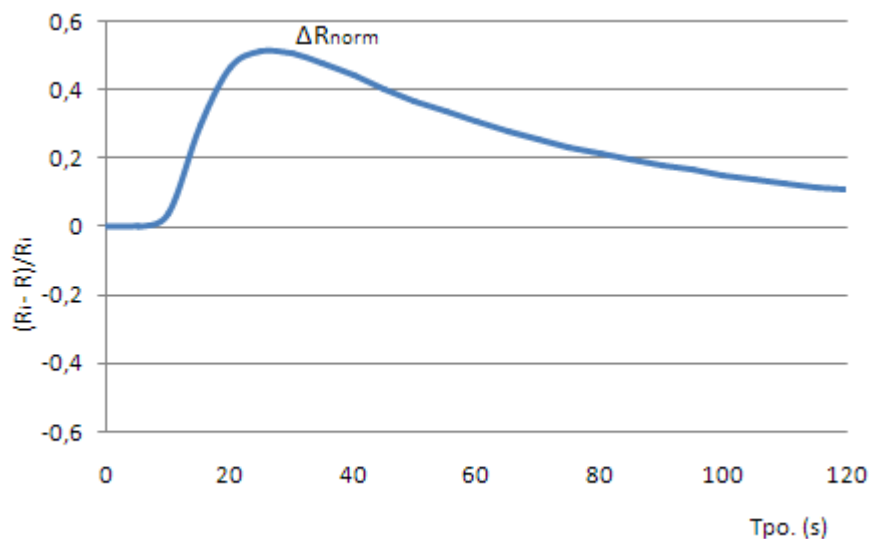


Figura C2.1: Respuesta normalizada para el sensor PA/2 ante una muestra de tomate. En el gráfico aparece indicado el valor correspondiente a la respuesta máxima normalizada del sensor (ΔR_{norm})

Algunos de los parámetros del análisis, los relacionados con aspectos generales de funcionamiento del equipo, fueron fijados a partir de las recomendaciones de la casa que suministró el equipo, mientras que aquellos que condicionan de forma directa la calidad de respuesta dada por los sensores (los que influyen en la generación del espacio de cabeza) fueron establecidas a partir de pruebas previas basadas en la metodología de análisis de componentes volátiles en frutos de tomate puesta a punto por Beltrán *et al.* (Beltrán, *et al.* 2006). Así, la cantidad de muestra utilizada fue de 2

gramos (2 ml en el caso del patrón sintético), que fueron pesados en viales de 10 ml que se sellaron herméticamente para su análisis. Cada repetición de una misma muestra corresponde a un vial independiente. Para la generación del espacio de cabeza las muestras fueron incubadas a 45°C, inyectándose 2 ml del mismo en las cámaras de sensores para su análisis. La respuesta de los sensores a este espacio de cabeza fue guardada a lo largo de 2 minutos, durante los que se tomaron medidas cada segundo, dejándose a continuación los sensores en reposo durante 18 minutos para la recuperación de la línea base. Entre muestras se hizo pasar aire sintético limpio y sin trazas de humedad durante 2 minutos para eliminar los posibles residuos de la muestra anterior. El flujo del aire fue de 150 ml/min. El único parámetro que no pudo ser establecido de forma concluyente fue el tiempo de incubación, pues el factor limitante a la hora de establecerlo es la presencia de deriva. Por ello, ante la necesidad de fijar un valor de tiempo para que todas las muestras trabajaran en las mismas condiciones, se estableció a partir de las pruebas previas un tiempo de 10 minutos, que sin poder ser confirmado como el mejor de todos los probados ofrecía valores de señal informativos. Una vez corregida la deriva se podrá retomar el estudio para determinar el tiempo de incubación óptimo.

2.4 Análisis de datos

Para la corrección de la deriva a corto plazo basada en la extrapolación de la corrección realizada en el patrón sintético de referencia se va a utilizar una modificación del método inicialmente desarrollado por Salit y Turk (1998) (Salit y Turk. 1998) para la corrección de deriva en un espectrómetro de emisión óptica por plasma acoplado inductivamente (ICP-EOS). El método está basado en la medida periódica de muestras de

referencia que permitan diagnosticar la variación (deriva) en la respuesta de un instrumento. Una vez diagnosticada, se construye un modelo de deriva para esa respuesta que se utiliza para eliminar la parte de la señal debida a la deriva de la señal total medida, utilizando la ecuación:

$$S_{medida}^0 = [\hat{S}_{medida} (1 - \varepsilon_{deriva}(t))] + S_{medida}$$

donde S_{medida}^0 es la señal medida corregida, S_{medida} es la media de todas las repeticiones correspondientes a una muestra, $\varepsilon_{deriva}(t)$ es la función de la deriva y S_{medida} es el valor de medida dado por el instrumento

Se trata de un método univariante por lo que el modelo de deriva se debe construir para cada uno de los sensores por separado. Para la construcción del modelo no se trabaja con el valor de respuesta obtenida directamente del sensor, sino que éste se debe transformar a desviación: se divide el valor de respuesta del sensor entre el valor medio de todas las repeticiones correspondientes a esa muestra. En nuestro caso, al implementar esta metodología, además de cambiar los patrones simples por un patrón sintético complejo también utilizaremos, en lugar del ajuste de una función paramétrica, la regresión no paramétrica (B-spline con suavizado de datos (Systat, 1994)) para ajustar el valor de desviación obtenido con el fin de ganar en precisión a la hora de obtener los valores de esta curva que se emplearán para corregir la señal en un tiempo concreto en cada cultivar. La regresión no paramétrica es una colección de técnicas para el ajuste de funciones de regresión muy utilizado cuando no se tiene conocimiento previo de la relación entre las variables objeto de estudio. Mientras que en los análisis paramétricos se hacen supuestos rígidos sobre la estructura básica de los datos, en la regresión no paramétrica se desarrollan modelos no

fijados que predicen la respuesta sobre el rango de valores de los datos (Servy, *et al.* 2007). Por lo tanto, el hecho de utilizar una regresión no paramétrica hace que sean los propios datos los que definan la tendencia a seguir, sin que ésta sea fijada de antemano, por lo que el ajuste suele ser más preciso que en el caso de utilizar regresión paramétrica. Uno de los aspectos a tener en cuenta para que este método sea efectivo es que la muestra de referencia (patrón sintético) debe comportarse de forma muy similar a como lo hacen las muestras reales, ya que el modelo se va a obtener a partir de estas muestras de referencia para luego ser aplicado a las muestras reales. De ahí la importancia de usar patrón sintético en lugar de un gas o mezcla de gases simples. Una desventaja de este método es precisamente la necesidad de utilizar patrón sintético, ya que resta tiempo al análisis de muestras.

El segundo método de corrección de deriva a corto plazo es un método multivariante en el que no es necesario el uso de patrón sintético, pudiendo emplear menos tiempo en el análisis. Se trata de un método de corrección de componentes mediante regresión PLS basado en la premisa de que la deriva de los sensores (sea del tipo que sea) evoluciona con el tiempo de análisis de la secuencia. Esta estrategia de corrección de componentes realiza una regresión PLS utilizando como variables independientes (X) la matriz de señal electrónica medida en la secuencia de trabajo y como variable dependiente (Y) el tiempo de inicio de análisis de cada muestra de la secuencia. De este modo, la regresión trata de encontrar variables latentes que expliquen la variabilidad de la secuencia de señales electrónicas que es debida única y exclusivamente a la evolución temporal. Como el diseño del ensayo garantiza que todos los cultivares y el patrón sintético se han distribuido a lo largo de toda la secuencia, las variables latentes que explican en mayor medida la variabilidad asociada a la evolución temporal recogerán la deriva que los sensores hayan sufrido a lo largo de esa

secuencia de trabajo. Si se trabaja en un entorno algebraico es posible recuperar esas variables latentes y eliminarlas (eliminando los vectores propios correspondientes en la matriz de “scores” y en la de “loadings”) de modo que se puede reconstruir la matriz de “huellas electrónicas” corregidas (sin deriva):

$$X_{\text{corregida}} = X_{\text{inicial}} - T_k P_k^T$$

Siendo X_{inicial} la matriz de huellas electrónicas medidas en la secuencia de trabajo, T_k la matriz de k vectores propios correspondientes a los “scores” y P_k^T la de los k vectores propios correspondientes a los “loadings” de las variables latentes que recogen la deriva.

Antes de proceder a realizar la regresión PLS y al igual que para el método descrito en la estrategia anterior, es conveniente realizar un pretratamiento de la matriz de señales electrónicas con la misma ecuación propuesta por Salit y Turk (1998) (Salit y Turk. 1998) descrita anteriormente. Por otro lado, el hecho de que la metodología empleada esté basada en regresiones PLS hace que la detección y eliminación de valores anómalos, si los hubiera, sea imprescindible. Este tipo de regresión busca las variables latentes que expliquen la variabilidad de la variable respuesta, por lo que la presencia de puntos anómalos va a influir de forma importante en los modelos y por tanto condicionará los resultados. Esta detección se va a llevar a cabo por medio de los estadísticos T^2 de Hotelling y residuos Q , tal y como se describió en el Capítulo 1 (ver epígrafe 2.4).

Para comprobar la eficacia de estos métodos en la corrección de la deriva se utilizó un criterio numérico: el coeficiente de variación (CV) o desviación estándar relativa (RSD). Este coeficiente ha sido utilizado por

otros autores (Maricou, *et al.* 1998, Kantor, *et al.* 2008) para expresar la repetibilidad de las medidas. El CV o RSD (expresado en porcentaje) se calcula por medio de la ecuación:

$$CV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$$

donde SD es la desviación estándar y \bar{x} es el valor medio de todas las repeticiones pertenecientes a una misma muestra.

Otro criterio para determinar la eficacia de la corrección fue ver como influye la aplicación de cada uno de los métodos de corrección en la clasificación de las muestras de tomate. Esta clasificación se llevó a cabo por medio de un análisis discriminante basado en la regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA). Se trata de un método de clasificación muy preciso que utiliza la regresión PLS para tratar de encontrar modelos que expliquen la variación existente dentro de cada clase y que al mismo tiempo identifiquen direcciones del espacio que discriminen directamente entre clases mostrando también el grado de similitud entre ellas (Wise, *et al.* 2006). Para poder llevar esto a cabo es necesario crear una matriz de variables artificiales (matriz Y) que asuman un valor numérico discreto para describir los miembros de cada clase (variables dummy de clase). La validación de los modelos de clasificación obtenidos se ha hecho por medio de validación cruzada de tipo ventana veneciana (venetian blinds) en el que se seleccionan subgrupos de muestras que darán una idea de cómo se comportaría el modelo con posibles muestras problema. En este caso se ha hecho que cada uno de los subgrupos generados contenga una repetición de los distintos genotipos estudiados. La bondad de la clasificación se determinará por medio del porcentaje de aciertos de cada una de las clases

basándose en los valores de especificidad y sensibilidad. La especificidad estudia la presencia de falsos positivos; es decir, muestras que se consideran pertenecientes a una clase cuando en realidad no pertenecen a ella. La sensibilidad, por contra, es una indicación del número de falsos negativos o muestras que se clasifican como no pertenecientes a una clase a la que si pertenecen. Para poder llevar a cabo estos cálculos de especificidad y sensibilidad es necesario calcular primero un umbral de separación entre una clase determinada (la pertenencia a un determinado cultivar en nuestro caso) y el resto. Este umbral se estima utilizando el Teorema de Bayes con los datos disponibles. El cálculo del umbral Bayesiano asume que los valores de clasificación predichos siguen una distribución similar a la que se observará en futuras muestras y que esta distribución para una clase es aproximadamente normal. Usando estas distribuciones estimadas, el umbral se selecciona en el punto en el que las dos distribuciones estimadas se cruzan; este es el valor de Y en el que el número de falsos positivos y falsos negativos se minimizan para futuras predicciones. Para que el umbral calculado sea más robusto es conveniente realizar estos cálculos con los datos del modelo y con los de validación cruzada con lo que se verifica más acertadamente el funcionamiento futuro del umbral seleccionado. La sensibilidad y especificidad se obtiene para cada una de las clases tanto para los resultados del calibrado (auto-predicción) como para los de la validación cruzada. El porcentaje de aciertos de cada clase se determina como una media ponderada de sus valores de especificidad y sensibilidad.

Para corregir la deriva a largo plazo, se ha procedido a realizar la estandarización de las muestras analizadas en secuencias de trabajo distintas. Con este propósito se aplicó un método multivariante basado en la técnica Piece-wise Direct Standardization (PDS). PDS es un método de transferencia de calibrado que permite predecir la respuesta de un instrumento basándose

en la respuesta dada por otro tomado como referencia o las respuestas dadas por un mismo instrumento pero en un momento temporal distinto (Wang, *et al.* 1991, Wang, *et al.* 1992, Wang, *et al.* 1994, Bouveresse, *et al.* 1996, Wise, *et al.* 2006). Normalmente, las transformaciones de estandarización se desarrollan usando un pequeño número de muestras que son analizadas en ambos instrumentos. El objetivo es crear un modelo de compensación establecido entre esas muestras comunes que se aplica posteriormente al resto de muestras para eliminar o reducir la variación causada por el cambio de instrumento. En este caso, esta forma de trabajar se va a aplicar a muestras que son analizadas en un mismo instrumento pero en tiempos distintos; es decir, en distintas secuencias. Para ello se va a necesitar algunas muestras que sean iguales en todas las secuencias. En este ensayo, al trabajar con tres repeticiones de la misma secuencia de trabajo se dispone de estas muestras repetidas que se utilizarán para generar el modelo.

La eficacia del proceso de estandarización de secuencias distintas se comprobó de dos formas. En primer lugar, tras aplicar la estandarización se comprobó si existían diferencias significativas entre las repeticiones de cada día para cada cultivar y para el patrón sintético. Para ello, se utilizó un análisis multivariante de la varianza (MANOVA). El criterio utilizado en este análisis para evaluar la significación fue el test de Roy ya que éste se considera el más apropiado cuando las variables respuesta están muy correlacionadas entre sí (Huberty y Olejnik. 2006). Posteriormente, también se comprobó la utilidad de la estandarización entre secuencias utilizando el método de clasificación PLS-DA descrito anteriormente al conjunto de las huellas electrónicas obtenidas en los tres días de trabajo limpias de deriva y estandarizadas.

Todos los ajustes de regresión no paramétrica, así como las interpolaciones de puntos de esta curva para la corrección de la señal de los

cultivares empleados en la primera estrategia de corrección de deriva se han realizado con el programa TableCurve 2D v5.01 (Systat Software, Erkrath, Alemania). Los cálculos de regresión PLS empleados en la segunda estrategia de corrección de deriva a corto plazo, así como las clasificaciones PLS-DA y la estandarización PDS entre secuencias de trabajo han sido realizados con la herramienta PLS_Toolbox v 5.0 (Eigenvector Research Inc, Wenatchee, WA, USA) para Matlab v 7.6.0 (Mathworks Inc, Natick, MA, USA). La eliminación de variables latentes que recogen la deriva para corregir la matriz de huellas electrónicas iniciales se ha realizado en Matlab v 7.6.0 (Mathworks Inc, Natick, MA, USA). El MANOVA para la comprobación de que la estandarización entre secuencias es efectiva se ha realizado con el programa S-Plus 8.0 Professional (Insightful Corp., Seattle, USA).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para disponer de una idea general de cómo afecta el proceso de deriva que los sensores del equipo comercial utilizado sufren al analizar una secuencia de trabajo diaria con varias muestras de diferentes cultivares de tomate y un patrón sintético se ha calculado el rango de variación promedio para el valor absoluto del CV de todos los sensores. El cultivar para el que menor deriva global se ha observado a lo largo del ensayo ha sido BGV005651 (6.47%), seguido del patrón sintético (6.97 %), BGV005477 (8.27%), UJI23 (9.71%), UJI11 (12.91%), BGV005718 (13.43%) y los híbridos comerciales utilizados como referenciales (Zayno 13.98% y Caramba 17,28%). Por lo tanto, se constata que el efecto de deriva es muy dependiente de las muestras procesadas, siendo, en general, mayor en las

muestras que en el patrón sintético. Por tanto, aunque el patrón sintético reproduce bastante acertadamente el comportamiento de las muestras habrá que tener en cuenta que algunos cultivares casi triplican la deriva global observada en el patrón sintético y asegurarse de que este comportamiento no afecta a las correcciones basadas en el patrón.

No obstante, la evolución de la deriva de los sensores al evaluar muestras de patrón sintético (Figura C2.2) y muestras reales (Figura C2.3), así como los CV calculados para la deriva de cada sensor muestran que el sistema de sensores del equipo, a pesar de que muestra procesos de deriva como todos los sistemas basados en sensores, tiene un comportamiento que puede considerarse bueno comparado con las respuestas que han observado otros autores en otros equipos o con prototipos experimentales. De hecho, la deriva observada en el análisis de patrón sintético muestra un rango de variación del CV que es la mitad del que se considera como común (0 a 18%) observado por otros autores al utilizar narices electrónicas (Maricou, *et al.* 1998). Hay que tener en cuenta que normalmente estas evaluaciones de deriva se han realizado con patrones simples y sin intercalar muestras reales en la secuencia, mientras que en nuestro caso el patrón sintético es más complejo y la secuencia incluye muestras reales de tomate, lo que incrementa considerablemente el efecto de deriva. Además, si consideramos la secuencia de trabajo en conjunto, incluso con los cultivares que han mostrado más deriva, esta se sigue manteniendo dentro de ese intervalo de variación considerado como común. En cualquier caso, hay que tener presente el patrón diario de deriva para establecer las secuencias de trabajo y minimizar errores. Los gráficos de evolución diaria de la deriva (Figura C2.2 y C2.3) muestran que después de unas 10 horas de trabajo y sobre todo al final del día esta deriva puede ser muy importante en algunos sensores. Además, en el caso del análisis de muestras reales (Figura C2.2) se observa

Capítulo 2

un aumento de la señal a partir de las cinco primeras horas de trabajo aproximadamente (más evidente en los sensores cuya resistencia disminuye; es decir, cuya respuesta máxima normalizada es positiva) que vuelve a disminuir unas horas después. Esta variación puede ser debida al efecto de los cambios de temperatura y humedad relativa ambientales apuntadas por algunos autores (Di Natale, *et al.* 2002).

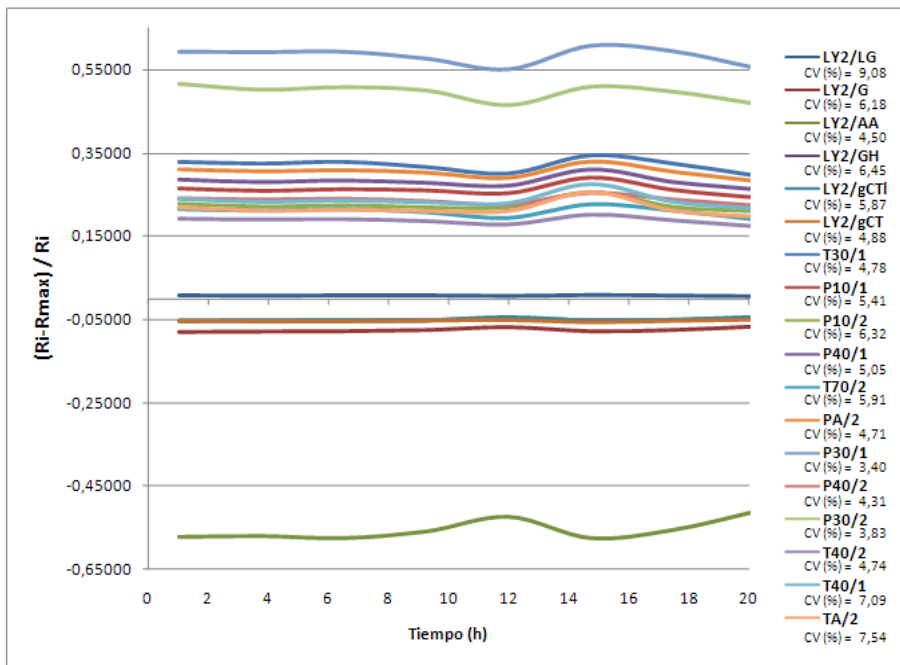


Figura C2.2: Deriva de los sensores al analizar muestras de patrón sintético a lo largo de día. Se incluyen los CV (en valor absoluto) para cada uno de los sensores en un día normal de trabajo.

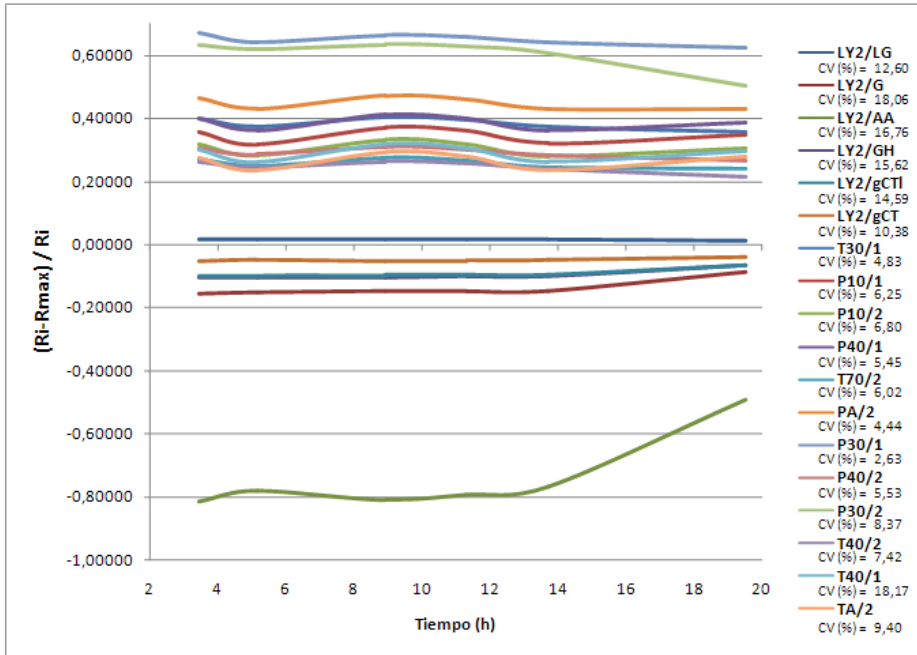


Figura C2.3: Deriva de los sensores al analizar muestras del cultivar Caramba a lo largo de día. Se incluyen los CV (en valor absoluto) para cada uno de los sensores en un día normal de trabajo

Estos patrones de evolución diaria de la deriva tienen una serie de consecuencias prácticas sobre el uso de la nariz electrónica y sobre la utilización de las matrices de huellas electrónicas de los cultivares evaluados. En primer lugar, obligan a analizar las distintas muestras de cada cultivar repartidas a lo largo de todo el día para que todos se vean afectados equitativamente por estos efectos de deriva y los perfiles globales no resulten sesgados. No obstante, hay que tener presente que de este modo se evitarán sesgos, pero la deriva incrementará la dispersión de las repeticiones de todos los grupos. En segundo lugar, la existencia de deriva impide que las matrices de huellas electrónicas que se obtienen al evaluar los cultivares puedan utilizarse tal cual se recogen. Es necesario algún proceso de “filtrado” de la información de evaluación para separar la deriva y que la evaluación de

huellas electrónicas resulte útil. Una forma relativamente cómoda de utilizar estas huellas electrónicas “filtradas” es emplear metodologías de clasificación que por si mismas busquen en la matriz de huellas electrónicas la información característica de cada grupo de cultivares y la utilicen para clasificarlos. Un ejemplo de este tipo de enfoque sería el uso del análisis discriminante basado en la técnica de regresión parcial mínimo cuadrática PLS-DA. Se trata de un método supervisado de clasificación que no utiliza directamente las señales de huellas electrónicas tal como se han obtenido sino que determina un conjunto de variables latentes que tratan de explicar lo máximo posible la covarianza existente entre las huellas electrónicas medidas y los grupos de cultivares a los que pertenecen. Con este planteamiento, sería posible, en principio, clasificar adecuadamente los cultivares evitando que la deriva distorsione esta clasificación. Para comprobar la utilidad de este enfoque se ha procedido a utilizar los perfiles electrónicos obtenidos en cada secuencia de trabajo para clasificar los cultivares evaluados. Los resultados de esta clasificación (primera fila de la Tabla C2.2) muestran unos porcentajes de acierto del 100% para algunos de los cultivares analizados (Zayno y UJI23) y para el patrón sintético, mientras que en otros casos este porcentaje no alcanza el 80% (UJI11 y BGV005651). Estos resultados pueden considerarse buenos si se comparan con los obtenidos por otros autores al utilizar este enfoque de “filtrado” de huellas electrónicas con métodos de clasificación supervisada. Por ejemplo, Llobet et al. (2004) (Llobet, *et al.* 2004) emplearon el método supervisado de redes neuronales de tipo fuzzy ARTMAP. Estos autores analizaron durante cinco días de trabajo consecutivos una serie de gases a distintas concentraciones y sus mezclas binarias. Los porcentajes de clasificación obtenidos con los 120 parámetros medidos fueron del 41.67% para el caso de los gases simples y del 85.83% para las mezclas binarias, aunque se alcanzaron porcentajes del

91.67 y 88.33% tras realizar una selección de variables, porcentajes similares a los obtenidos en este trabajo, aunque en nuestro caso se utilizan muestras reales de tomate que tienen una matriz mucho más compleja que las mezclas simples y binarias de gases.

Tabla C2.2: Porcentajes de acierto (validación cruzada) en la clasificación PLS-DA para cada uno de los genotipos y el patrón sintético de las muestras analizadas para un día de trabajo tipo. Las filas hacen referencia al tratamiento que hayan recibido las respuestas dadas por los sensores.

	Caramba	Zayno	UJI1	UJI23	BGV005477	BGV005651	BGV005718	Patron
1D sin corr ¹	84,7	100	78,6	100	94,9	79,7	91,8	100
1D corr patrón ²	82,7	100	71,4	92,9	95,9	92,0	92,9	93,8
1D corr PLS ³	100	100	100	100	100	99,0	98,0	100

¹1 Día sin corrección (“filtrado” indirecto)

²1 Día corrección con patrón

³1 Día corrección con PLS

Por tanto, los métodos de clasificación que “filtran” las huellas electrónicas de una secuencia de trabajo pueden resolver en parte el problema de la influencia de la deriva en una secuencia de trabajo. No obstante, el enfoque de corrección de la matriz de huellas electrónicas eliminando la deriva antes de utilizar esta información resulta más

prometedor para la clasificación de cultivares ya que, en principio, las metodologías de clasificación trabajarían con matrices menos problemáticas. Para comparar la bondad de este enfoque respecto del anterior se ha procedido a corregir la matriz de huellas electrónicas de cada una de las secuencias de trabajo desarrolladas. Se han probado dos métodos de corrección de deriva, el primero basado en la extrapolación de la corrección sobre el patrón sintético de tomate siguiendo una ampliación de la metodología propuesta por Salit y Turk (1998) (Salit y Turk. 1998) y un segundo método que es una adaptación aplicada a muestras reales de tomate de la estrategia de corrección de deriva por componentes (CC) propuesta por Artursson et al. (2000) (Artursson, *et al.* 2000).

En el primer método de corrección basado en el patrón sintético, tras modelizar el comportamiento de éste a lo largo de una secuencia de trabajo por medio de una curva no paramétrica (Figura C2.4) se obtiene para cada momento de la secuencia de análisis una función de deriva (descrita en la metodología) que es eliminada de la señal obtenida para cada una de las muestras reales. Esta corrección se realiza para cada uno de los sensores por separado (se trata de un método univariante).

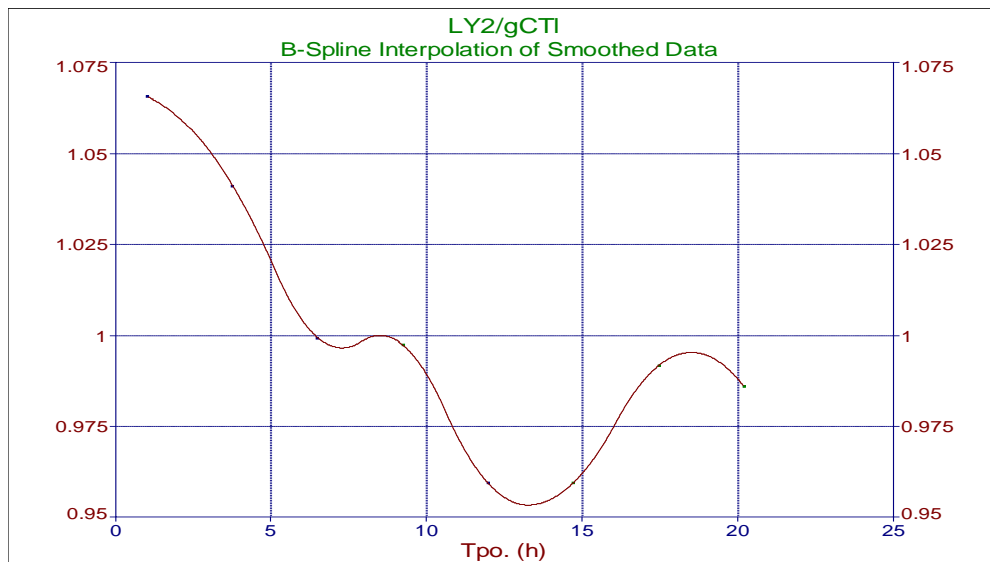


Figura C2.4: Representación no paramétrica del patrón sintético frente al tiempo para el sensor LY2/gCTI correspondiente a la secuencia del primer día de trabajo.

Una vez obtenidos los valores de respuesta de los distintos sensores corregidos se ha estudiado su efecto en los coeficientes de variación. Para el patrón sintético la corrección de la dispersión es evidente, obteniéndose valores del coeficiente de variación muy próximos a cero. Muy distinto es el caso de las muestras reales, para las que en general no se consigue reducir la dispersión del coeficiente de variación llegando a alcanzarse valores del 45%. Si bien es cierto que estos valores tan altos se han alcanzado para el sensor LY2/LG, que es el sensor más desfavorecido por este tipo de corrección (en el resto de sensores los coeficientes de variación para los tres días de trabajo de las muestras reales varían entre 1-22%), son valores inadmisibles en cualquier caso. Sólo en algunos casos y para algunos sensores se observa mejoría pero no es una respuesta general ni repetible a lo largo de los tres días. Este comportamiento errático de la corrección se comprueba al realizar una clasificación PLS-DA. Los porcentajes de acierto para la validación cruzada de esta clasificación (segunda fila de la Tabla

C2.2) muestran un ligero aumento de la eficacia de clasificación para dos de los cultivares (BGV005718 y BGV005477) si se comparan con los valores sin corregir, observándose un aumento importante (de un 79.7 a un 92%) en el caso del cultivar BGV005651. Sin embargo, en el resto de los cultivares y en el patrón sintético (a excepción del híbrido Zayno que permanece constante) se produce una disminución del número de aciertos. Cuando este método fue utilizado en ICP-EOS las muestras analizadas eran distintas soluciones de zirconio, que diferían en la dilución y el estándar interno utilizado, mientras que en este caso el análisis se realiza en una matriz mucho más compleja como lo es una muestra de tomate. Por lo tanto, es más difícil conseguir que la muestra de referencia sea capaz de comportarse exactamente igual que las muestras reales, presumiblemente debido a la complejidad de la matriz de las muestras reales que es muy difícil de reproducir en un patrón sintético.

En vista de estos resultados se ha probado a corregir la deriva por medio de un método que no base la corrección en el comportamiento de una muestra de referencia. En este caso se trata de un método de corrección de componentes basado en PLS. Como ya se ha comentado, el fundamento del método es el mismo que en el caso anterior, ya que en ambos se pretende eliminar la parte de señal correspondiente a la deriva. La diferencia es que en este caso la identificación de la deriva se lleva a cabo por medio de una regresión PLS. Esta regresión es la que permite obtener unas variables latentes (5 en este análisis en concreto) que tras eliminarlas permiten reconstruir la matriz de huellas electrónicas sin deriva. Tras eliminar la deriva de las respuestas se observa una clara mejoría de los resultados que puede apreciarse tanto en los porcentajes de acierto de la clasificación (tercera fila de la Tabla C2.2), con valores de acierto del 100% o muy próximos a él, como en el descenso de los valores del coeficiente de

variación. Teniendo en cuenta todos los sensores y cultivares, estos valores oscilan entre 0.01 - 3.70%. Estos valores son más de seis veces inferiores a los obtenidos en el caso de la nariz electrónica mencionado anteriormente (Maricou, *et al.* 1998). Este método, además de la notable mejoría que muestra en los resultados, tiene la ventaja de no utilizar muestras de referencia (reduciendo así el tiempo de análisis) y de ser un método multivariante, en el que todos los sensores son analizados a la vez, sin tener que ir corrigiendo sensor por sensor. Por otro lado, en el primer método se debe buscar una función ajustando la respuesta a la muestra de referencia a una curva, mientras que en este caso es la propia regresión la que determina que parte de la señal está relacionada con el tiempo y, por tanto, con la deriva. Esta forma de trabajar, sin necesidad de imponer hipótesis iniciales que puedan ser restrictivas, hace que sea un método mucho más generalizable y potente que el anterior a la hora de corregir los efectos de deriva y además permite eliminar cualquier tipo de efecto de deriva sin que éste tenga que ser especificado, por ejemplo el efecto debido a la variación de las condiciones ambientales que se observa en la evolución diaria de la deriva del cultivar Caramba (Figura C2.3). Esta mejoría puede apreciarse claramente si se compara la evolución de la respuesta de los sensores con el tiempo para este cultivar, antes (Figura C2.3) y después (Figura C2.5) de la corrección de la deriva, obteniéndose una respuesta mucho más constante en el segundo caso.

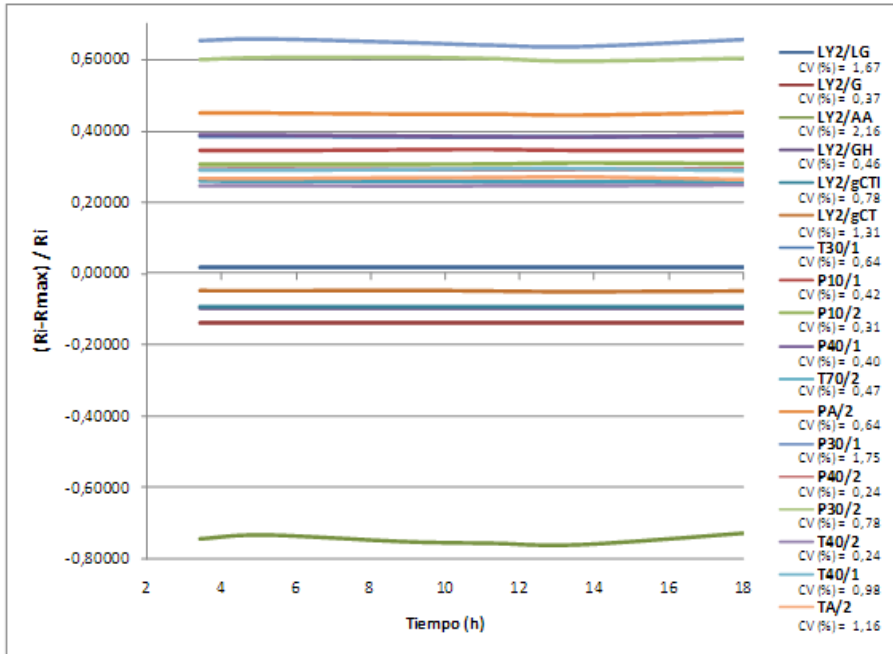


Figura C2.5: Evolución de los sensores con el tiempo del cultivar Caramba a lo largo de un día tras la corrección de la deriva. Se incluyen los CV (en valor absoluto) para cada uno de los sensores en un día normal de trabajo

Además de evitar los problemas que la deriva ocasiona dentro de una secuencia de trabajo hay que eliminar también la deriva entre secuencias distintas a la hora de utilizar las huellas electrónicas como método rutinario de evaluación de genotipos de tomate. Hay que considerar que en mejora es importante poder comparar las características de muchos genotipos distintos, como por ejemplo los que se manejan en generaciones segregantes durante las etapas de selección o los que se encuentran en bancos de germoplasma y de los que se quiere elegir unos parentales interesantes. La evaluación de un elevado número de genotipos y con ello el establecimiento de librerías de huellas electrónicas no se podrá hacer en una única secuencia de trabajo. Por lo tanto, resulta crucial que la comparación entre huellas electrónicas obtenidas en secuencias de trabajo distintas no resulte sesgada. Cuando se

utilizan las matrices de respuestas electrónicas de diferentes días, incluso cuando se han corregido las secuencias del día el análisis multivariante de la varianza indica que existen diferencias altamente significativas ($\alpha < 0.0001$ con el test de Roy) para las secuencias entre días. En estas condiciones, si no se procede a realizar una estandarización que corrija la deriva entre secuencias diferentes no se conseguirán librerías de perfiles aromáticos electrónicos que resulten útiles.

Esta estandarización se ha llevado a cabo por medio de un método multivariante de transferencia de calibrado (PDS, piecewise direct standardization). Este método de estandarización trabaja con dos matrices de señal corregida, una que toma como referencia y otra que estandariza con respecto a la primera. De este modo, las estandarizaciones se realizan siempre pareadas. Para poder estandarizar de esta forma es necesario la presencia de cierto número de muestras que se repitan en ambas secuencias. Las muestras elegidas para calcular el modelo de estandarización son las que mejor definen el patrón de variación de la matriz que se toma como base de estandarización. La selección fue llevada a cabo entre las muestras analizadas el primer día de trabajo, calculándose el algoritmo de estandarización al comparar la respuesta obtenida en estas muestras con la respuesta obtenida para la misma muestra en las sucesivas secuencias de medida y aplicando este algoritmo a todas las muestras analizadas. Tras la transformación se realizó un análisis multivariante para comprobar la efectividad de la estandarización. En este caso, el MANOVA indica que ya no existen diferencias significativas ($\alpha = 0.9995$ con el test de Roy) entre días de trabajo, mientras que se mantienen las diferencias significativas ($\alpha = 0$ con el test de Roy) entre el material vegetal por lo que el método de estandarización permite eliminar las diferencias debidas a distintos días de trabajo sin eliminar las que permiten distinguir entre genotipos. El efecto de

la estandarización también se dejó ver en los porcentajes de acierto de validación cruzada en la clasificación (Tabla C2.3). Estos muestran un menor error de clasificación en casi todos los casos, manteniéndose constante en el resto (UJI23, BGV005718 y patrón sintético). Aunque la clasificación no mejore de forma espectacular tras la estandarización, ésta es necesaria si se quieren obtener librerías compuestas por distintos genotipos analizados en varios días de trabajo. Aun así, el porcentaje de aciertos para todos los cultivares es superior al 90%, a excepción de Caramba y UJI11 en los que, a pesar de no alcanzarse ese porcentaje, éste ha mejorado con respecto a las muestras no estandarizadas. Si se representan las dos primeras variables latentes del modelo PLS-DA que se utiliza para hacer esta clasificación (Figura C2.6) se entiende mejor que estos cultivares presenten un porcentaje de error más elevado, ya que se encuentran solapados entre sí al tratarse de materiales vegetales bastante similares.

Tabla C2.3: Porcentajes de acierto de validación cruzada en la clasificación PLS-DA para cada uno de los cultivares en estudio y el patrón sintético con las respuestas obtenidas los tres días de trabajo, antes y después de la estandarización.

	Caramba	Zayno	UJI11	UJI23	BGV005477	BGV005651	BGV005718	Patrón
3D sin corr ¹	73,1	92,2	68,1	100	94,2	87,8	98,6	100
3D corr ²	87	99,3	80,2	100	98,6	90,8	98,6	100

¹Datos de los tres días de trabajo sin corregir

²Datos de los tres días de trabajo con corrección de deriva a corto y largo plazo

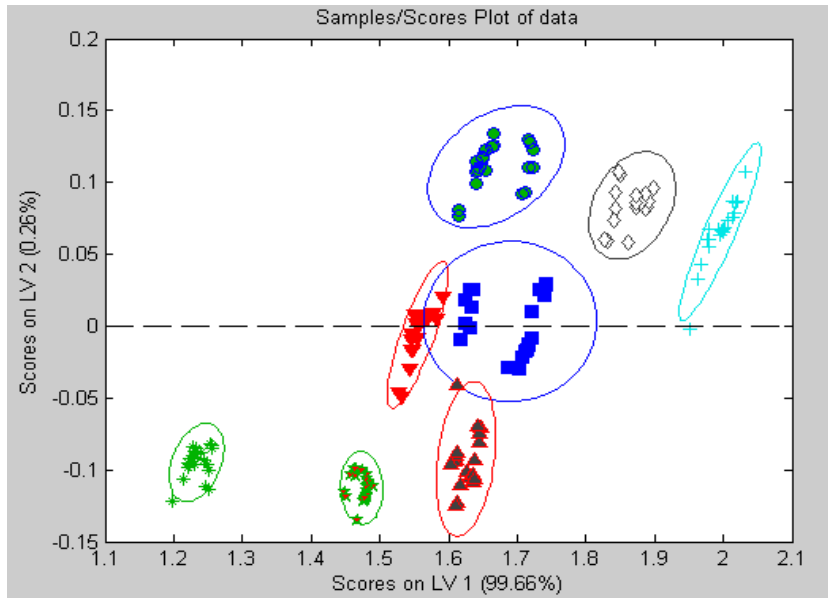


Figura C2.6: Representación de las dos primeras variables latentes obtenidas en el modelo de calibrado de la clasificación PLS-DA de las matrices de señal electrónica corregida obtenidas durante los tres días de trabajo y después de estandarizarlas. Las elipses representan el intervalo de confianza (95%)

Sin embargo, es importante destacar que aunque este gráfico da una idea muy clara de cómo se distribuyen las muestras en el espacio (permitiendo ver que cultivares presentan un perfil aromático similar o cuales muestran diferencias), el resultado de la clasificación parece más optimista que el obtenido al calcular el porcentaje de aciertos (Tabla C2.3). Esto es debido a que, por un lado, el modelo de clasificación utiliza realmente 9 variables latentes para separar entre grupos y aquí solo se han representado las 2 primeras y, por otro lado, el porcentaje de aciertos en la clasificación está calculado haciendo validación cruzada. Al validarlo de este modo, el modelo calculado se contrasta con otros 9 modelos parciales (para

simular situaciones distintas) por lo que la variabilidad de cada grupo aumenta y por ello disminuyen ligeramente los aciertos de la clasificación. En el caso de la representación gráfica (Figura C2.6) se ha generado un único modelo con todos los datos disponibles, ya que este modelo de clasificación es el de calibrado y no el de validación cruzada. Para observar mejor la separación entre grupos se ha añadido en el gráfico una elipse que marca el intervalo de confianza (95%) de cada uno de ellos. Como se ha comentado anteriormente, esta representación permite establecer similitudes y diferencias entre los perfiles aromáticos de los cultivares, siendo esto de gran importancia a la hora de seleccionar genotipos, ya que permite establecer qué muestras se asemejan más a las características buscadas en la selección.

4. CONCLUSIONES

1. Los sensores de tipo MOS utilizados (LY/LG, LY/G, LY/AA, LY/GH, LY/gCTI, LY/gCT, T30/1, P10/1, P10/2, P40/1, T70/2, PA2, P30/1, P40/2, P30/2, T40/2, T40/1, TA2) sufren deriva con el tiempo, apreciable tanto en una secuencia de trabajo como en muestras analizadas en secuencias de trabajo distintas. Esta deriva dificulta la interpretación de los resultados, complicando la construcción de librerías, al introducir una dispersión que perjudica la identificación de las muestras y hacer que estas no sean comparables entre análisis. Por lo tanto, la corrección de la deriva y la estandarización entre muestras analizadas en distintas secuencias es necesaria si se quiere aprovechar todo el potencial que puede aportar el uso de una nariz electrónica.

2. De los dos métodos probados para la corrección de deriva, la aproximación univariante no es efectiva en tomate y las condiciones de trabajo utilizadas en este estudio. La hipótesis inicial (que la deriva en las muestras reales se comporta exactamente igual que la muestra de referencia) obliga a ajustar los puntos a una curva que, a pesar de haber utilizado una regresión no paramétrica para no condicionar la tendencia dada por los puntos, no se ajusta por igual en todos los casos y en estas condiciones este planteamiento no es capaz de eliminar satisfactoriamente la deriva. Sin embargo, la corrección de componentes por medio de la regresión PLS muestra unos resultados muy satisfactorios, habiéndose comprobado su efectividad en tres días de trabajo distintos. Una diferencia muy importante con respecto al método anterior, es que en este caso no existen hipótesis iniciales que puedan ser limitantes, de forma que es la propia regresión la que determina que parte de la señal está relacionada con el tiempo, facilitando así una función más ajustada a cada caso y permitiendo además eliminar cualquier tipo de deriva que esté relacionada con el tiempo.
3. La estandarización entre muestras por medio de la técnica PDS permite eliminar las diferencias significativas entre repeticiones de una misma muestra analizadas en días de trabajo distintos. Esta estandarización se ha llevado a cabo utilizando como referencia las propias muestras analizadas ya que estas se repetían a lo largo de todas las secuencias de trabajo. Sin embargo, para el análisis rutinario, es necesario desarrollar muestras de referencia representativas del grupo de muestras a analizar, ya que en él lo normal es que no se repitan todos los cultivares en las distintas secuencias de trabajo.
4. Una vez corregida la deriva y estandarizadas las muestras, el uso de la nariz electrónica es una técnica efectiva para la identificación y

clasificación de distintos cultivares de tomate. La nariz electrónica es una prometedora herramienta para la selección de material vegetal en frutos de tomate, ya que a través de los perfiles aromáticos obtenidos permite establecer grupos bien definidos que por su posición en el espacio muestran diferencias y semejanzas entre los cultivares analizados.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Artursson, T.; Eklöv, T.; Lundström, I.; Mårtensson, P.; Sjöström, M.; Holmberg, M.** 2000 Drift correction for gas sensors using multivariate methods. *J. Chemometr.* , 14, 711-723.
- Bednarczyk, D.; DeWeerth, S. P.** 1995 Smart chemical sensing arrays using tin oxide sensors and analog winner-take-all signal processing. *Sensors and Actuators B: Chemical* , 27, 271-274.
- Beltran, J.; Serrano, E.; López, F. J.; Valcárcel, M.; Roselló, S.** 2006 Comparison of two quantitative GC-MS methods for analysis of tomato aroma based on purge-and-trap and on solid-phase microextraction. *Anal Bioanal Chem.* , 385, 1255-1264.
- Berna, A. Z.; Lammertyn, J.; Buysens, S.; Di Natale, C.; Nicolai, B. M.** 2005 Mapping consumer liking of tomatoes with fast aroma profiling techniques. *Postharvest Biology and Technology* , 38, 115-127.
- 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, 324-333.
- Bouveresse, E.; Hartmann, C.; Massart, D. L.** 1996 Standardization of Near-Infrared Spectrometric Instruments. *Anal. Chem.* , 68, 982-990.

- Brezmes, J.; Llobet, E.; Vilanova, X.; Orts, J.; Saiz, G.; Correig, X.** 2001 Correlation between electronic nose signals and fruit quality indicators on shelf-life measurements with pinklady apples. *Sensors Actuators B: Chem.* , 80, 41-50.
- Davide, F. M.; Di Natale, C.; D'Amico, A.** 1994 Self-organizing Multisensor Systems for Odour Classification: Internal Categorization, Adaptation and Drift Rejection. *Sensors and Actuators B* , 18-19, 244-250.
- Di Natale, C.; Macagnano, A.; Martinelli, E.; Paolesse, R.; Proietti, E.; d'Amico, A.** 2001a The evaluation of quality of post-harvest oranges and apples by means of an electronic nose. *Sensors and Actuators, B* , B78, 26-31.
- Di Natale, C.; Macagnano, A.; Martinelli, E.; Proietti, E.; Paolesse, R.; Castellari, L.; Campani, S.; D'Amico, A.** 2001b Electronic nose based investigation of the sensorial properties of peaches and nectarines. *Sensors and Actuators B: Chemical* , 77, 561-565.
- Di Natale, C.; Macagnano, A.; Paolesse, R.; Mantini, A.; Tarizzo, E.; D'Amico, A.; Sinesio, F.; Bucarelli, F. M.; Moneta, E.; Quaglia, G. B.** 1998 Electronic nose and sensorial analysis: comparison of performances in selected cases. *Sensors and actuators B chemical* , B50, 246-252.
- 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, 158-165.
- Frank, M.; Hermle, T.; Ulmer, H.; Mitrovics, J.; Weimar, U.; Göpel, W.** 2000 Quality tests of electronic noses: the influence of sample dilution and sensor drifts on the pattern recognition for selected case studies. *Sensors and Actuators B: Chemical* , 65, 88-90.
- Fryder, M.; Holmberg, M.; Winquist, F.; Lundstrom, I.** 1995 A calibration technique for an Electronic Nose. *Solid-State Sensors and Actuators* , 1, 683-686.
- Gardner, J.; Hines, E.; Pang, C.** 1996 Detection of vapours and odours from a multisensor array using pattern recognition: selforganizing

- adaptive resonance techniques. *Measurement and Control* , 29, 172-178.
- Goodacre, R.; Kell, D. B.** 1996 Correction of Mass Spectral Drift Using Artificial Neural Networks. *Anal. Chem.* , 68, 271-280.
- 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, 23-39.
- Hernández Gómez, A.; Hu, G.; Wang, J.; García Pereira, A.** 2006a Evaluation of tomato maturity by electronic nose. *Computers and Electronics in Agriculture* , 54, 44-52.
- Hernández Gómez, A.; Wang, J.; Hu, G.; García Pereira, A.** 2006b Electronic nose technique potential monitoring mandarin maturity. *Sensors and Actuators B: Chemical* , 113, 347-353.
- Hernández Gómez, A.; Wang, J.; Hu, G.; García Pereira, A.** 2007 Discrimination of storage shelf-life for mandarin by electronic nose technique. *LWT - Food Science and Technology* , 40, 681-689.
- Holmberg, M.; Artusson, T.** 2003; *Drift compensation, standards and calibration methods*; En Pearce, T. C., Schiffman, S. S., Nagle, H. T. and Gardner, J. W., Eds.; WILEY-VCH: Weinheim, Germany, Chapter 13, p 325.
- Holmberg, M.; Davide, F. A. M.; Di Natale, C.; D'Amico, A.; Winquist, F.; Lundström, I.** 1997 Drift counteraction in odour recognition applications: lifelong calibration method. *Sensors and Actuators B: Chemical* , 42, 185-194.
- Holmberg, M.; Winquist, F.; Lundström, I.; Davide, F.; Di Natale, C.; D'Amico, A.** 1996 Drift counteraction for an electronic nose. *Sensors and Actuators B: Chemical* , 36, 528-535.
- Huberty, C. J.; Olejnik, S.** In *Applied MANOVA and Discriminant Analysis*, Wiley-Interscience: 2006; pp 488.
- Jamasb, S.; Collins, S.; Smith, R. L.** 1998 A physical model for drift in pH ISFETs. *Sensors and Actuators B: Chemical* , 49, 146-155.

- Kantor, D. B.; Hitka, G.; Fekete, A.; Balla, C.** 2008 Electronic tongue for sensing taste changes with apricots during storage. *Sensors and Actuators B: Chemical* , 131, 43-47.
- Llobet, E.; Brezmes, J.; Gualdrón, O.; Vilanova, X.; Correig, X.** 2004 Building parsimonious fuzzy ARTMAP models by variable selection with a cascaded genetic algorithm: application to multisensor systems for gas analysis. *Sensors and Actuators B: Chemical* , 99, 267-272.
- Llobet, E.; Hines, E. L.; Gardner, J. W.; Franco, S.** 1999 Non-destructive banana ripeness determination using a neural network-based electronic nose. *Measurement Science and Technology* , 10, 538-548.
- Maricou, H.; Pereira, D.; Verschuere, L.; Philips, S.; Verstraete, W.** 1998 Measurements of Some Volatile Compounds by Means of the Electronic Nose. *Water, Air, & Soil Pollution* , 107, 423-442.
- Maul, F.; Sargent, S. A.; Balaban, M. O.; Baldwin, E. A.; Huber, D. J.; Sims, C. A.** 1998 Aroma volatile profiles from ripe tomatoes are influenced by physiological maturity at harvest: An application for electronic nose technology. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* , 123, 1094-1101.
- Mielle, P.; Marquis, F.** 1999 An alternative way to improve the sensitivity of electronic olfactometers. *Sensors and Actuators B: Chemical* , 58, 526-535.
- Oshita, S.; Shima, K.; Haruta, T.; Seo, Y.; Kawagoe, Y.; Nakayama, S.; Takahara, H.** 2000 Discrimination of odors emanating from 'La France' pear by semi-conducting polymer sensors. *Computers and Electronics in Agriculture* , 26, 209-216.
- Pearce, T. C.; Gardner, J. W.** 1998 Predicting organoleptic scores of sub-ppm flavour notes Part 2. Computational analysis and results. *Analyst*, 1998, 123, 2057 - 2066 , 123, 2057-2066.
- Saevels, S.; Lammertyn, J.; Berna, A. Z.; Veraverbeke, E. A.; Di Natale, C.; Nicolai, B. M.** 2004 An electronic nose and a mass spectrometry-based electronic nose for assessing apple quality during shelf life. *Postharvest Biology & Technology* , 31, 9-19.

- Salit, M. L.; Turk, G. C.** 1998 A Drift Correction Procedure. *Anal. Chem.* , 3184-3190.
- Salles, C.; Nicklaus, S.; Septier, C.** 2003 Determination and gustatory properties of taste-active compounds in tomato juice. *Food Chemistry* , 81, 395-402.
- Servy, S.; García, M. C.; Paccapelo, V.** 2007 Regresión no paramétrica: una aplicación. *Décimas Jornadas "Investigaciones en la Facultad de Ciencias Económicas y Estadística"* .
- Skov, T.; Bro, R.** 2005 A new approach for modelling sensor based data. *Sens. actuators, B* , 106, 719-729.
- Systat** 1994 *Table Curve 2D Automatic Curve Fitting Software for Windows*, User's Manual, Jandel Scientific: San Rafael, CA,; .
- Vlachos, D. S.; Fragoulis, D. K.; Avaritsiotis, J. N.** 1997 An adaptive neural network topology for degradation compensation of thin film tin oxide gas sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical* , 45, 223-228.
- Wang, Y.; Isaksson, T.; Kowalski, B. R.** 1994 New approach for distance measurement in Locally Weighted Regression. *Analytical Chemistry* , 66, 249-260.
- Wang, Y.; Veltkamp, D. J.; Kowalski, B. R.** 1991 Multivariate Instrument Standardization. *Analytical Chemistry* , 63, 2750-2756.
- Wang, Y.; Veltkamp, D. J.; Kowalski, B. R.** 1992 Improvement of Multivariate calibration through Instrument Standardization. *Analytical Chemistry* , 64, 562-565.
- Wilson, D. M.; DeWeerth, S. P.** 1995 Odor discrimination using steady-state and transient characteristics of tin-oxide sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical* , 28, 123-128.
- Wise, B. M.; Gallagher, N. B.; Bro, R.; Shaver, J. M.; Windig, W.; Koch, R. S.** 2006 PLS_Toolbox Version 4 for use with MATLAB™. *Eigenvector Research, Inc.* .

Wold, S.; Antti, H.; Lindgren, F.; Öhman, J. 1998 Orthogonal signal correction of near-infrared spectra. *Chemo. and Intell. Lab. Sys.* , 44, 175-185.

Young, H.; Rossiter, K.; Wang, M.; Miller, M. 1999 Characterization of Royal Gala apple aroma using electronic nose technology -potential maturity indicator. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 47, 5173-5177.

Capítulo 3

Optimización del tiempo de incubación y los parámetros de clasificación en la obtención de perfiles aromáticos electrónicos en tomate

RESUMEN

La nariz electrónica resulta una técnica muy interesante para la clasificación de cultivares de tomate en función de su perfil aromático. Para la obtención de unos buenos resultados de clasificación es necesario establecer un método de trabajo adecuado. Un factor que va a condicionar de forma importante la calidad de la respuesta dada por el sensor es el tiempo de incubación, que además es determinante para la duración total del análisis. Por otro lado, de la respuesta dada por un sensor se pueden extraer numerosos parámetros de medida que aportan distinta información a la clasificación, siendo interesante determinar cuáles de ellos son los que aportan la información más relevante para clasificar cultivares de tomate. En este estudio se aplicaron tres tratamientos de tiempo distintos (5, 10 y 15 minutos) para clasificar cinco cultivares de tomate, utilizándose en cada uno de ellos dos matrices de huellas olfatómicas distintas: en una se utilizó el parámetro normalmente empleado en el caso de sensores de tipo MOS (18 parámetros) mientras que para la otra se calcularon un total de 108 parámetros y se realizó una selección de variables por medio de algoritmos genéticos para determinar cuáles de ellos eran más informativos. El uso de un mayor número de parámetros dio como resultado una mejora en la clasificación, siendo los tiempos de incubación que mejor resultado daban 5 y 15 minutos. Para comprobar si esta selección es de uso general o si es específica para un lote de cultivares concreto, la selección obtenida se aplicó a otro grupo de muestras (en las que estaban representados los cultivares de esta estudio más dos cultivares nuevos) y el resultado de clasificación fue peor aplicando la selección de variables aquí obtenida que si se utilizaban los 108 parámetros iniciales; sin embargo, hacer una selección de variables propia para esas muestras mejoraba el resultado de la clasificación.

1. INTRODUCCIÓN

El aroma es un aspecto que cada día tiene más importancia a la hora de evaluar frutos de tomate. Este parámetro de calidad organoléptica viene determinado por las sustancias volátiles presentes, que a pesar de encontrarse en concentraciones muy bajas, son detectadas por los órganos gustativos y olfatorios dándole al tomate unas características específicas. En tomate se han identificado unos 400 compuestos volátiles, pertenecientes a varios grupos orgánicos, pero se considera que sólo unos 30 son los responsables del aroma en tomate fresco. El aroma de los tomates viene dado por combinaciones particulares de muchos de estos compuestos (Buttery y Ling, 1993b) y que, en muchas ocasiones, se considera que son las responsables de diferencias importantes entre variedades (Cebolla-Cornejo, *et al.* 2006). Por ello, una manera potencialmente muy útil de clasificar variedades es a partir de su composición aromática.

Una técnica instrumental que permite la evaluación de perfiles aromáticos de forma rápida es la nariz electrónica. Consiste en un conjunto de sensores químicos que reaccionan de distinta forma a la presencia de aromas. La respuesta de estos sensores conforma una huella que se asemeja más a los resultados dados por un panel sensorial que si se realizara un análisis de cada uno de los compuestos por separado, como se realiza por ejemplo con cromatografía de gases-espectroscopía de masas (GC-MS). La información obtenida por medio de la nariz electrónica no es tan precisa como la proporcionada por la técnica analítica, pero su uso presenta una

serie de ventajas como rapidez en el análisis, escasa preparación de la muestra, fácil manejo y la posibilidad de construir librerías que permitan trabajar cada vez con mayor cantidad de información. Por otro lado, la información obtenida con la nariz electrónica es objetiva y reproducible, habiéndose utilizado con éxito en la clasificación de distintos productos como aceite de oliva (Brezmes, *et al.* 2005), te (Yu, *et al.* 2008), zumo de naranja (Farnworth, *et al.* 2002), variedades rojas de pimiento (Korel, *et al.* 2002) y en la clasificación en función del estado de madurez de tomates (Hernández Gómez, *et al.* 2006a), mandarinas (Hernández Gómez, *et al.* 2006b) y bananas (Llobet, *et al.* 1999) o de la vida útil de manzanas (Brezmes, *et al.* 2001) y mandarinas (Hernández Gómez, *et al.* 2007).

La obtención de unos buenos resultados de clasificación pasa por establecer un método de trabajo adecuado para obtener una huella electrónica del perfil aromático de las muestras, conformada por la respuesta dada por los sensores, que permita diferenciar inequívocamente entre la clases analizadas. Esta respuesta está directamente condicionada por el espacio de cabeza generado, pues en él se encuentran los compuestos volátiles que reaccionarán con los sensores, transformándose esta interacción química en una señal medible (respuesta del sensor). Los parámetros relacionados con el espacio de cabeza son tiempo y temperatura de incubación, cantidad de muestra a analizar y volumen del espacio de cabeza inyectado en los sensores (Alpha SOFT. 1994). Si bien tres de estos parámetros quedan prácticamente definidos basándose en la metodología de análisis de componentes volátiles en frutos de tomate por medio de técnicas analíticas como el análisis por GC-MS (Beltran, *et al.* 2006), resulta interesante prestarle más atención al tiempo de incubación, puesto que de su duración dependerá el tiempo total de análisis.

De la respuesta obtenida tras optimizar el método de trabajo se pueden extraer numerosos parámetros de medida que aportan distinta información a la clasificación (Yu, *et al.* 2008, Chaudry, *et al.* 2000, Roussel, *et al.* 1998, Carmel, *et al.* 2003). Otro aspecto a tener en cuenta para obtener perfiles aromáticos que favorezcan la clasificación es determinar que parámetros son los que aportan la información más relevante. De partida, todas las variables pueden ser consideradas importantes y esto dificulta determinar que variables deben ser seleccionadas. Por supuesto, se podría realizar la clasificación con todas las variables, pero esto podría provocar algunos problemas. Por un lado, se puede estar incluyendo variables que no aportan información que ayude en la clasificación pero que si incluyen ruido, empobreciendo de esta forma los modelos de clasificación. Por otro, si se quieren obtener parámetros fiables, debería ser mayor el número de observaciones que el de variables, lo cual es un problema si se tiene en cuenta que la obtención de gran cantidad de datos puede ser un proceso costoso y que necesita mucho tiempo. Además, puede existir correlación entre variables, provocando problemas de multicolinealidad que desemboquen en modelos pobres.

Por ello, la aplicación de selección de variables en el conjunto de parámetros de medida obtenidos es importante para determinar cuáles de ellos aportan la información necesaria para la clasificación. Numerosos métodos se han utilizado para seleccionar variables. En algunos de ellos, como la selección incremental (“forward selection”), la eliminación reversa (“reverse” o “backward elimination”) o la selección por pasos (“stepwise selection”) llevada a cabo durante la elaboración del modelo (Mantel. 1970, Neter, *et al.* 1996, Freedman. 1983), no se tienen en cuenta las correlaciones entre variables, estudiándose éstas sólo de forma independiente. Esto es un problema ya que algunas variables, por separado, puede que no sean

relevantes, pero juntas pueden aportar información importante. Otra alternativa consistiría en utilizar la opinión de los expertos, que estudiarían la relación entre variables dependientes e independientes seleccionando entre estas últimas las más importantes (Han, *et al.* 2000). El resultado de este método sería una selección subjetiva, que se complica todavía más en el caso de partir de un gran número de variables iniciales y de necesitar el examen de la correlación entre variables. Para evitar estos problemas se han propuesto métodos de selección estadísticos como análisis de componentes principales (PCA) (Jolliffe. 1986), análisis cluster (Everitt. 1974) y regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) (Geladi y Kowalski. 1986). En el PCA, se obtiene una cantidad de componentes principales inferior al de variables iniciales y sin correlación entre ellos mientras que en el análisis cluster son las variables independientes las que se clasifican en grupos que se excluyen entre sí y es una variable representativa de cada grupo la que se utiliza para realizar el modelo. En el PLS si que se utilizan tanto variables dependientes como independientes para obtener las variables latentes, pero si para la obtención del modelo se sigue utilizando la selección por pasos y la eliminación hacia atrás, sigue presente el problema de que la combinación de variables finales sea un óptimo local. Por lo tanto, es necesaria una técnica capaz de localizar un valor adyacente que permita que las variables finales conformen un óptimo global. Este es el caso de los algoritmos genéticos (GA) (Holland. 1992, Lucasius y Kateman. 1994, Lucasius y Kateman. 1993) que son algoritmos de búsqueda basados en mecanismos de selección natural menos afectados por los máximos locales que las técnicas tradicionales.

El objetivo de este trabajo consiste en optimizar el método de clasificación para variedades de tomate por medio de una nariz electrónica. Esta optimización se va a llevar a cabo tanto desde el punto de vista de la

obtención del tiempo óptimo de generación del espacio de cabeza como de la determinación de las variables que favorecen una buena clasificación de diferentes cultivares de tomate.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Diseño experimental

Se tratará de determinar el tiempo de incubación óptimo para la clasificación de cultivares de tomate a través del perfil aromático analizado por medio del olfatómetro electrónico comercial FOX 4000 (Alpha MOS, Toulouse, France). Se determinará además el número y tipo de parámetros idóneos para la comparación entre cultivares de tomate y para el establecimiento de librerías electrónicas. Finalmente se comprobará si la selección de parámetros realizada es de uso general para la evaluación de cultivares de tomate o es específica para una lote concreto de cultivares.

Para poder llevar a cabo estos objetivos específicos se ha planteado el siguiente diseño de ensayo. Se analizará una secuencia de muestras diaria de 54 muestras. Se dispondrán cinco cultivares de tomate, uno de ellos (Zayno RZ) incluirá el doble de muestras procedentes de dos zonas diferentes de la parcela de cultivo. Con esto se pretende comprobar si el olfatómetro electrónico es capaz de clasificar juntas sin perder precisión dos muestras de un mismo material vegetal pero que presentan variaciones debidas al ambiente. Las muestras de los cinco cultivares se someterán a tres tratamientos de tiempo de incubación (5, 10 y 15 minutos). Todas las muestras se han distribuido al azar a lo largo de la secuencia para evitar

sesgos en los resultados. De la secuencia descrita se realizaron tres repeticiones, obtenidas por el mismo procedimiento.

Para comprobar si la selección de parámetros a realizar es de aplicación general se utilizarán también las matrices de huellas electrónicas del ensayo descrito en el capítulo 2.

2.2 Material vegetal

Puesto que la corrección de la deriva se realizará por medio de la corrección de componentes basada en una regresión PLS desarrollada en el capítulo 2 no será necesario incluir patrón sintético en la secuencia para ser analizado. El material vegetal se ha elegido a partir del utilizado en el capítulo anterior, repitiéndose cinco de los cultivares usados en él. El hecho de emplear sólo cinco cultivares vino dado por la necesidad de incluir los tres tiempos en estudio en la misma secuencia y para poder utilizar las matrices de huellas electrónicas del capítulo a efectos de comprobación. Estos cultivares son uno de los híbridos comerciales Zayno RZ (Rijk Zwaan Iberica, Almería, España) utilizado como referencial; una de las variedades locales de tomate de colgar (UJI23) y las tres variedades tradicionales cedidas por el banco de germoplasma de Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana de la Universidad Politécnica de Valencia, una de tipo morado (BGV005477), otra de tipo Muchamiel (BGV005651) y otra de fruto amarillo (BGV005718) (ver epígrafe 2.2 del capítulo 2). Se realizó un cultivo de primavera-verano al aire libre, que fue llevado a cabo en las instalaciones de la Universitat Jaume I. El muestreo se realizó siguiendo los criterios explicados en el capítulo 1 (ver epígrafe 2.1). De cada cultivar se cosecharon cuatro frutos en estado maduro (para Zayno RZ se

duplicó el número de muestras en las condiciones que se ha indicado). Estos frutos fueron procesados en el laboratorio (triturado y homogeneización de la muestra) y almacenados a -80°C hasta su posterior análisis.

2.3 Análisis del perfil aromático

El análisis de la fracción volátil se llevó a cabo por medio de una nariz electrónica FOX 4000 (Alpha MOS, Toulouse, France) que consta de 18 sensores de gas semiconductores de óxidos metálicos (MOS, *Metal Oxide Semiconductors*) distribuidos en tres cámaras. La respuesta de los sensores que suele utilizarse en el caso de los sensores de tipo MOS (recomendación sugerida también por la casa comercial que suministra el equipo utilizado, AlphaMOS) es la respuesta máxima normalizada (Skov y Bro. 2005, Gutierrez-Osuna, *et al.* 2003). En este trabajo se estudiará la posibilidad de mejorar los resultados de clasificación al utilizar un mayor número de parámetros de medida que aporten más información sin necesidad de análisis adicionales, ya que estos parámetros son distintos valores extraídos de una misma respuesta. Los parámetros que van a ser medidos se determinan al estudiar cómo se comporta la curva de respuesta de los sensores para una muestra de tomate. En el caso de los sensores de tipo n (Figura C3.1) se aprecia un descenso de la señal hasta alcanzar un valor mínimo y a continuación un ascenso menos pronunciado hasta alcanzar cierta estabilidad en la señal. Esta respuesta viene dada por la variación de resistencia que causan las especies químicas de la muestra al reaccionar con la superficie de la capa activa del sensor. En el caso de los sensores de tipo p , esta variación de resistencia aumenta con el tiempo, de forma que la curva de respuesta crecería en lugar de disminuir, pero la determinación de los parámetros es la misma en ambos casos. De dicha

curva se obtienen de forma directa tres de los parámetros en estudio (respuesta inicial (R_i), respuesta final (R_f) y respuesta máxima (R_{max})) calculándose a partir de ellos el resto de parámetros (incremento de respuesta máxima (ΔR_{max} , calculada como $R_{max}-R_i$), incremento de respuesta final ΔR_f , calculada como $R_{max}-R_f$) y respuesta máxima normalizada (ΔR_{norm}), cuyo valor viene dado por la ecuación:

$$\frac{R_i - R_{max}}{R_i}$$

donde R_i es la resistencia a tiempo cero y R_{max} es la resistencia alcanzada por el sensor en el punto de máxima señal (este punto se alcanza a distinto tiempo, dependiendo de cada sensor)

Este último parámetro no puede observarse en la Figura C3.1 puesto que en este caso se han representado los datos sin transformar, pero este parámetro aparece definido en la Figura C2.1 (capítulo 2). Estos parámetros son similares a los utilizados por Llobet et al. (2004) (Llobet, *et al.* 2004) aunque en su caso la respuesta de los sensores fue dada como conductancia.

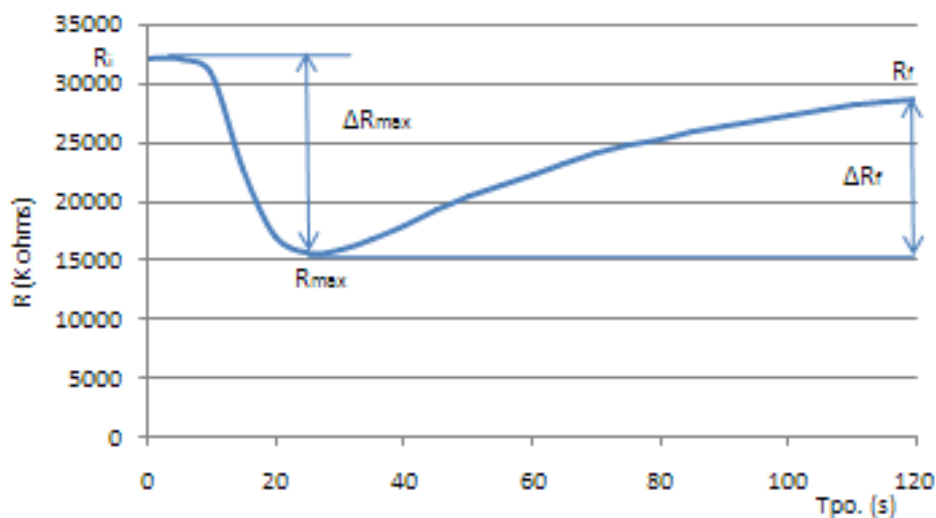


Figura C3.1: Respuesta dada por el sensor PA/2 a una muestra de tomate, representando la variación de resistencia (medido en K ohms) que sufre el sensor al entrar en contacto con la fracción volátil de la muestra frente al tiempo. Aparecen indicados 5 de los parámetros que van a ser determinados: R_i , R_{max} , R_f , ΔR_{max} y ΔR_f

Para la medida de las muestras es necesario generar un espacio de cabeza en el que se contenga la fracción volátil, que será inyectado en la cámara de los sensores para su análisis. Los parámetros involucrados en la generación de este espacio de cabeza (volumen de muestra, tiempo y temperatura de incubación y cantidad de muestra inyectada) influyen de forma determinante en la calidad de la señal obtenida. Pruebas previas permitieron fijar los valores óptimos de tres de ellos (ver capítulo 2 epígrafe 2.3): un volumen de inyección del espacio de cabeza de 2 ml, una temperatura de incubación de 45°C y una cantidad de muestra de 2 g. Sin embargo, la presencia de deriva en los sensores impidió determinar el tiempo de incubación ya que la variación en la respuesta debida a la deriva no permitió obtener un resultado concluyente al respecto. Una vez desarrollada la metodología de corrección de deriva de los sensores y de

estandarización entre días (capítulo 2) es posible retomar dichos estudios para determinar el tiempo de incubación. Aunque esos estudios no permitían fijar un tiempo de incubación de forma concluyente, si que marcaban algunas tendencias, determinando éstas los tiempos de incubación que van a ser utilizados en este trabajo: 5, 10 y 15 minutos.

De cada una de las muestras, se tomaron datos cada segundo durante dos minutos, seguido de un periodo de 18 minutos necesario para que la línea base vuelva a su posición inicial. Entre muestras se hizo pasar aire durante otros dos minutos para asegurar la limpieza de los restos de la muestra anterior que pudieran quedar en el sistema.

2.4 Análisis de datos

Antes de proceder al análisis de los datos generados en este ensayo se ha procedido a corregir la deriva a corto plazo con la metodología basada en la regresión PLS desarrollada en el capítulo 2. También se ha procedido a la eliminación de puntos anómalos previa y a la estandarización entre repeticiones con la metodología de transferencia de calibrado descrita en el capítulo anterior.

Los análisis de clasificación de los distintos cultivares de tomate, llevada a cabo para cada uno de los tratamientos de tiempo combinados con los grupos de parámetros estudiados (18, 108 o tras la selección de variables), se llevará a cabo por medio de un análisis discriminante basado en una regresión por mínimos cuadrados (PLS-DA). La bondad de la clasificación se determinará por medio del porcentaje de aciertos de cada una de las clases basándose en los valores de especificidad y sensibilidad. (ver capítulo 2 epígrafe 2.4)

Para cada uno de los tratamientos de tiempo de incubación, cuando las matrices de huellas electrónicas incluyan parámetros que no estén normalizados será necesario conseguir que todos estén expresados en un mismo tipo de escala, de forma que todos los parámetros tengan de partida el mismo peso en la clasificación. Esto se realizará por medio de un autoescalado. El autoescalado es un método de preprocesado que, para cada variable, centra los datos con respecto a la media y a continuación los divide por la desviación típica (Wise, *et al.* 2006). El uso de matrices con un número tan elevado de parámetros podría hacer más complicado el procesado de datos. Además, alguno de los 108 parámetros utilizados puede que no estén aportando información útil en la clasificación e incluso que estén introduciendo ruido en los resultados. Por ello se intentará reducir el número de parámetros a utilizar y se observará si esta reducción mejora las clasificaciones obtenidas. Para reducir el número de parámetros se llevará a cabo una selección de variables por medio de algoritmos genéticos (GA) ya que es la que numerosos autores recomiendan como más adecuada para utilizar con matrices de huellas electrónicas (Han y Yang. 2004, Jarvis y Goodacre. 2005). El algoritmo genético (Holland. 1992, Lucasius y Kateman. 1994, Lucasius y Kateman. 1993) es un método de búsqueda estocástico basado en la selección y evolución natural, en la que variaciones al azar en el mapa genético de una población combinado con la supervivencia de los individuos de mejor adaptación conducen a una mejora progresiva de la especie.

Los algoritmos genéticos trabajan seleccionando por iteración un subgrupo (o subgrupos) de un conjunto inicial de variables. Para ello utiliza validación cruzada y un método de regresión, determinando el error mínimo cuadrático de la validación cruzada (RMSECV) que se obtiene al utilizar solamente ese subgrupo de variables en el modelo de regresión. Los

algoritmos genéticos localizan el subgrupo de variables que menor valor de RMSECV cometen. El primer paso de los algoritmos genéticos es generar al azar un gran número de selecciones de variables y calcular para cada subgrupo el RMSECV. Cada posible subgrupo de variables se puede representar como una serie de ceros y unos, donde estos números indican el número de variables de ese subgrupo. Cuando una variable viene representada por un uno significa que dicha variable está incluida en el modelo, mientras que un cero para esa variable indica que está excluida. En términos genéticos, a cada subgrupo de variables se les llama individuo mientras que a los unos y ceros que indican que variables se utilizan en el modelo sería el gen para ese individuo. El conjunto de todos los individuos probados es la población. Los valores de RMSECV, descritos como el ajuste de un individuo, indican como de bueno es el modelo obtenido con ese subgrupo de variables. Estos valores son necesarios para una buena selección de individuos, que es el segundo paso en los algoritmos genéticos. Los individuos que presentan un error de ajuste mayor que el error de ajuste medio son descartados, manteniendo aquellos individuos que usan variables que dan valores de RMSECV más bajos. De esta forma, la población ha quedado reducida a la mitad de su tamaño original. Para reponer los individuos que han sido descartados, se generan nuevos individuos a partir de los retenidos por medio de sobre-cruzamiento. Esta combinación se puede llevar a cabo de dos formas: simple o doble sobre-cruzamiento. En el primer caso, los genes de dos individuos se dividen en un punto al azar de su cadena, intercambiándose entre ellos la primera parte de la cadena. De esta forma se generan dos nuevos individuos de la población. El doble sobre-cruzamiento es muy similar al anterior, con la diferencia de que son dos los puntos que se seleccionan al azar para que se divida el gen, siendo las porciones centrales de cada uno de ellos las que se intercambian. La mayor

diferencia práctica es que el doble sobre-cruzamiento genera individuos con menor variación; es decir, las variables seleccionadas en el subgrupo de variables son más parecidas a las que se incluían en un padre o en el otro que si se utiliza sobre-cruzamiento simple (Wise, *et al.* 2006).

Si la población evolucionara sólo por medio de combinaciones, la descendencia nunca incluiría variables que no estuvieran presentes por lo menos en uno de los miembros de la población inicial. Para evitar esto se introducen mutaciones al azar en los genes de todos los individuos: se permite a los genes de la descendencia cambiar al azar de 0 a 1 o de 1 a 0. Así se añade o elimina el uso de variables que podrían estar sobre o infra-representadas en la población.

De esta forma la población vuelve a su tamaño original y el proceso vuelve a comenzar de nuevo a partir del cálculo de RMSECV de cada subgrupo. El análisis terminará después de un número finito de iteraciones o cuando cierto porcentaje de los individuos de la población utilicen subgrupos de variables idénticas.

Al igual que en los casos anteriores, se estudiará el efecto de emplear esta nueva matriz de “huellas electrónicas” (formadas por las variables seleccionadas con el algoritmo genético) en cada uno de los tratamientos de tiempo. Además, se comprobará si esta selección de variables se puede utilizar de manera general para cualquier análisis en muestras de tomate aplicando esta selección en la clasificación de los cultivares estudiados en el capítulo 2.

Las clasificaciones PLS-DA así como la detección de valores anómalos y la selección de variables por medio de algoritmos genéticos se han llevado a cabo por medio de la herramienta PLS_Toolbox v 5.0 (Eigenvector Research Inc, Wenatchee, WA, USA) para Matlab v 7.6.0 (Mathworks Inc, Natick, MA, USA).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los porcentajes de clasificación (Tabla C3.1) de los cinco cultivares estudiados para los tres tratamientos de tiempo de incubación aplicados parecen indicar que el mejor tratamiento de tiempo para una buena clasificación es el correspondiente a 15 minutos (porcentajes de acierto de la clasificación entre 95,8-100%). Para cinco minutos de incubación la clasificación mantiene aproximadamente los mismos porcentajes de acierto, aunque para el cultivar BGV005477 se observó un descenso a tener en cuenta de este porcentaje (pasó de 98,8% para 15 minutos a 92,3% para cinco minutos). La peor clasificación se obtuvo con un tiempo de incubación de 10 minutos, con un rango de porcentaje de aciertos entre 91,1-100%. Se observa también que la mayor variabilidad introducida en el lote Zayno no afecta negativamente a la clasificación (no es el peor clasificado a pesar de tener mayor variabilidad) por lo que el método de clasificación está funcionando bien y no es dependiente del grado de dispersión de las huellas electrónicas medidas en cada cultivar.

Tabla C3.1: Porcentajes de acierto de la validación cruzada en la clasificación PLS-DA de los cinco cultivares estudiados en función del tiempo de incubación empleado en el análisis. El valor de respuesta de los sensores utilizado para esta clasificación ha sido el correspondiente a la respuesta máxima normalizada (18 parámetros).

Tiempo	Zayno	UJI23	BGV005477	BGV005651	BGV005718
5min	95,9	97,8	92,3	100	98,9
10min	93,1	98,9	91,1	100	98,9
15min	95,8	97,7	98,9	100	100

Esta clasificación se realizó teniendo en cuenta un solo tipo de variable, la señal máxima normalizada, procedente de cada uno de los 18 sensores de que dispone el equipo. Se empezó utilizando la señal máxima normalizada de cada sensor porque ésta es la recomendación general que suele hacerse para los sensores tipo MOS (Skov y Bro. 2005, Gutierrez-Osuna, *et al.* 2003). Sin embargo, hay que considerar la posibilidad de que para la evaluación de cultivares de tomate no sea la elección más eficaz. Para comprobar si el uso de un perfil electrónico más amplio, o incluso con parámetros más informativos, mejora los resultados de clasificación al evaluar cultivares de tomate o incluso reduce el tiempo de incubación a utilizar se ha procedido a incluir y seleccionar otros parámetros de perfil electrónico (Llobet, *et al.* 2004, Gualdrón, *et al.* 2006). Con este fin y sin necesidad de realizar nuevos análisis, ya que estos parámetros se obtienen de la propia respuesta del sensor, se determinaron cinco parámetros más para cada sensor (R_i , R_f , R_{max} , ΔR_f y ΔR_{max}) y se procedió a realizar una selección de los parámetros más adecuados para evaluar los cultivares de tomate del ensayo por medio de algoritmos genéticos. A partir de los siete análisis mediante algoritmo genético (cinco con doble sobre-cruzamiento y dos con simple) realizados para cada tratamiento de tiempo de incubación con la matriz de señal electrónica ampliada se han seleccionado las variables que con más frecuencia utilizan los mejores modelos de cada tratamiento como variables ideales para llevar cabo la clasificación con cada uno de los tiempos de incubación probados (Tabla C3.2).

Capítulo 3

Tabla C3.2: Variables seleccionadas para cada uno de los tiempos de incubación, siendo R_i la respuesta inicial, R_f la respuesta final, R_{max} la respuesta máxima, ΔR_{max} el incremento de respuesta máxima, ΔR_f el incremento de respuesta final y ΔR_{norm} el incremento de respuesta máxima normalizada.

Parámetro	Sensores		
	5 minutos	10 minutos	15 minutos
R_i	LY2/G, P30/1	LY2/G, LY2/GH P40/1	LY2/G, LY2/gCTI P10/2, P40/2
R_f	LY2/G, LY2/gCTI T30/1, T70/2	LY2/gCTI, P30/1	LY2/gCTI, T30/1 P10/2, T70/2 P40/2, TA/2
R_{max}	T70/2, P30/1 T40/2	PA/2, P30/1 P30/2, T40/2 T40/1	LY2/AA, P10/1 P40/1, PA/2 P30/1
ΔR_{max}	LY2/G, LY2/GH LY2/gCTI, LY2/gCT	LY2/LG, LY2/G LY2/AA, LY2/gCTI LY2/gCT, P10/1 P30/1, P30/2 T40/2	LY2/LG, LY2/G LY2/gCT, P10/1 P40/2, T40/2
ΔR_f	LY2/G, LY2/GH TA/2	LY2/G, LY2/AA LY2/gCT, P10/1 PA/2, P40/2	LY2/LG, LY2/gCT, T30/1 T70/2, TA/2
ΔR_{norm}	LY2/LG, LY2/G LY2/GH, LY2/gCT P10/1, P10/2 P30/1, P40/2 T40/2, T40/1	LY2/LG, LY2/G LY2/GH, LY2/gCTI LY2/gCT, P10/1 P40/1, PA/2, P30/1, P40/2, T40/2, T40/1	LY2/LG, LY2/GH P10/1, P10/2 PA/2, P30/1 P40/2, T40/2
Total	26	37	34

Como puede verse, para cualquiera de los tratamientos se han incluido más parámetros de los inicialmente recomendados. Además, en todos los casos, aunque el parámetro que se repite con más frecuencia para todos los tiempos es el correspondiente a la respuesta máxima normalizada (parámetro recomendado en el caso de los sensores de tipo MOS), también se seleccionan otros parámetros que están contribuyendo a mejorar la clasificación de las muestras. También se observa que la selección de parámetros es dependiente de las condiciones de análisis (tiempo de incubación en este caso) porque aunque once de los parámetros seleccionados son comunes a los tres tiempos, también existen parámetros que sólo se seleccionan en alguno de los tratamientos de tiempo. Otros autores también han indicado que la selección de variables para optimizar el uso de sensores electrónicos es muy dependiente del proceso en estudio (Chaudry, *et al.* 2000, Jones. 1999). En nuestro caso, es lógico ya que el tiempo de incubación condiciona la composición del espacio en cabeza generado (hay compuestos más volátiles que otros) y por tanto la cantidad de estímulo que recoge cada sensor. El proceso de selección de variables proporciona información adicional sobre la importancia relativa de los sensores para la clasificación de los genotipos de tomate estudiados en cada una de las condiciones ensayadas, ya que aquellos que aportan mayor número de parámetros son los que han contribuido en mayor medida en el análisis. Por ejemplo, en el caso de la selección de variables llevada a cabo con las respuestas obtenidas tras quince minutos de incubación, el sensor P30/2 no contribuye en la clasificación ya que no ha sido seleccionado ningún parámetro relacionado con él, mientras que en el caso de los sensores LY2/LG, P10/1, P10/2 y P40/2 se han seleccionado la mitad o más de sus parámetros (Tabla C3.2) siendo sensores de gran relevancia en la clasificación en estas condiciones.

Tras el análisis de algoritmos genéticos se ha vuelto a realizar la clasificación PLS-DA para cada uno de los tratamientos de tiempo, esta vez con las variables seleccionadas en el análisis obteniéndose una mejora sustancial en la clasificación. En los tratamientos de 5 y 15 minutos de incubación, el porcentaje de acierto fue del 100% para todos los cultivares. Con 10 minutos de incubación el cultivar BGV005477 obtuvo un 98.9% de aciertos y el resto un 100%. Por tanto, el proceso de selección de variables si que mejora el uso de la nariz electrónica para clasificar cultivares de tomate permitiendo obtener eficacias muy elevadas. Este resultado corrobora lo observado por otros autores (Yu, *et al.* 2008, Chaudry, *et al.* 2000, Llobet, *et al.* 2004). Por lo que respecta al tiempo de incubación, si se utilizan los parámetros óptimos para clasificación, con 5 minutos de incubación serían suficientes para clasificar cultivares, reduciendo con ello el tiempo de análisis. No obstante, sería conveniente comprobar la composición del espacio de cabeza que se genera al incubar las muestras 5 y 15 minutos (las mejores condiciones de clasificación) con el fin de seleccionar definitivamente el tiempo de incubación que garantice la mayor presencia de los aromas que los paneles de cata han citado como más importantes a la hora de definir los atributos de aroma y sabor en tomate (Yilmaz. 2001, Tandon, *et al.* 2000, Buttery y Ling. 1993a). De este modo, se garantizará que la evaluación del perfil electrónico compara cultivares por características decisivas para su aceptación.

Finalmente, es importante también comprobar si la selección de variables que los análisis anteriores han señalado como las más adecuadas es aplicable a cualquier ensayo de evaluación del perfil aromático electrónico de cultivares de tomate o si es específica para un lote concreto de cultivares, en cuyo caso, para mejorar la eficacia de la clasificación habría que realizarla cada vez. Con este fin se han recuperado las matrices de huellas

electrónicas del ensayo descrito en el capítulo 2. Se ha realizado una clasificación de estos cultivares evaluados en el capítulo 2 pero utilizando una matriz de huellas electrónicas con los parámetros que en la Tabla C3.2 se indican como óptimos para el tratamiento de 10 minutos de incubación (condiciones con las que se analizaron estas muestras). Se ha realizado una selección de variables mediante algoritmo genético propia para las huellas electrónicas obtenidas en el ensayo del capítulo 2, utilizándolas posteriormente para clasificar esos cultivares y finalmente se ha incluido una clasificación utilizando los 108 parámetros de medida de la matriz de huella electrónica del capítulo 2 (Tabla C3.3). Para poder comparar los resultados, se realizará primero una clasificación con los 108 parámetros de medida (en el capítulo 2 sólo se hizo con 18 parámetros) y de ellos se realizará una selección de variables propia.

Tabla C3.3: Porcentaje de aciertos de validación cruzada en la clasificación PLS-DA para cada uno de los genotipos analizados en el Capítulo 2. Se muestran los resultados obtenidos en función del número de variables utilizadas en la clasificación: 18 (sólo parámetros de señal máxima normalizada), 108 (todos los parámetros), 37 variables seleccionadas mediante algoritmos genéticos en los datos del capítulo 2 (GA-2) y 44 las variables obtenidas en el análisis de algoritmos genéticos de las muestras de este capítulo (GA-3)

Nº variables	Caramba	Zayno	UJ11	UJ23	BGV005477	BVG005651	BGV005718	Patrón
18	87	99,3	80,2	100	98,6	90,8	96,9	100
108	96,9	99,7	94,6	100	98,3	92,4	96,9	100
37 GA-2	98,6	99,7	96,2	100	99	95,3	95,9	100
44 GA-3	90,6	99,3	86,3	97,5	98,6	86,7	94,5	100

Como cabía esperar, la clasificación mejora si se realiza con 108 parámetros en lugar de los 18 correspondientes a la respuesta máxima normalizada (Tabla C3.3) puesto que el algoritmo de clasificación dispone de mucha más información y afina más en la clasificación. Si se realiza una selección de variables por algoritmos genéticos de estas respuestas, se seleccionan 44 variables de las que sólo 11 coinciden con las obtenidas en el presente capítulo para un tiempo de incubación de 10 minutos. Al realizar la clasificación con estas 44 variables (GA-2, Tabla C3.3) ésta mejora con respecto a la clasificación llevada a cabo con los 108 parámetros. Sin embargo, la clasificación utilizando las 37 variables obtenidas en la selección realizada con los resultados obtenidos en el análisis de los 5 genotipos del presente estudio (GA-3, Tabla C3.3) obtiene unos porcentajes de acierto menores para todos los genotipos, excepto para el caso del patrón sintético que sigue siendo del 100%. En el Capítulo 2 fueron analizados 7 cultivares distintos de tomate (5 de ellos coinciden con los analizados en este ensayo) y el patrón sintético. En consecuencia, la selección de variables realizada es dependiente del lote de cultivares de tomate incluidos en la matriz de huellas electrónicas utilizada para calcularla. Puesto que este tipo de análisis de selección de variables requiere gran cálculo computacional (lo que se traduce en un tiempo de análisis considerable, dependiendo de la potencia del procesador) y teniendo en cuenta que se pretenden crear librerías que vayan incrementando el número de muestras a medida que se realizan análisis (todas deben ser obtenidas en las mismas condiciones) estas librerías deben incluir todos los parámetros de huella electrónica posibles. Posteriormente, para comparaciones de lotes concretos, se puede realizar si se quiere una selección de parámetros específica siguiendo la metodología descrita con el fin de mejorar las comparaciones entre cultivares.

4. CONCLUSIONES

1. El uso de un mayor número de parámetros de medida (R_i , R_f , R_{\max} , ΔR_f , ΔR_{\max} , ΔR_{norm}) obtenidos a partir de la respuesta dada por los sensores a los compuestos volátiles del tomate mejora la clasificación de cultivares si se compara con la obtenida cuando sólo se utiliza el parámetro de medida (ΔR_{norm}) que normalmente se emplea para los sensores de tipo MOS.
2. Tiempos de incubación de 5 y 15 minutos proporcionan un buen resultado para la clasificación de muestras de tomate con el equipo de nariz electrónica utilizado. Sin embargo, para determinar cuál de ellos es el tiempo óptimo para este tipo de análisis serían necesarios estudios que permitieran determinar la composición de volátiles generada por cada uno de estos tiempos. La elección del tiempo óptimo vendrá condicionada por la capacidad que dicho tiempo tenga para hacer pasar al espacio de cabeza los principales compuestos aromáticos que condicionan la percepción del aroma de los frutos de tomate.
3. La selección de variables por medio de algoritmos genéticos para los parámetros utilizados en el análisis de muestras de tomate permite una cierta mejora en los modelos de clasificación, pero no se trata de una técnica generalizable cuando la selección obtenida se aplica a otras secuencias de trabajo. Esto hace que no sea conveniente su uso cuando se busca establecer librerías de huellas electrónicas, pero si posteriormente cuando se quiere mayor precisión para comparar los cultivares de un lote concreto.

5. BIBLIOGRAFÍA

Alpha SOFT 1994 Software Manual Version 9.

Beltran, J.; Serrano, E.; López, F. J.; Valcárcel, M.; Roselló, S. 2006 Comparison of two quantitative GC-MS methods for analysis of tomato aroma based on purge-and-trap and on solid-phase microextraction. *Anal Bioanal Chem.* , 385, 1255-1264.

Brezmes, J.; Cabre, P.; Rojo, S.; Llobet, E.; Vilanova, X.; Correig, X. 2005 Discrimination between different samples of olive oil using variable selection techniques and modified fuzzy artmap neural networks. *Sensors Journal, IEEE* , 5, 463-470.

Brezmes, J.; Llobet, E.; Vilanova, X.; Orts, J.; Saiz, G.; Correig, X. 2001 Correlation between electronic nose signals and fruit quality indicators on shelf-life measurements with pinklady apples. *Sensors Actuators B: Chem.* , 80, 41-50.

Buttery, P. G.; Ling, L. C. 1993a Volatile components of tomato fruit and plants parts. Relationships and biogenesis. *Amer. Chem. Soc.* , 525, 23-34.

Buttery, R. G.; Ling, L. C. 1993b Volatile components of tomato fruit and plants. *Bioactive volatile compounds from plants* , 525, 24-34.

Carmel, L.; Levy, S.; Lancet, D.; Harel, D. 2003 A feature extraction method for chemical sensors in electronic noses. *Sensors and actuators b-chemical* , 93, 67-76.

Cebolla-Cornejo, J.; Roselló, S.; Beltran, J.; Serrano, E.; Nuez, F. 2006 Análisis de perfiles aromáticos en variedades tradicionales y comerciales de tomate.. *Actas de Horticultura* , 45, 61-62.

Chaudry, A. N.; Hawkins, T. M.; Travers, P. J. 2000 A method for selecting an optimum sensor array. *Sensors and Actuators B: Chemical* , 69, 236-242.

- Everitt, B.** In *Cluster Analysis*, HEB Ltd.: London, 1974; .
- Farnworth, E. R.; McKellar, R. C.; Chabot, D.; Lapointe, S.; Chicoine, M.; Knight, K. P.** 2002 Use of an electronic nose to study the contribution of volatiles to orange juice flavor. *J-food-quality. Trumbull, Conn. : Food & Nutrition Press Inc. , 25*, 569-576.
- Freedman, D. A.** 1983 A note on screening regression equations. *The American Statistician , 27*, 152-155.
- Geladi, P.; Kowalski, B. R.** 1986 Partial least-squares regression: a tutorial. *Analytica Chimica Acta , 185*, 1-17.
- Gualdrón, O.; Llobet, E.; Brezmes, J.; Vilanova, X.; Correig, X.** 2006 Coupling fast variable selection methods to neural network-based classifiers: Application to multisensor systems. *Sensors and Actuators B: Chemical , 114*, 522-529.
- Gutierrez-Osuna, R.; Nagle, H. T.; Kermani, B.; Schiffman, S. S.** 2003; *Signal Conditioning and Preprocessing*; En Pearce, T. C., Schiffman, S. S., Nagle, H. T. and Gardner, J. W., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, Chapter 5,p 105.
- Han, S. H.; Yang, H.** 2004 Screening important design variables for building a usability model: genetic algorithm-based partial least-squares approach. *International Journal of Industrial Ergonomics , 33*, 159-171.
- Han, S. H.; Yun, M. H.; Kim, K.; Kwahk, J.** 2000 Evaluation of product usability: development and validation of usability dimensions and design elements based on empirical models. *International Journal of Industrial Ergonomics , 26*, 477-488.
- Hernández Gómez, A.; Hu, G.; Wang, J.; García Pereira, A.** 2006a Evaluation of tomato maturity by electronic nose. *Computers and Electronics in Agriculture , 54*, 44-52.

- Hernández Gómez, A.; Wang, J.; Hu, G.; García Pereira, A.** 2006b Electronic nose technique potential monitoring mandarin maturity. *Sensors and Actuators B: Chemical* , 113, 347-353.
- Hernández Gómez, A.; Wang, J.; Hu, G.; García Pereira, A.** 2007 Monitoring storage shelf life of tomato using electronic nose technique. *Journal of Food Engineering* , 85, 625-631.
- Holland, J. H.** 1992 Genetic algorithms. *Scientific american* , 267, 66.
- Jarvis, R. M.; Goodacre, R.** 2005 Genetic algorithm optimization for pre-processing and variable selection of spectroscopic data. *Bioinformatics* , 21, 860-868.
- Jolliffe, I. T.** 1986 In *Principal Component Analysis*, Springer: New York.
- Jones, J.** 1999 In *Tomato plant culture. In the field, greenhouse and home garden*, USA, pp 250.
- Korel, F.; Bagdatlioglu, N.; Balaban, M. O.; Hisil, Y.** 2002 Ground red peppers: capsaicinoids content, Scoville scores, and discrimination by an electronic nose. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* , 50, 3257-3261.
- Llobet, E.; Brezmes, J.; Gualdrón, O.; Vilanova, X.; Correig, X.** 2004 Building parsimonious fuzzy ARTMAP models by variable selection with a cascaded genetic algorithm: application to multisensor systems for gas analysis. *Sensors and Actuators B: Chemical* , 99, 267-272.
- Llobet, E.; Hines, E. L.; Gardner, J. W.; Franco, S.** 1999 Non-destructive banana ripeness determination using a neural network-based electronic nose. *Measurement Science and Technology* , 10, 538-548.

-
- Lucasius, C. B.; Kateman, G.** 1993 Understanding and using genetic algorithms. Part 1. Concepts, properties and context. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* , 19, 1-33.
- Lucasius, C. B.; Kateman, G.** 1994 Understanding and using genetic algorithms. Part 2. Representation, configuration and hybridization. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* , 25, 99-145.
- Mantel, N.** 1970 Why stepdown procedures in variable selection. *Technometrics* , 12, 621-625.
- Neter, J.; Kutner, M. H.; Nachtsheim, C. J.; Wasserman, W.** In *Applied Linear Statistical Model*, R.D. Irwin: Boston, 1996; .
- Roussel, S.; Forsberg, G.; Steinmetz, V.; Grenier, p.; Bellon-Maurel, V.** 1998 Optimisation of electronic nose measurements. Part I: Methodology of output feature selection. *Journal of Food Engineering* , 37, 207-222.
- Skov, T.; Bro, R.** 2005 A new approach for modelling sensor based data. *Sens. actuators, B* , 106, 719-729.
- Tandon, K. S.; Baldwin, E. A.; Shewfelt, R. L.** 2000 Aroma perception of individual volatile compounds in fresh tomatoes (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) as affected by the medium of evaluation. *Postharvest Biology and Technology* , 20, 261-268.
- Wise, B. M.; Gallagher, N. B.; Bro, R.; Shaver, J. M.; Windig, W.; Koch, R. S.** 2006 PLS_Toolbox Version 4 for use with MATLAB™. *Eigenvector Research, Inc.* .
- Yilmaz, E.** 2001 The chemistry of fresh tomato flavor. *Turk J Agric For* , 25, 149-155.
- Yu, H.; Wang, J.; Zhang, H.; Yu, Y.; Yao, C.** 2008 Identification of green tea grade using different feature of response signal from E-nose sensors. *Sensors and Actuators B* , 128, 455-461.



Conclusiones generales

1. El uso de la técnica de espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR) permite predecir con unos errores aceptables la composición de sustancias químicas de diversa naturaleza implicadas en la calidad interna del tomate. El hecho de que sea una técnica rápida y no destructiva junto con la posibilidad de predecir la composición de gran número de sustancias (en este caso tres ácidos, dos azúcares y 38 compuestos volátiles) con una simple medida, hacen de ella una técnica muy útil para la preselección de genotipos de tomate, ya que cuando se trabaja con grandes cantidades de muestras es impensable llevarla a cabo por medio de técnicas más precisas.
2. Es necesario realizar calibrados con otros métodos analíticos debido a la distorsión que diversas propiedades físicas de los frutos provocan en los espectros. Esta calibración no es generalizable de unos ensayos a otros, ya que aspectos como diferencias en material vegetal o ambiente de cultivo hacen que al usar estos modelos de unos ensayos a otros los errores de predicción aumenten considerablemente. Por lo tanto, estos modelos de calibrado deben hacerse para cada ensayo. Lo que si es generalizable es la utilización de la metodología desarrollada en este trabajo para la obtención de estos modelos, que permite obtener unos resultados satisfactorios.
3. Los sensores de tipo MOS utilizados (LY/LG, LY/G, LY/AA, LY/GH, LY/gCT1, LY/gCT, T30/1, P10/1, P10/2, P40/1, T70/2, PA2, P30/1, P40/2, P30/2, T40/2, T40/1, TA2) en la nariz electrónica de la que se dispone sufren deriva con el tiempo, apreciable tanto en una secuencia de trabajo como en muestras analizadas en secuencias de trabajo distintas. Esta deriva dificulta la interpretación de los resultados,

complicando la construcción de librerías, al introducir una dispersión que perjudica la identificación de las muestras y hacer que estas no sean comparables entre análisis. Por lo tanto, la corrección de la deriva y la estandarización entre muestras analizadas en distintas secuencias es necesaria si se quiere aprovechar todo el potencial que puede aportar el uso de una nariz electrónica.

4. De los dos métodos probados para la corrección de deriva, la aproximación univariante no es efectiva en tomate y las condiciones de trabajo utilizadas en este estudio. La hipótesis inicial (que la deriva en las muestras reales se comporta exactamente igual que la muestra de referencia) obliga a ajustar los puntos a una curva que, a pesar de haber utilizado una regresión no paramétrica para no condicionar la tendencia dada por los puntos, no se ajusta por igual en todos los casos y en estas condiciones este planteamiento no es capaz de eliminar satisfactoriamente la deriva. Sin embargo, la corrección de componentes por medio de la regresión PLS muestra unos resultados muy satisfactorios, habiéndose comprobado su efectividad en tres días de trabajo distintos. Una diferencia muy importante con respecto al método anterior, es que en este caso no existen hipótesis iniciales que puedan ser limitantes, de forma que es la propia regresión la que determina que parte de la señal está relacionada con el tiempo, facilitando así una función más ajustada a cada caso y permitiendo además eliminar cualquier tipo de deriva que esté relacionada con el tiempo.

5. La estandarización entre muestras por medio de la técnica PDS permite eliminar las diferencias significativas entre repeticiones de una misma muestra analizadas en días de trabajo distintos. Esta estandarización se ha llevado a cabo utilizando como referencia las propias muestras analizadas ya que estas se repetían a lo largo de todas las secuencias de trabajo. Sin embargo, para el análisis rutinario, es necesario desarrollar muestras de referencia representativas del grupo de muestras a analizar, ya que en él lo normal es que no se repitan todos los cultivares en las distintas secuencias de trabajo.

6. Una vez corregida la deriva y estandarizadas las muestras, el uso de la nariz electrónica es una técnica efectiva para la identificación y clasificación de distintos cultivares de tomate. La nariz electrónica es una prometedora herramienta para la selección de material vegetal en frutos de tomate, ya que a través de los perfiles aromáticos obtenidos permite establecer grupos bien definidos que por su posición en el espacio muestran diferencias y semejanzas entre los cultivares analizados.

7. El uso de un mayor número de parámetros de medida (R_i , R_f , R_{max} , ΔR_f , ΔR_{max} , ΔR_{norm}) obtenidos a partir de la respuesta dada por los sensores a los compuestos volátiles del tomate mejora la clasificación de cultivares si se compara con la obtenida cuando sólo se utiliza el parámetro de medida (ΔR_{norm}) que normalmente se emplea para los sensores de tipo MOS.

8. Tiempos de incubación de 5 y 15 minutos proporcionan un buen resultado para la clasificación de muestras de tomate con el equipo de nariz electrónica utilizado. Sin embargo, para determinar cuál de ellos es el tiempo óptimo para este tipo de análisis serían necesarios estudios que permitieran determinar la composición de volátiles generada por cada uno de estos tiempos. La elección del tiempo óptimo vendrá condicionada por la capacidad que dicho tiempo tenga para hacer pasar al espacio de cabeza los principales compuestos aromáticos que condicionan la percepción del aroma de los frutos de tomate.

9. La selección de variables por medio de algoritmos genéticos para los parámetros utilizados en el análisis de muestras de tomate permite una cierta mejora en los modelos de clasificación, pero no se trata de una técnica generalizable cuando la selección obtenida se aplica a otras secuencias de trabajo. Esto hace que no sea conveniente su uso cuando se busca establecer librerías de huellas electrónicas, pero si posteriormente cuando se quiere mayor precisión para comparar los cultivares de un lote concreto.

