



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID  
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS  
Dpto. Ingeniería Rural

Desarrollo de una aplicación a la detección  
de aromas para una nariz electrónica del  
tipo Microbalanzas de Cristal de Cuarzo  
(QCM) para su adaptación a la  
determinación de calidad en frutas

TESIS DOCTORAL  
EVA CRISTINA CORREA HERNANDO  
MADRID, 2003



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID  
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS  
Dpto. Ingeniería Rural

Desarrollo de una aplicación a la detección  
de aromas para una nariz electrónica del  
tipo Microbalanzas de Cristal de Cuarzo  
(QCM) para su adaptación a la  
determinación de calidad en frutas

Doctoranda: Eva Cristina Correa Hernando

Directora: Margarita Ruiz Altisent

Co-directora: Pilar Barreiro Elorza

Madrid, marzo 2003

*A mis padres*

*“Ve usted mi querido Watson – apoyó su tubo de ensayo en el estante  
y empezó a hablar con el aspecto de un profesor que se dirige a  
su clase – no es difícil elaborar una serie de hipótesis, en que  
cada una dependa de la anterior y cada una de ellas sea sencilla  
en sí misma... todo problema resulta infantil cuando se ha explicado”.*

*La Aventura de los Bailarines*

---

## Agradecimientos

Quisiera agradecer al comienzo de este trabajo la ayuda prestada por todas aquellas personas y entidades que han hecho posible la realización del mismo, y en especial:

a Dña. Margarita Ruiz Altisent, Catedrática de la E.T.S. de Ingenieros Agrónomos de Madrid, por su acertada labor de enfoque y dirección así como su constante apoyo,

a Dña. Pilar Barreiro Elorza, Profesora titular de la E.T.S. de Ingenieros Agrónomos de Madrid, por su dedicación en la dirección y orientación de este trabajo,

al Ministerio de Ciencia y Tecnología por la financiación del proyecto nacional CICYT, ALI1998-0960-C02-01, titulado: "Evaluación no destructiva de la calidad de frutos mediante la integración de sensores electrónicos de aromas, en diferentes tecnologías de frigoconservación (AROFRU)", dentro del cual se enmarcan la mayor parte de los trabajos que se presentan en esta Tesis,

a la Comisión Europea por la financiación de la Acción Concertada "ASTEQ", acrónimo de "Artificial Sensing Techniques for Evaluating Quality", dentro de la cual se realizaron ensayos colaborativos internacionales, algunos de cuyos resultados se utilizan en este trabajo,

a la Universidad Politécnica de Madrid por la concesión de la Beca de Investigación para la realización del Doctorado en el Dpto. de Ingeniería Rural de la E.T.S. de Ingenieros Agrónomos de Madrid,

a Dña. M<sup>a</sup> Luisa López Fructuoso y su equipo del Laboratorio de Postcosecha del IRTA de la Universidad de Lleida, especialmente a Rosa Miró y Gemma Echevarría, por facilitar las muestras, por su disponibilidad y colaboración,

a D. Corrado di Natale, D. Arnaldo d'Amico y a su equipo del Departamento de Ingeniería Electrónica de la Universidad de "Tor Vergata" de Roma, especialmente a Alessandro Mantini, Eugenio Martinelli y Antonella Macagnano por su disposición en todo momento y colaboración durante mis estancias en esta Universidad,

a D. Stijn Saevels y D. Bart Nicolai, de la Universidad Católica de Lovaina, por su apoyo durante mi estancia en esta Universidad,

## INDICE

<b><u>1.</u></b>	<b><u>RESUMEN Y ABSTRACT</u></b>	1
1.1.	Resumen	1
1.2.	Abstract	2
<b><u>2.</u></b>	<b><u>INTRODUCCIÓN</u></b>	4
2.1.	Proyecto de investigación AROFRU	4
2.2.	Proyecto de investigación ASTEQ	5
2.3.	Cronología en la realización de los trabajos	5
<b><u>3.</u></b>	<b><u>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</u></b>	6
3.1.	El mercado de la fruta dulce: manzanas y peras	6
3.2.	El consumidor y la calidad	7
3.3.	La calidad del fruto	8
3.4.	Calidad sensorial. Importancia del aroma en la calidad de la fruta	8
3.5.	Normativa y control de la calidad durante la producción	9
3.6.	¿Por qué una nariz electrónica para la determinación de la calidad aromática en frutos?	10
<b><u>4.</u></b>	<b><u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u></b>	13
4.1.	Conceptos y definiciones relativos al aroma en la fruta	13
4.1.1.	Sensación sabor-olor o flavor	13
4.1.2.	Umbral de olor	14
4.1.3.	Valor aromático	14
4.1.4.	Compuestos impacto y contributivos del aroma	15
4.2.	Caracterización aromática de la fruta de pepita	16
4.2.1.	Manzana ( <i>Malus domestica</i> )	16
4.2.1.1.	<i>Compuestos predominantes según la variedad</i>	16
4.2.1.2.	<i>Compuestos contributivos e impacto del aroma según la variedad.</i>	18

## Agradecimientos

Quisiera agradecer al comienzo de este trabajo la ayuda prestada por todas aquellas personas y entidades que han hecho posible la realización del mismo, y en especial:

a Dña. Margarita Ruiz Altisent, Catedrática de la E.T.S. de Ingenieros Agrónomos de Madrid, por su acertada labor de enfoque y dirección así como su constante apoyo,

a Dña. Pilar Barreiro Elorza, Profesora titular de la E.T.S. de Ingenieros Agrónomos de Madrid, por su dedicación en la dirección y orientación de este trabajo,

al Ministerio de Ciencia y Tecnología por la financiación del proyecto nacional CICYT, ALI1998-0960-C02-01, titulado: "Evaluación no destructiva de la calidad de frutos mediante la integración de sensores electrónicos de aromas, en diferentes tecnologías de frigoconservación (AROFRU)", dentro del cual se enmarcan la mayor parte de los trabajos que se presentan en esta Tesis,

a la Comisión Europea por la financiación de la Acción Concertada "ASTEQ", acrónimo de "Artificial Sensing Techniques for Evaluating Quality", dentro de la cual se realizaron ensayos colaborativos internacionales, algunos de cuyos resultados se utilizan en este trabajo,

a la Universidad Politécnica de Madrid por la concesión de la Beca de Investigación para la realización del Doctorado en el Dpto. de Ingeniería Rural de la E.T.S. de Ingenieros Agrónomos de Madrid,

a Dña. M<sup>a</sup> Luisa López Fructuoso y su equipo del Laboratorio de Postcosecha del IRTA de la Universidad de Lleida, especialmente a Rosa Miró y Gemma Echevarría, por facilitar las muestras, por su disponibilidad y colaboración,

a D. Corrado di Natale, D. Arnaldo d'Amico y a su equipo del Departamento de Ingeniería Electrónica de la Universidad de "Tor Vergata" de Roma, especialmente a Alessandro Mantini, Eugenio Martinelli y Antonella Macagnano por su disposición en todo momento y colaboración durante mis estancias en esta Universidad,

a D. Stijn Saevels y D. Bart Nicolaï, de la Universidad Católica de Lovaina, por su apoyo durante mi estancia en esta Universidad,

a los investigadores y profesionales que han participado en la Acción Europea "ASTEQ", por su colaboración en todos los trabajos conjuntos, y especialmente a D. Patrick Mielle por sus consejos y su amistad,

a D. Pedro Caballero de la Universidad de Valladolid "Campus de Palencia" por su interés en nuestro trabajo, que llevó a la realización en colaboración con el grupo de investigación del LPF del proyecto fin de carrera del alumno de aquella universidad D. Andrés García, que versó sobre la aplicación de las narices electrónicas en vinos, algunos de cuyos resultados se presentan en este trabajo,

a los compañeros y amigos del Laboratorio de Propiedades Físicas del Departamento de Ingeniería Rural de la E.T.S. de Ingenieros Agrónomos de Madrid, tanto a los que trabajaron codo a codo conmigo: Belén Diezma, Constantino Valero, Lourdes Lleó, Javier García, Luis Flores, Coral Ortiz, Ian Homer, Samuel Bonete y Germán Valcárcel-Resalt, como a lo que ahora toman el relevo de nuestras investigaciones Natalia Hernández, María Marín, Adolfo Moya, Mónica García, Luis Ruiz, Pablo Gutiérrez y José Rodríguez por su amistad, apoyo y compañía,

a Jose Luis García, Profesor Titular de la E.T.S. de Ingenieros Agrónomos y a D. Jaime Ortiz-Cañavate, Catedrático de la E.T.S. de Ingenieros Agrónomos, por su disponibilidad y apoyo en la realización de esta Tesis,

al resto de profesores y funcionarios del Departamento, por su amistad.

Finalmente a mis hermanos Mariano y Victor, y a mi marido Oscar quien siempre ha dicho, no sin razón, que debería haber aprobado algunas de las asignaturas de la carrera de Ingeniero Agrónomo, a los tres por su apoyo incondicional.

## **INDICE**

<b><u>1.</u></b>	<b><u>RESUMEN Y ABSTRACT</u></b>	<b>1</b>
<b>1.1.</b>	<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>1.2.</b>	<b>Abstract</b>	<b>2</b>
<b><u>2.</u></b>	<b><u>INTRODUCCIÓN</u></b>	<b>4</b>
<b>2.1.</b>	<b>Proyecto de investigación AROFRU</b>	<b>4</b>
<b>2.2.</b>	<b>Proyecto de investigación ASTEQ</b>	<b>5</b>
<b>2.3.</b>	<b>Cronología en la realización de los trabajos</b>	<b>5</b>
<b><u>3.</u></b>	<b><u>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</u></b>	<b>6</b>
<b>3.1.</b>	<b>El mercado de la fruta dulce: manzanas y peras</b>	<b>6</b>
<b>3.2.</b>	<b>El consumidor y la calidad</b>	<b>7</b>
<b>3.3.</b>	<b>La calidad del fruto</b>	<b>8</b>
<b>3.4.</b>	<b>Calidad sensorial. Importancia del aroma en la calidad de la fruta</b>	<b>8</b>
<b>3.5.</b>	<b>Normativa y control de la calidad durante la producción</b>	<b>9</b>
<b>3.6.</b>	<b>¿Por qué una nariz electrónica para la determinación de la calidad aromática en frutos?</b>	<b>10</b>
<b><u>4.</u></b>	<b><u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u></b>	<b>13</b>
<b>4.1.</b>	<b>Conceptos y definiciones relativos al aroma en la fruta</b>	<b>13</b>
<b>4.1.1.</b>	<b>Sensación sabor-olor o flavor</b>	<b>13</b>
<b>4.1.2.</b>	<b>Umbral de olor</b>	<b>14</b>
<b>4.1.3.</b>	<b>Valor aromático</b>	<b>14</b>
<b>4.1.4.</b>	<b>Compuestos impacto y contributivos del aroma</b>	<b>15</b>
<b>4.2.</b>	<b>Caracterización aromática de la fruta de pepita</b>	<b>16</b>
<b>4.2.1.</b>	<b>Manzana (Malus domestica)</b>	<b>16</b>
<b>4.2.1.1.</b>	<b><i>Compuestos predominantes según la variedad</i></b>	<b>16</b>
<b>4.2.1.2.</b>	<b><i>Compuestos contributivos e impacto del aroma según la variedad.</i></b>	<b>18</b>



	<i>Descripción aromática.</i>	
4.2.2.	Pera ( <i>Pyrus communis</i> L)	20
4.2.2.1	<i>Compuestos predominantes según la variedad</i>	20
4.2.2.2.	<i>Compuestos contributivos e impacto del aroma según la variedad.</i>	21
	<i>Descripción aromática</i>	
4.2.3.	Manzana vs Pera	22
<b>4.3.</b>	<b>Factores externos que afectan a la composición aromática de la fruta tras la recolección</b>	<b>23</b>
4.3.1.	Fecha de recolección	23
4.3.2.	Tipo de frigoconservación	23
4.3.3.	Duración de la conservación frigorífica	25
4.3.4.	Vida en estantería	26
<b>4.4.</b>	<b>Técnicas para la medida del olor</b>	<b>27</b>
4.4.1.	Cromatografía de gases	27
4.4.2.	Espectrometría de masas	29
4.4.3.	Espectrometría de masas de "fingerprint" (EMF)	30
4.4.4.	Análisis sensorial y olfatometría	31
4.4.4.1.	<i>El mecanismo del olfato</i>	31
4.4.4.2.	<i>El análisis sensorial</i>	31
4.4.5.	Técnicas combinadas de análisis	33
4.4.5.1.	<i>Cromatografía de gases/Espectrometría de masas (CG/EM)</i>	33
4.4.5.2.	<i>Cromatografía de gases - olfatometría (CGO)</i>	34
4.4.5.3.	<i>Cromatografía de gases - nariz electrónica (CG-NE)</i>	35
4.4.6.	Estimación de la emisión aromática	36
<b>4.5.</b>	<b>Narices electrónicas</b>	<b>39</b>
4.5.1.	Preparación, acondicionamiento y transferencia de la muestra	40
4.5.2.	Medida de la muestra gaseosa - sensores de gases	45
4.5.3.	Medida de la muestra gaseosa - matrices de sensores	63
4.5.4.	Análisis de datos - Reconocimiento de patrones	64
4.5.5.	Fuentes de error en una nariz electrónica	67
4.5.6.	Ventajas e inconvenientes del uso de una nariz electrónica	71
4.5.7.	Modelos comerciales y prototipos de narices electrónicas	72
4.5.8.	Aplicaciones de las narices electrónicas	76

4.5.8.1. <i>Industria hortofrutícola</i>	77
4.5.8.2. <i>Otras industrias alimentarias</i>	80
4.5.8.3. <i>Diagnósticos médicos</i>	81
4.5.8.4. <i>Varios</i>	82
<b><u>5. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS</u></b>	84
<b>5.1. Antecedentes</b>	84
<b>5.2. Objetivos</b>	84
<b><u>6. MATERIALES</u></b>	86
<b>6.1. Material vegetal</b>	86
6.1.1. Criterios de selección	86
<b>6.2. Materiales de referencia</b>	87
<b><u>7. MÉTODOS</u></b>	88
<b>7.1. Diseño de experimentos</b>	88
7.1.1. EXPERIMENTO I: evaluación de pera cv. Doyenne du Comice en almacenamiento frigorífico	88
7.1.2. EXPERIMENTO II: evaluación de manzana cv. Fuji en almacenamiento frigorífico	89
7.1.2.1. <i>Campaña 1999-2000</i>	89
7.1.2.2. <i>Campaña 2000-2001</i>	90
7.1.3. EXPERIMENTO III : metrología de la nariz electrónica	91
7.1.3.1. <i>EXPERIMENTO III.A.: Evaluación de la respuesta de los sensores QCM frente al vapor de agua.</i>	91
7.1.3.2. <i>EXPERIMENTO III.B.: Estimación de la sensibilidad, especificidad y precisión de una NE de sensores QCM, mediante la generación de espacios de cabeza de concentraciones conocidas</i>	92
7.1.3.3. <i>EXPERIMENTO III.C.: evaluación de mezclas artificiales de pera y melocotón</i>	92
7.1.3.4. <i>EXPERIMENTO III.D.: caracterización del efecto de daños en la piel sobre la composición del espacio de cabeza</i>	94

7.1.4.	EXPERIMENTO IV.: determinación de la concentración del espacio de cabeza por Cromatografía de Gases.	94
7.1.4.1.	<i>Experimento IV.A</i>	95
7.1.4.2.	<i>Experimento IV.B</i>	95
<b>7.2.</b>	<b>Metodología en el uso de la nariz electrónica</b>	96
7.2.1.	Descripción de la nariz electrónica "Libra Nose"	96
7.2.2.	Sensores QCM	99
7.2.3.	Generación del espacio de cabeza	100
7.2.4.	Transferencia del espacio de cabeza	101
7.2.5.	Sistema de limpieza y gas portador	101
7.2.6.	Sistema de referencia: 1-propanol	103
7.2.7.	Esquema general de los experimentos realizados con nariz electrónica	103
<b>7.3.</b>	<b>Metodología para las técnicas de referencia</b>	104
7.3.1.	Calibre	104
7.3.2.	Color de la piel	104
7.3.3.	Textura	105
7.3.4.	Ácidos	107
7.3.5.	Azúcares	108
7.3.6.	Cromatografía de gases	108
7.3.6.1.	<i>IRTA, Lleida</i>	108
7.3.6.2.	<i>KULeuven, Bélgica</i>	110
<b>7.4.</b>	<b>Resumen de los experimentos realizados</b>	112
<b>7.5.</b>	<b>Resumen de las medidas realizadas en los Experimentos I y II</b>	113
<b>7.6.</b>	<b>Metodología del análisis de datos</b>	115
7.6.1.	Obtención de la variable Df (Hz) de la NE	115
7.6.2.	Preprocesado de datos y corrección de la señal de la NE	116
7.6.3.	Análisis previo	116
7.6.4.	Exploración multidimensional de los datos	117
7.6.5.	Procedimiento de identificación de lotes e individuos	117
<b>8.</b>	<b><u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u></b>	119

<b>8.1. Perturbaciones que afectan a la respuesta de los sensores de la NE</b>	<b>119</b>
8.1.1. Identificación y eliminación de fuentes de variación no deseadas durante la campaña 99-00	119
8.1.1.1. <i>Humedad relativa ambiente</i>	119
8.1.1.2. <i>Temperatura ambiente y temperatura interna de la cámara de medida</i>	120
8.1.2. Eliminación del efecto de la humedad relativa del gas portador en Experimentos I.B y II.B 1ª campaña	120
8.1.2.1. <i>Mediante corrección aditiva de los datos respecto del 1-propanol</i>	120
8.1.2.2. <i>Mediante el uso de aire sintético seco</i>	121
8.1.3. Identificación de fuentes de variación, adicionales, no deseadas, en la campaña 00-01.	122
8.1.3.1. <i>Efecto del tiempo de funcionamiento del equipo sobre productos químicos puros</i>	122
8.1.3.2. <i>Efecto del tiempo de funcionamiento de equipo sobre fruta, manzanas cv Fuji</i>	123
8.1.4. Eliminación de fuentes de variación no deseadas en Experimento II.B.2ª campaña	123
8.1.4.1. <i>Corrección aditiva entre secuencias</i>	123
8.1.4.2. <i>Corrección multiplicativa dentro de cada secuencia</i>	125
<b>8.2. Perturbaciones que afectan a la generación y composición del espacio de cabeza</b>	<b>127</b>
8.2.1. Identificación de fuentes de variación no deseadas, debidas a la propia muestra	127
8.2.1.1. <i>Efecto de la concentración del vapor de agua</i>	127
8.2.1.2. <i>Efecto de la interacción entre las moléculas químicas presentes en la muestra. Coeficientes de actividad (Experimento IV.A).</i>	128
8.2.2. Identificación de fuentes de variación no deseadas, en la generación de espacios de cabeza de concentración conocida. Experimento IV.B	130
8.2.2.1. <i>Efecto de la temperatura ambiente sobre el tiempo para alcanzar el equilibrio del espacio de cabeza</i>	130
8.2.2.2. <i>Efecto del tiempo de generación del espacio de cabeza</i>	130
8.2.3. Conclusiones parciales sobre la identificación de fuentes de variación	131

	que afectan a la calidad de los datos que se obtienen de una NE	
8.2.4.	Conclusiones parciales sobre el establecimiento de sistemas de corrección que permitan eliminar las fuentes de variación no deseadas.	134
<b>8.3.</b>	<b>Metrología de la nariz electrónica (Experimento III.B)</b>	<b>135</b>
8.3.1.	Precisión	135
8.3.2.	Sensibilidad	135
8.3.3.	Especificidad	136
8.3.4.	Identificación de muestras artificiales de aromas de fruta	138
8.3.5.	Especificaciones de una nariz electrónica para la evaluación de volátiles en pera y manzana	139
8.3.6.	Conclusiones parciales sobre la determinación de las características metrologías que definen el funcionamiento de los sensores QCM de la nariz electrónica en el análisis de estándares.	141
8.3.7.	Conclusiones parciales sobre el establecimiento de cuales deben ser las especificaciones que debe cumplir una NE para poder ser empleada en la evaluación de la calidad aromática de manzanas cv Fuji y peras cv. Doyenne du Comice	142
<b>8.4.</b>	<b>Aplicación de una nariz electrónica en la determinación de la calidad aromática en manzanas y peras</b>	<b>143</b>
8.4.1.	Experimento I.B. Determinación de la calidad aromática en pera cv Doyenne du Comice.	143
8.4.1.1.	<i>Determinación del estado de madurez de la fruta por métodos de referencia</i>	143
8.4.1.2.	<i>Nariz electrónica</i>	148
8.4.1.3.	<i>Comparación de los métodos de referencia con la nariz electrónica</i>	149
8.4.2.	Experimento II.B (1ª campaña). Determinación de la calidad aromática en manzana cv Fuji.	152
8.4.2.1.	<i>Determinación del estado de madurez de la fruta por métodos de referencia</i>	152
8.4.2.2.	<i>Nariz electrónica</i>	160
8.4.2.3.	<i>Comparación de los métodos de referencia con la nariz electrónica</i>	161

8.4.3.	Experimento II.B (2 <sup>a</sup> campaña). Determinación de la calidad aromática en manzana cv Fuji.	164
8.4.3.1,	<i>Determinación del estado de madurez de la fruta por métodos de referencia</i>	164
8.4.3.2.	<i>Nariz electrónica</i>	170
8.4.3.3.	<i>Comparación de los métodos de referencia con la nariz electrónica</i>	173
8.4.4.	Conclusiones parciales sobre la segregación en distintos estados de calidad aromática (madurez) empleando la NE, las variedades de manzanas y peras seleccionadas sometidas a diferentes condiciones y tiempos de almacenamiento.	175
<b><u>9.</u></b>	<b><u>CONCLUSIONES</u></b>	177
<b><u>10.</u></b>	<b><u>PROPUESTAS PARA TRABAJOS POSTERIORES</u></b>	181
<b><u>11.</u></b>	<b><u>BIBLIOGRAFIA</u></b>	183
	<b><u>ANEJO I: normas de comercialización de manzanas y peras</u></b>	191
	<b><u>ANEJO II: modelos comerciales de NE</u></b>	201
	<b><u>ANEJO III: análisis estadísticos</u></b>	212
	<b>Análisis de varianza (F) para las variables de referencia</b>	212
	Decana 99-00	212
	Fuji 99-00	213
	Fuji 00-01	216
	<b>Análisis de varianza (F) para las variables cromatográficas</b>	217
	Decana 99-00	217
	Fuji 99-00	218
	Fuji 00-01	220
	<b>Análisis de varianza (F) para las variables de la</b>	221

**nariz electrónica**

Decana 99-00 221

Fuji 99-00 222

Fuji 00-01 223

**Análisis de componentes principales completo de todos los  
datos: sensores de nariz electrónica y variables de referencia** 224

Decana 99-00 224

Fuji 99-00 225

Fuji 00-01 226

**Comparativa (medias) entre las campañas 99-00 y 00-01  
de manzana Fuji** 227

# **Resumen y**

# **abstract**

---



## 1. Resumen y abstract

### 1.1. Resumen

Los compuestos aromáticos son un importante grupo de sustancias que influyen en el olor y *flavor* de la fruta a través del olfato, siendo responsables en gran medida de la calidad organoléptica del producto, pudiendo ser utilizado el aroma del fruto como un parámetro objetivo de calidad.

En este trabajo se ha estudiado la potencial utilidad de un relativamente nuevo procedimiento instrumental una nariz electrónica, equipada con una matriz de sensores del tipo Microbalanzas de Cristal de Cuarzo (QCM) en la determinación objetiva y global de la calidad aromática de manzanas de la variedad *Fuji* y peras de la variedad *Doyenne du comice*. Para el desarrollo de esta aplicación, a lo largo de dos campañas consecutivas muestras de estos cultivares recolectadas en distintos momentos fueron sometidas a diferentes condiciones de almacenamiento (frío normal y atmósfera controlada), a distintos tiempos de almacenamiento en cámara y a tres tiempos de vida en estantería, todos ellos factores externos que afectan a la composición aromática de la fruta tras la recolección. La validación de los resultados obtenidos se ha realizado por comparación de la información aportada por los sensores de la nariz electrónica con la obtenida mediante técnicas de referencia para la caracterización del aroma como es la cromatografía de gases.

Los estudios realizados en esta tesis han permitido establecer que:

- la estabilidad y reproducibilidad de la respuesta de los sensores es baja, debido a la existencia de distintas perturbaciones externas e internas, algunas de las cuales han sido identificadas. Estas perturbaciones pueden afectar directamente a la respuesta de los sensores como son la humedad relativa del ambiente, la temperatura interna de trabajo de los sensores de la nariz electrónica y el tiempo de funcionamiento del equipo y otras actúan indirectamente alterando las características del espacio de cabeza generado por la muestra como son la evaporación de vapor de agua, la presencia de daños o roturas en la piel del fruto o las interacciones entre las distintas especies químicas presentes en la muestra,
- la detección de las distintas fuentes de variación que afectan a la señal registrada por los sensores, fuerza a llevar a cabo un preprocesado de la matriz de datos de frecuencias originales obtenidas, basado en la aplicación de distintos tipos de calibraciones. Primero una corrección aditiva entre secuencias o días de trabajo y segundo una corrección multiplicativa intra secuencia o día de trabajo,

- las características metrológicas que definen el funcionamiento de los sensores QCM de la nariz electrónica mediante el análisis de estándares determinan la precisión, sensibilidad, umbral de detección y especificidad de los mismos,
- los análisis cuantitativos son posibles, estableciéndose que un tiempo mínimo de generación del espacio de cabeza de 20 min para el cultivar *Fuji* y de 60 min para el cultivar *Doyenne du Comice* es suficiente para diferenciar utilizando la nariz electrónica más de tres categorías de calidad aromática,
- la nariz electrónica responde fundamentalmente a cambios en el tiempo de almacenamiento al que han sido sometidos los frutos siendo posible la diferenciación entre los distintos tiempos de almacenamiento considerados tanto en la variedad *Fuji* como en la *Doyenne du Comice*,
- es difícil establecer correlaciones entre las variables de la nariz electrónica influenciadas fundamentalmente por el tiempo de almacenamiento y las obtenidas a través de la cromatografía de gases que responden fundamentalmente a cambios en las condiciones de almacenamiento, indicando además estas últimas que la emisión aromática de frutos conservados en condiciones muy estrictas de atmósfera controlada presentan una emisión prácticamente nula de volátiles. De forma que sólo para la segunda campaña de la variedad *Fuji* caracterizada por una tasa de emisión aromática excepcionalmente elevada y para los frutos conservados en condiciones de frío normal o atmósfera controlada estándar se ha encontrado una correlación positiva entre los sensores de la nariz electrónica y la emisión de acetato de hexilo, compuesto impacto de la variedad.

## **1.2. Abstract**

The aromatic compounds are an important set of substances that affect to the odour or flavour of fruits through the smell. They are the principal responsible of organoleptic quality of food, then the aroma could be useful as an objective parameter of fruit quality.

In this work it has been studied the potential utility of the a relatively new instrumental procedure an electronic nose, equipped with a sensor chamber with a matrix of eight Quartz Crystal Microbalances (QCM) sensors to determine objective and globally the aromatic quality of *Fuji* apples and *Doyenne du Comice* pears. To develop this application, samples from two different seasons harvested with different maturity stage, were stored under different conditions (normal cold and controlled atmosphere), along several storage time and during three times of shelf life, all of this external factors affect to the aromatic quality of fruit once harvested. The validation of the results it has been carried out by comparison of the electronic nose information with the results obtained using reference techniques for aroma determination as gas chromatography

The results obtained in this Thesis allow to establish that:

- the stability and reproducibility of sensor response is low, due to different sources of variation some of them it has been identify. These sources of variation can affect directly to the sensor response as the relative humidity of ambient, the internal temperature of work in the sensor chamber or the time of work of the equipment and other ones act indirectly disturbing the characteristics of the headspace generated for the sample as the evaporation of water vapour, the presence of skin damage or the interaction between the different chemical components of the sample,
- it necessary to carry out additive corrections between sequences and multiplicative corrections inside sequences,
- the metrology parameters that define the QCM sensors characteristics measuring standard chemical determine their precision, sensibility, detection threshold and specificity,
- quantitative analysis are possible, establishing that a minimum time of headspace generation of 20 min for *Fuji* apple and of 60 min for *Doyenne du Comice* pear is enough to differentiate more of three categories of aromatic quality,
- the electronic nose is affected mainly for the change in storage time of the fruit and it is possible to differentiate between the several storage time studied in *Fuji* apple and *Doyenne du Comice* pear,
- it is difficult to establish correlations between the variables of the electronic nose under the influence of the storage time and that ones obtained by gas chromatography under the influence of the storage condition. Gas chromatography shows that the fruit stored under the controlled atmospheres more radicals have a minimum emission of volatiles. Then only for the second season of *Fuji* apples characterised by an aromatic emission exceptionally high and for fruits stored in normal cold and standard controlled atmosphere it has been found a positive correlation between the sensors of the electronic nose and the emission of hexyl acetate, impact compound of the aroma of this variety.

# Introducción

---

## 2. Introducción

La presente tesis doctoral trata la determinación de la calidad interna de frutas a través de su emisión aromática y el desarrollo de una aplicación no destructiva mediante una nariz electrónica.

Su realización está profundamente relacionada con un proyecto Nacional y una Acción Concertada Europea que se esbozan a continuación.

### 2.1. Proyecto de investigación AROFRU

Los trabajos que dan lugar a esta tesis se han desarrollado a lo largo de los tres años que ha durado el proyecto nacional CICYT de referencia ALI1998-0960-C02-01 y título: "Evaluación no destructiva de la calidad de frutos mediante la integración de sensores electrónicos de aromas, en diferentes tecnologías de frigoconservación (AROFRU)".

El proyecto AROFRU fue ideado como un plan conjunto de investigación para:

- ✓ establecer las relaciones entre el desarrollo de aromas a lo largo de la maduración postcosecha hasta el momento del consumo, en diferentes condiciones de frigoconservación, determinadas con el sensor de aromas (nariz electrónica) y con otros sensores de calidad: (ópticos para el color externo y contenido en azúcares, y mecánicos para firmeza/textura), en manzanas cv Fuji y peras cv Doyenne du Comice. Realizar seguimiento de la evolución de cada uno de los perfiles aromáticos generados por la fruta bajo diferentes condiciones de almacenamiento por Cromatografía de Gases, y
- ✓ establecer los necesarios modelos de calibración de sensores de medida de aromas, relacionando sus respuestas con el perfil aromático.

Para llevar a cabo estos objetivos hemos participado en el proyecto distintos equipos de investigación:

- ✓ Laboratorio de Propiedades Físicas de Productos Agrícolas (Dpto. Ingeniería Rural, Universidad Politécnica de Madrid); con amplia experiencia en la aplicación y desarrollo de sensores de medida de atributos cualitativos en frutas y hortalizas, y profundo conocimiento del producto,
- ✓ Unidad de Post-cosecha integrada en el Centro de Referencia Alimentaria (CeRTA) y en el Centro R+D de la Universidad de Lleida-IRTA; con amplios conocimientos sobre la optimización de los parámetros de calidad total de frutos de pepita y sobre tecnologías de frigoconservación que consigan mantener la mejor calidad total de los frutos,
- ✓ la empresa TRECOOP; colaboradora en la elaboración y presentación del proyecto,

- ✓ la empresa Nufri S.A.T.; encargada de conservar en sus instalaciones las peras de la variedad Doyenne du Comice durante la campaña 1999-2000 y las manzanas cv Fuji almacenadas en condiciones de Bajo Oxígeno y Ultra Bajo Oxígeno a lo largo de las campañas 1999-2000 y 2000-2001, y
- ✓ la empresa Catalá Fruit S.L.; encargada de almacenar en sus instalaciones durante las campañas 1999-2000 y 2000-2001, las manzanas Fuji correspondiente a las condiciones de Frío Normal y conservación en Atmósfera Controlada Estándar.

## **2.2. Proyecto de investigación ASTEQ**

“ASTEQ”, acrónimo de “Artificial Sensing Techniques for Evaluating Quality”, es una Acción Concertada financiada por la Unión Europea dentro del 4º Programa Marco. Esta acción cubre el aspecto de la calidad (incluyendo la calidad organoléptica) de los alimentos desde el punto de vista de su producción y procesado.

Dentro de este proyecto se definieron cuatro grupos de acción, uno de los cuales estaba específicamente centrado en el estudio de los aromas emitidos por los frutos, siendo la Profesora Margarita Ruiz-Altisent su vocal.

A lo largo de los tres años de duración de esta acción (1998-2001) se realizaron, numerosas reuniones y dos ensayos colaborativos que fueron aprovechados para llevar a cabo algunos de los experimentos que se describirán en la presente tesis:

- ✓ primera reunión para ensayos colaborativos que tuvo lugar en Norwich (Reino Unido) en febrero de 1999, y
- ✓ segunda reunión para ensayos colaborativos que tuvo lugar en Leuven (Bélgica) en febrero de 2000,

Este foro ha permitido desarrollar lazos estables con grupos de investigación expertos en el desarrollo y uso de sensores de gases o Narices Electrónicas de distintos países, favoreciendo un intercambio de información realmente beneficioso para el grupo de trabajo del LPF.

## **2.3. Cronología en la realización de los trabajos**

Los trabajos que dan lugar a esta tesis se desarrollaron en un total de tres años (septiembre de 1998 a agosto de 2001) coincidiendo con el periodo de duración de ambos proyectos AROFRU y ASTEQ, en el orden indicado en el siguiente cronograma:

<b>Trabajo a realizar</b>	<b>Año 1</b>	<b>Año 2</b>	<b>Año 3</b>
Revisión bibliográfica			
Revisión de equipos comerciales			
Compra del equipo "Libra Nose"			
Determinaciones de fruta cv Doyenne du Comice (Campaña 99-00)			
Determinaciones de fruta cv Fuji (Campaña 99-00)			
Determinaciones de fruta cv Fuji (Campaña 00-01)			
Análisis metrológicos			
Análisis de datos			
Evaluación de los resultados			

# **Planteamiento del problema**

---



### 3. Planteamiento del problema

#### 3.1.El mercado de la fruta dulce: manzanas y peras

España es el segundo productor Europeo de fruta dulce no cítricos, especialmente por lo que hace referencia a las manzanas, peras y melocotones, con una superficie dedicada al cultivo de estas especies equivalente al 24% del total de la Unión Europea de los 15 países miembros (Informe Unión Europea 2000)

En cuanto a la distribución geográfica de las superficies, dentro de nuestro país, tenemos que, en el caso de la manzana, algo más de la mitad se concentra en dos comunidades autónomas (CC AA), Cataluña (36.2%) y Aragón (17%). En el caso de la pera, la concentración en las dos CC AA citadas es aún mayor dado que el porcentaje supera al 65%, (Cataluña:47.3%, Aragón:20.5%) (Sabate 1999).

La provincia de Lleida es la mayor productora de fruta dulce de España. A ella corresponden el 38.8% del total de la producción de manzana y el 50.9% de pera (ver Tabla 3-1).

Con respecto a la distribución de la producción en el seno de la CC AA Catalana, la provincia de Lleida aporta el 81.3% de la producción de manzana y el 93.4% de pera. Por comarcas la principal es la del Segria (capital Lleida) seguida a diferencia del Pla d'Urgell (Mollerusa).

Manzana	Superficies en producción			t	Producciones	
	ha	%Total España	%Total Cataluña		%Total España	%Total Cataluña
Lleida	14.078	30,38	83,83	285.466	38,79	81,31
Cataluña	16.793	36,23		351.080	47,70	
España	46.346			736.000		
<b>Pera</b>						
Lleida	16.976	45,72	96,66	309.677	50,90	93,42
Cataluña	17.563	47,30		331.479	54,49	
España	37.130			608.355		

• Tabla 3-1: Superficies en producción y producciones de manzana y pera en España y Cataluña (año 1998) .

• Fuentes: Anuario de Estadística Agroalimentaria 2000 (totales España) y Cámara Oficial de Comercio e Industria de Lleida COCILL, 1998 (totales Lleida y Cataluña).

Estas cifras ponen de manifiesto la importancia de estos productos en el ámbito frutícola español y Catalán y especialmente para la provincia de Lleida.

### 3.2.El consumidor y la calidad

El consumidor cree hoy que comer bien es comer variado tanto organoléptica como nutricionalmente, mostrando una preferencia muy clara por productos frescos y naturales, donde la fruta juega una papel fundamental.

Como integrantes de la dieta mediterránea, destacan en la composición del gasto realizado en el hogar, la adquisición de frutas y hortalizas. Por categorías de productos el aumento más significativo es el producido en el consumo de frutas frescas y transformadas, en 1999 el gasto destinado a estos productos en España fue del 9.2%. La fruta se identifica como un producto de futuro, es decir, como un producto que va a desarrollarse fuertemente en los próximos 10 años, tendencia que se justifica por el interés y primacía de lo sano, unido a la comodidad y a la rapidez, siendo en primer lugar la mujer (sin rol de ama de casa), la que apuesta por esta evolución. En los hogares españoles se consume una media de 5.62 kilogramos de fruta fresca por semana, siendo el consumo medio per capita de 2.33 kilogramos por semana. El árbol general de decisión de compra en la sección de frutas y hortalizas de las grandes superficies muestra que el 83% de los consumidores eligen la variedad de fruta a comprar en función de su calidad (Fernández and Saá 2001).

Además esta calidad definida como “el conjunto de características de cualquier producto hortofrutícola que sirve para diferenciar unas unidades de otras y esto es lo que da significado en la aceptación del consumidor”, representa el punto de partida de las llamadas Denominaciones de Origen (Llamazares and Martínez 2001).

Se define así un nuevo perfil del consumidor de la Unión Europea y un nuevo concepto de tiempo óptimo de conservación de frutas y hortalizas (ver Tabla 3-2).

<b>Nuevo perfil de consumidor de la Unión Europea</b>	
✓ Cada vez más exigente en cuanto a calidad:	Aroma Sabor
✓ Cada vez más preocupado por el valor nutritivo y dietético de los alimentos. En concreto, el consumo de frutas para prevenir:	Enfermedades carenciales Enfermedades degenerativas Estreñimiento (elevado contenido en fibra)
✓ Cada vez más consciente de emplear técnicas respetuosas con el medio ambiente	

**Nuevo concepto:**

**Tiempo óptimo de conservación de frutas y hortalizas** sustituye al de **tiempo máximo de conservación de frutas y hortalizas** porque las mayores pérdidas se suelen producir al final del tiempo de almacenamiento

• Tabla 3-2: Definición del nuevo perfil de consumidor de la UE y de un nuevo concepto de conservación (Llamazares and Martínez 2001).

Todo lo anteriormente expuesto indica que el mercado de la fruta fresca a pesar de enfrentarse a distintas debilidades es un mercado potencialmente muy interesante y en crecimiento especialmente para productos de calidad.

### **3.3. La calidad del fruto**

La calidad de un fruto se define por rasgos (características, atributos y propiedades) que hacen que sea calificado como de grado inferior o superior. Estos rasgos son diferentes según se analice la calidad desde el punto de vista del productor, distribuidor o consumidor. Estos últimos consideran que las frutas tienen calidad cuando poseen buen aspecto, sabor, olor y alto valor nutritivo.

Se puede definir como calidad de un fruto el conjunto de caracteres, tanto genéticos como inducidos en parte por la técnica, que le definen y que previo cumplimiento de unas Normas Técnico Sanitarias, lo hacen apetecible al consumo (Llamazares and Martínez 2001).

La palabra calidad cubre de una manera más o menos consciente numerosos criterios, pudiéndose distinguir cuatro espacios de calidad (ver Tabla 3-3):

---

#### **Distintos enfoques de la calidad de los productos agroalimentarios**

---

Calidad comercial	Normalización y establecimiento de categorías: Extra, Primera, Segunda.
Calidad sanitaria	Límites máximos de residuos
Calidad nutricional	Contenido en vitaminas, fibra,...
Calidad sensorial	Calidad organoléptica

---

• Tabla 3-3: Cuadro explicativo de los cuatro espacios de calidad

### **3.4. Calidad sensorial. Importancia del aroma en la calidad de la fruta**

La calidad organoléptica de los alimentos se puede resumir con la siguiente expresión: “El placer de comer”, del inglés “The Pleasure of Food”. Calidad que se determina a través de la valoración sensorial de los alimentos, que a su vez se puede definir como “ la valoración de las propiedades de una sustancia usando los sentidos” o como “ la disciplina científica usada para evocar, medir, analizar e interpretar las características de los alimentos, percibidas a través de los sentidos de la vista, olfato, sabor, tacto y oído, solos o en combinación” (Shepherd 1999).

La valoración sensorial dentro de la industria de los alimentos es necesaria,

- ✓ por el desarrollo de los productos, ya sea por la aparición de nuevos productos o por modificación de los ya existentes,
- ✓ por el intento de las empresas de entrar en nuevos mercados,
- ✓ por competir más eficazmente en los mercados ya existentes, y
- ✓ para el control de la calidad.

Para realizar la experiencia sensorial el hombre y otros animales tienen dos mecanismos para detectar las sustancias químicas presentes en los alimentos o en el medioambiente: a través del sabor en la boca y/o a través del olor en la nariz (Shepherd 1999).

Generalmente, el primer paso en el análisis de los alimentos por sistemas quimiosensoriales ocurre antes de que el alimento se encuentre dentro de la boca. En esta etapa y probablemente sólo en ésta, el alimento es analizado casi enteramente por el olfato (Maruniak 1996). Una vez que el alimento se encuentra en el interior de la boca, los movimientos masticatorios y el incremento de temperatura provocan la liberación de los compuestos volátiles, pasando a la parte posterior de la boca de donde, durante las expiraciones, pasan a la nariz a través de la ruta retronasal estimulando las células receptoras olfativas. Los aromas que llegan a la nariz a través de la ruta retronasal son percibidos por el consumidor como una sensación oral y no nasal. Este efecto es conocido como "ilusión sabor-olor" (Maruniak 1996).

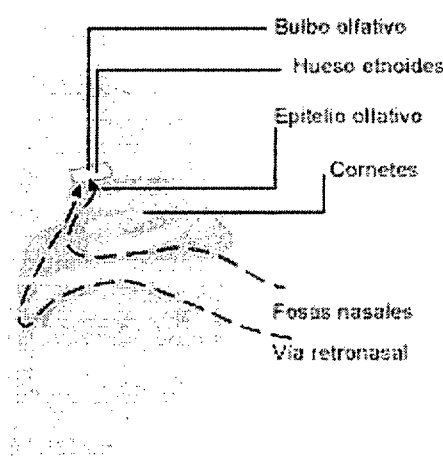
Los compuestos aromáticos son, por tanto, un importante grupo de sustancias que influyen en el olor y *flavor* de la fruta a través del olfato, siendo responsables en gran medida de la calidad organoléptica del producto, pudiendo ser utilizado el aroma del fruto como un parámetro objetivo de calidad.

Así el consumidor tiende a utilizar el olor como un indicador de calidad, de forma que los aromas agradables se interpretan como un indicador de la calidad y buen estado del producto y olores desagradables se interpretan como indicadores de la presencia de problemas en el alimento que se va a consumir.

### 3.5. Normativa y control de la calidad durante la producción

A pesar de que la caracterización de la calidad aromática como método para valorar la calidad es de gran interés para la industria de la alimentación, la normativa europea sobre la calidad comercial que deben presentar manzanas y peras, se centra básicamente en aspectos externos.

La norma (Reglamento (CE) Nº 1619/2001 de la Comisión 2001) tiene por objeto establecer los requisitos de calidad que deberán cumplir las manzanas y las peras tras su acondicionamiento y envasado, especificando para ello unos requisitos mínimos de limpieza y sanidad que debe cumplir el producto, clasificándolo en tres categorías (ver Tabla 3-4) en función de sus características externas: forma, calibre, color, ausencia de defectos, etc.... El reglamento (ver Anejo 1) no establece ningún criterio de clasificación que atienda a características internas del fruto y que ayuden a



• Figura 3-1: El sentido del olfato a través de las rutas o vías nasal y retronasal.

caracterizar en el momento de la recolección su estado de madurez comercial y en el momento del consumo su estado de madurez gustativa.

Fruto	“Extra”	Categoría I	Categoría II
Manzana cv Fuji	70	65	65
Pera cv Doyenne du Comice	60	55	55

• Tabla 3-4: Calibre mínimo en mm exigido por el reglamento de calidad de la UE para variedades de fruto grande de manzanas y peras, destinadas a su consumo en fresco.

Por otro lado ciertos productores y mayoristas, utilizan además de los citados anteriormente otros parámetros para caracterizar la calidad del producto antes de que llegue al consumidor, como son el contenido en ácidos, azúcares, firmeza Magness-Taylor..., utilizando dicha información para una mejor clasificación y diferenciación entre categorías. La definición y acotación de las distintas magnitudes por parte de un usuario se denomina especificaciones de producto y es cada vez más frecuente.

En ningún caso, ni la normativa ni el productor, contemplan el uso de alguna técnica para la determinación de la calidad aromática de la fruta.

### **3.6. ¿Por qué una nariz electrónica para la determinación de la calidad aromática en frutos?.**

La calidad en sentido estricto es el resultado de la combinación de las propiedades físicas, químicas y sensoriales de los frutos. Algunos de estos factores son susceptibles de medida con criterios objetivos como el contenido en azúcar, grado de acidez....Sin embargo para muchas de las cualidades no existen ni magnitudes definidas ni equipos para su determinación, así para el estudio del aroma como cualidad organoléptica en frutos, se requiere el empleo de una sistemática analítica capaz de ofrecer una información completa y representativa de la mezcla de volátiles percibida a través del olfato.

Típicamente la medida del olor se basa en la evaluación sensorial realizada por un panel de catadores, el olor puede ser así clasificado desde un punto de vista cuantitativo, es decir intensidad de olor, y desde un punto de vista cualitativo o hedónico. Sin embargo el análisis sensorial, presenta limitaciones en la realización de medidas de olores específicos que caractericen totalmente un sistema de interés, además de no ser una técnica práctica para medidas en continuo o semi-continuo de un olor debido entre otras cosas a su elevado coste.

Desde el punto de vista de la Química Analítica, la combinación de las técnicas de cromatografía de gases (CG) y espectrometría de masa (EM), permite caracterizar perfectamente un olor, identificando y cuantificando los distintos volátiles que lo componen y por tanto el sistema bajo estudio, pero ofreciendo una información muy diferente a la del olfato humano.

## 4. Revisión Bibliográfica

En esta revisión bibliográfica se definirán los distintos conceptos relacionados con la caracterización aromática de la fruta, haciéndose una discusión de las diferentes técnicas disponibles hoy en día para la medida de gases.

### Parte I

#### 4.1. Conceptos y definiciones relativos al aroma en la fruta

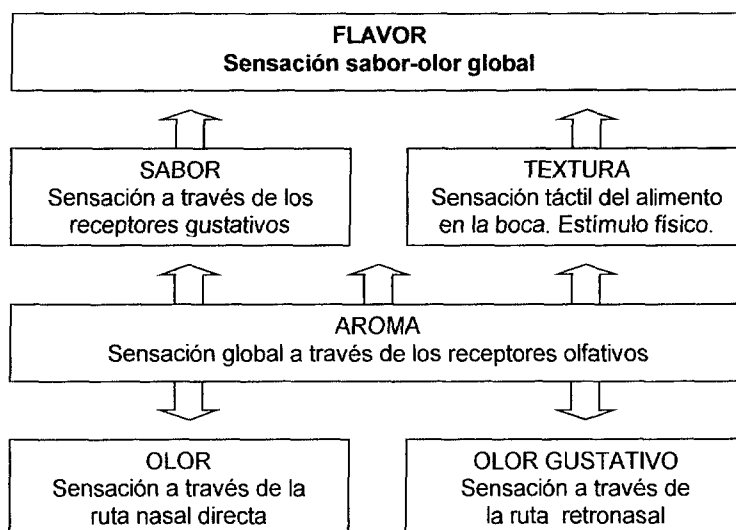
El aroma del fruto es la sensación subjetiva producida por el olor de las sustancias volátiles que lo constituyen. La formación de los compuestos responsables del aroma de los frutos está condicionada por numerosos factores externos e internos ((López et al. 1998a), (Pérez et al. 1993)): a) las condiciones de cultivo como suelo, clima, fertilización..., b) la fecha de recolección, c) los tratamientos pre y post-cosecha y, d) la regulación metabólica de la maduración como la tasa de respiración y tasa de emisión de etileno.

Son conceptos fundamentales en la caracterización del aroma: la sensación sabor-olor o *flavor*, el umbral de olor y los compuestos impacto y contributivos del aroma.

##### 4.1.1. Sensación sabor-olor o *flavor*

*Flavor* es el término inglés con el que se define la sensación producida por un fruto (o cualquier material) cuando se lleva a la boca y es percibido por los sentidos del gusto y del olfato en combinación con las sensaciones generales que en la boca provocan su textura, temperatura y picor (Shaath and Griffin 1988) (ver Figura 4-1). Otros autores, sin embargo, equiparan *flavor* exclusivamente con la sensación sabor-olor, al definir a aquel, como el resultado de una interacción compleja entre las sensaciones de sabor transmitidas a través del epitelio oral y las sensaciones del olfato transmitidas a través del epitelio olfativo, de forma que, a nivel del cortex ambas sensaciones se fusionan para proporcionar la sensación global de *flavor* que nosotros localizamos como si se produjera exclusivamente en la boca (Bauer, Santi, and Utermohlen 2000) .

Según lo anteriormente expuesto, en la presente tesis, se utilizarán indistintamente los términos sabor-olor y *flavor*, ya que en cualquier caso son el sabor y el olor las sensaciones que aportan la principal información al *flavor*.



• Figura 4-1: Esquema explicativo de los distintos componentes del *flavor*.

#### 4.1.2. Umbral de olor

Umbral de olor de un compuesto, es la mínima concentración presente en el ambiente que el olfato es capaz de detectar (Flath et al. 1967). Esto indica que puede haber compuestos que a pesar de encontrarse en altas concentraciones no son detectables por el olfato humano y viceversa. Los alcoholes son los que presentan umbrales de olor más altos, de forma que, por ejemplo, para detectar el etanol se necesita la presencia en el ambiente de como mínimo 100 ppm, mientras que sólo 0.1 ppb de butirato de etil-2metilo nos permiten detectar este compuesto, siendo así los ésteres los que presentan umbrales de olor más bajos.

La determinación del umbral de olor para distintos compuestos se realiza utilizando paneles sensoriales. El umbral de olor de cada compuesto puede variar ligeramente en la bibliografía, ya que los métodos de estimación y la muestra de partida pueden diferir de unas fuentes a otras, en cualquier caso este parámetro sirve como indicador de la contribución relativa de cada compuesto en el aroma global de la fruta, de forma, que a menor umbral, mayor contribución al aroma.

#### 4.1.3. Valor aromático

El valor aromático de un compuesto se calcula como el cociente entre la concentración que de ese compuesto existe en el aroma del fruto y su umbral de olor; es por tanto, adimensional. Así el valor aromático viene a complementar el parámetro umbral de olor al considerar la concentración para su estimación, de forma que a mayor valor aromático mayor será la importancia del compuesto en el aroma global del fruto.

La forma en la que se calcula el valor aromático de un compuesto indica, que éste variará con la variedad de fruto en la que se esté estimando (verTabla 4-1). Así mientras que ese valor para el

hexanal es 44 en el albaricoque, en el caso del melocotón es de solo 19 unidades, indicando que la importancia del hexanal en cuanto a su concentración es mayor en la composición del aroma del albaricoque que en la del melocotón.

<b>Fruto</b>	<b>Compuesto volátil</b>	<b>Concentración (µg/kg)</b>	<b>Umbral de olor (µg/kg)</b>	<b>Valor aromático</b>
<b>Albaricoque</b>	<b>Hexanal</b>	220	5	44
	<b>Linalool</b>	296	6	49
<b>Melocotón</b>	<b>Hexanal</b>	84	4.5	18.7
	<b>Linalool</b>	95	6	15.8
<b>Pera Asiática</b>	<b>2-metilbutanoato de etilo</b>	222	0.006	37000
	<b>Hexanoato de etilo</b>	9427	1	9427

• Tabla 4-1: Unidades de olor estimadas a partir de las concentraciones de los compuestos señalados, identificados y cuantificados por CG/EM a partir de albaricoques (var. Blenheim, (Takeoka et al. 1990)), melocotones frescos (datos de concentraciones calculados como la media de las obtenidas para las variedades Cresthaven, Bailey, June Gold, Selection y Boone, (Horvat et al. 1990)) y a partir de frutos frescos de pera asiática de la variedad Seuri ((Takeoka, Buttery, and Flath 1992)).

El valor aromático indica que no son los compuestos que se encuentran en mayor concentración los más importantes en el aroma del fruto si no que es la combinación concentración-umbral, la que realmente determina dicha contribución. En la pera asiática (*Pyrus serotina*) el 2 metilbutanoato de etilo es el principal compuesto que determina el aroma del fruto, a pesar de encontrarse en una concentración 43 veces menor que el hexanoato de etilo, debido a su bajísimo umbral de olor (ver Tabla 4-1).

#### **4.1.4. Compuestos impacto y contributivos del aroma**

Compuestos impacto del aroma son aquellos cuya nota olfativa individual es el olor característico del fruto bajo estudio, mientras que compuestos contributivos son el resto de los volátiles que matizan y enriquecen la mezcla aromática para conseguir el aroma global característico del fruto (Pérez et al. 1993).

Se puede encontrar que el aroma de un fruto está definido por un único compuesto impacto, como el citral en el limón, caracterizado generalmente por un umbral de olor muy bajo, este es el caso del aldehído nona-2,6 dienal que con un umbral de olor de 0.0001 ppm es el compuesto impacto del pepino. (Introduction to Ecological Biochemistry Feeding Preferences of Vertebrates, Including Man )

En otros frutos son varios los compuestos impacto del aroma, es el caso del plátano con los acetatos de etilo e isoamil o el de la fresa con tres compuestos impacto el butanoato, 2-metil



butanoato y hexanoato de etilo (Pérez et al. 1993). Incluso hay frutos en los que no se ha descrito ningún compuesto impacto, como por ejemplo el albaricoque en el que ninguno de los compuestos volátiles aislados posee separadamente el aroma característico del fruto, si no que su aroma es debido a una respuesta integrada hacia el conjunto de los compuestos volátiles contributivos de su aroma siempre y cuando se encuentren en las proporciones adecuadas (Crouzet, Etievent, and Bayonove 1990).

Por tanto, no hay que olvidar que la importancia relativa de cada compuesto individual en el aroma no puede ser juzgada exclusivamente a partir de los datos obtenidos sensorialmente y por su valor aromático, si no que es necesario valorar las complejas interacciones que tienen lugar entre los distintos componentes volátiles de una mezcla aromática, ya que no se puede considerar el aroma como una sensación puramente aditiva. Estas interacciones son las que explicarían, por ejemplo, la distinta incidencia sensorial del acetato de isoamilo en plátano y fresa. En el plátano este es un compuesto impacto cuya nota aromática es descrita como olor a plátano, sin embargo en la fresa, esta misma nota aromática parece diluirse en el resto de los componentes de la mezcla que ejercerían un efecto antagónico sobre él que reduciría su incidencia sensorial (Pérez et al. 1993).

## **4.2. Caracterización aromática de la fruta de pepita**

### **4.2.1. Manzana (*Malus domestica*)**

El uso de métodos físico-químicos de análisis, particularmente CG y EM, ha permitido la separación e identificación de más de 300 compuestos volátiles, aunque sólo unos pocos entre 20 y 40 son los responsables del aroma característico a manzana, identificándose entre ellos a los compuestos impacto como los responsables del *flavor* varietal (López et al. 1998a).

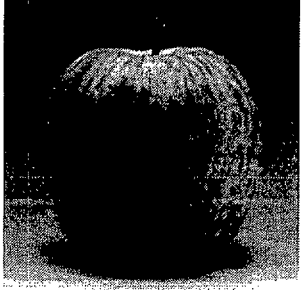
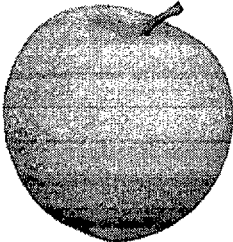
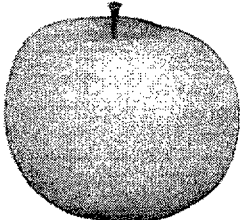
#### **4.2.1.1. Compuestos predominantes según la variedad**

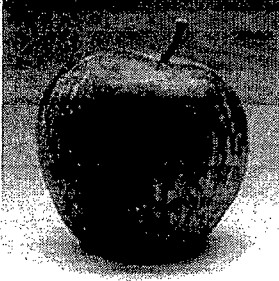
Estudios recientes han mostrado que el aroma-flavor característico a manzana es el resultado de una mezcla compleja de alcoholes, ésteres, aldehídos y cetonas (Young et al. 1996). Así en función de la proporción relativa que de alcoholes y ésteres se encuentre en el aroma, los distintos cultivares de manzana se pueden clasificar en (López et al. 1998a):

- ✓ TIPO ESTER (TE) cuando los esterres predominan sobre la composición aromática total del fruto, y
- ✓ TIPO ALCOHOL (TA) cuando los alcoholes predominan sobre la composición aromática total del fruto.

La Tabla 4-2 muestra los compuestos volátiles que constituyen de forma mayoritaria la muestra gaseosa generada por fruta madura de cada una de las cinco variedades consideradas en el estudio

bibliográfico, ordenadas de menor a mayor presencia de ésteres en el aroma de cada una de ellas. Se observa que son los cultivares que pertenecen a la familia Delicious las que presentan una mayor concentración de ésteres en su aroma, siendo los acetatos de etilo, hexilo y butilo los compuestos que aparecen con mayores concentraciones en todas las variedades consideradas. Sin embargo el impacto o contribución de estos y otros compuestos mayoritarios en la apreciación aromática característica de cada variedad dependerá como se ha expuesto en apartados anteriores, no sólo de la concentración sino también del umbral de olor del compuesto considerado. Así la contribución al aroma del acetato de etilo con un umbral de olor de 5 ppm será mucho menor que la del acetato de hexilo que tiene un umbral de olor de 0.002 ppm, aunque el primero pueda encontrarse en mayor concentración que el segundo.

<b>Variedades</b>	<b>Tipo</b>	<b>Compuestos volátiles Predominantes</b>	<b>Referencias</b>
 <b>Royal Gala</b>	TA (≈ 70% alcoholes)	<b>Esteres</b> Acetato de butilo (17%) Acetato de hexilo (6%) Acetato de 2 metil-butilo (4%) <hr/> <b>Alcoholes</b> n-Butanol (51%) n-Hexanol (8%) 2-Metil butanol (4%)	(Young et al. 1996)
 <b>Granny Smith</b>	TE (≈ 70% ésteres)	<b>Esteres</b> Acetato de butilo (7%) Acetato de 2-metil-propilo (7%) Acetato de propilo (12%) Propionato de t-butilo (7%) <hr/> <b>Alcoholes</b> Etanol (13%) 1-Propanol (5%)	(López et al. 1998a)
 <b>Golden Delicious</b>	TE (≈ 80% ésteres)	<b>Esteres</b> Acetato de butilo (10%) Acetato de hexilo (9%) Acetato de 2-metil-butilo (7%) Butirato de etilo (7%) Propionato de etilo (21%) <hr/> <b>Alcoholes.</b> 1-Hexanol (6%)	(López et al. 1998a)

Variedades	Tipo	Compuestos volátiles Predominantes	Referencias
<b>Bisbee Delicious</b>	TE (≈ 94%ésteres)	<b>Esteres</b> Acetato de butilo (21%) Acetato de hexilo (11%) Acetato de 2-metil-butilo (30%) Acetato de propilo (3%) 2-metil butirato de etilo (6%)	(Mattheis, Buchanan, and Fellman J.K. 1995)
		<b>Alcoholes</b> 1-butanol (4%)	
 <b>Starking Delicious</b>	TE (≈ 98%ésteres)	<b>Esteres</b> Acetato de etilo (22%) Acetato de 2-metil-butilo (3%) Butirato de etilo (17%) 2-metil butirato de etilo (31%) Hexanoato de etilo (4%) Propionato de etilo (3%) Propionato de t-butilo (13%)	(López et al. 1998b)

• Tabla 4-2: Compuestos volátiles predominantes en 5 variedades de manzana, a partir de frutos maduros de cada variedad, identificados y cuantificados por CG/EM.

#### 4.2.1.2. **Compuestos contributivos e impacto del aroma según la variedad. Descripción aromática.**

Los volátiles tienen un efecto pequeño si lo comparamos con el del ácido málico y los sólidos solubles, sobre el *flavor* dulce y el *flavor* ácido en manzana (Watada et al. 1981), sin embargo, la reducción de la emisión aromática se ha descrito como uno de los factores que probablemente influye más en la disminución del *flavor* global en la fruta (Fallik et al. 1997). Se puede señalar en general que los aldehídos de seis carbonos están relacionados con el aroma descrito como a maduro, aromático y frutal, mientras que el contenido en ésteres se relaciona con el aroma a sobremaduro, a queso (Poll 1985).

El aroma de la Royal Gala está caracterizado por cuatro compuestos que contribuyen a su aroma varietal (butanol y los acetatos de 2metil-butilo, butilo y hexilo), destacando de entre ellos el acetato de 2metil-butilo que con un bajo umbral de olor (0.005 ppm) y con su aroma a manzana roja es el compuesto impacto de esta variedad. El descriptor sensorial para el aroma de la Royal Gala es “manzana roja” que permite diferenciarla de otras percepciones de aroma a manzana como el de “manzana verde” asociado a la variedad Granny Smith o “manzana leñosa” asociado al cultivar Red Delicious. La asociación del butanol y los acetatos de 2metil-butilo y hexilo con el aroma a “manzana roja” confirma que el aroma definido a través de este descriptor para la Royal Gala es bastante diferente del de las manzanas tipo Delicious (Young et al. 1996).

En el perfil aromático de manzanas Granny Smith no hay ningún compuesto predominante, el aroma característico de la variedad se debe a una suma de las sensaciones floral-dulce-frutal producidas por los distintos ésteres y alcoholes presentes (López et al. 1998a).

En el cultivar Golden Delicious se identifican cuatro compuestos impacto que individualmente presentan el aroma identificado como olor a manzana que son el butanoato, 2-metilbutanoato y hexanoato de hexilo y el hexanoato de butilo, el resto de los volátiles contribuyen en la mezcla aromática dando el aroma global característico de la variedad (Pérez et al. 1993), destacando de entre ellos el Butirato de etil-2metilo.

En la variedad Starking Delicious son tres los compuestos que más contribuyen en la formación del aroma típico (ver Tabla 4-3) de entre ellos destaca el 2-metil butirato de etilo que además de ser el compuesto predominante en el aroma (31%), su bajo umbral de olor (0.0001 ppm) hace que el número de unidades de olor para esta variedad sea muy elevado.

El 2-metil butirato de etilo con un aroma frutal y bajo umbral de olor es el compuesto volátil que más contribuye en el aroma a manzana de las variedades de la familia Delicious (Mattheis, Buchanan, and Fellman J.K. 1995).

<b>Compuestos contributivos e impacto</b>	<b>Descripción aromática</b>	<b>Estado de madurez</b>	<b>Referencias</b>
<b>Royal Gala</b>			
Acetato de 2-metilbutilo	Manzana roja		
Acetato de 2-metilbutilo + Acetato de hexilo + butanol	Flavor a manzana roja	Madurez gustativa	(Young et al. 1996)
Hexil acetato + butanol, Acetato de 2-metilbutilo + butanol	Flavor dulce		
<b>Golden Delicious</b>			
Butanol Hexanol	Dulce	Madurez comercial	(López et al. 1998a)
Butirato de etilo 2-metil butirato de etilo	Frutal	Madurez comercial	(López et al. 1998a)
Acetato de propilo Acetato de butilo Acetato de pentilo Butirato de butilo	Sin nota aromática específica contribuyen al aroma global	Madurez comercial	(López et al. 1998a)
Butanoato de hexilo Hexanoato de butilo 2-metilbutanoato de hexilo Hexanoato de hexilo	Manzana	Madurez comercial	(Pérez et al. 1993)
Acetaldehído Trans-2-hexenal	Acidez picante	Madurez comercial	(López et al. 1998a)
$\alpha$ -farnaseno	Varietal	Madurez gustativa	(Song and Bangerth 1994)

<b>Compuestos contributivos e impacto</b>	<b>Descripción aromática</b>	<b>Estado de madurez</b>	<b>Referencias</b>
Acetato de etil-2metilbutilo	Varietal	Madurez gustativa	(Song and Bangerth 1994)
Acetaldehído	Verde intenso		
Trans-2-hexenal	Verde intenso		
Hexanal	Tierra		
Acetato de amilo	Frutal	Madurez gustativa	(Rizzolo and Polesello 1989)
Acetato de hexilo	Manzana		
Hexanol	Terroso-desagradable		
<b>Starking Delicious</b>			
2-metil butirato de etilo + Butirato de etilo + hexanoato de etilo	Varietal	Madurez comercial	(López et al. 1998b)


• Tabla 4-3: Descripción aromática para los compuestos contributivos e impacto del aroma en algunas variedades de manzana.


#### 4.2.2. Pera (*Pyrus communis* L)

La bibliografía existente sobre la producción y caracterización aromática en pera es mucho más escasa que la existente en manzana especialmente si la comparamos con la relacionada con la variedad Golden Delicious.

##### 4.2.2.1. Compuestos predominantes según la variedad

En las variedades de pera France y Bartlett los ésteres son los compuestos volátiles predominantes en el aroma, especialmente los acetatos de butilo, hexilo y propilo que constituyen en frutos maduros, aproximadamente el 80% de la fracción volátil en la pera France y el 40% en la Bartlett (ver Tabla 4-4).

<b>Variedades</b>	<b>Compuestos volátiles predominantes</b>	<b>Referencias</b>
	<b>Esteres</b>	(Shiota Haruyasu 1990)
	Acetato de butilo (23%)	
	Acetato de hexilo (49%)	
	Acetato de octilo (4%)	
	Acetato de propilo (6%)	
	<b>Alcoholes</b>	
	Hexan-1-ol (6%)	
	<b>Otros</b>	
<b>France</b>	$\alpha$ -Farnaseno (5%)	

Variedades	Compuestos volátiles predominantes	Referencias
 <b>Bartlett</b>	<b>Esteres</b>	(Shiota Haruyasu 1990)
	Acetato de butilo (21%) Acetato de etilo (14%) Acetato de hexilo (6%) Acetato de propilo (12%) (E),(Z)-deca-2,4-dienoato de etilo (7%) (E),(Z)-deca-2,4-dienoato de metilo (6%)	

• Tabla 4-4: Compuestos volátiles predominantes en 2 variedades de pera, a partir de frutos maduros de cada variedad, identificados y cuantificados por CG/EM

#### 4.2.2.2. **Compuestos contributivos e impacto del aroma según la variedad. Descripción aromática.**

El aroma típico de la variedad France se debe a una serie de ésteres comunes (ver Tabla 4-4) de entre los que destaca el acetato de hexilo que constituye él solo el 46% de la fracción volátil, el cual con un umbral de olor muy bajo (0.002 ppm) y una nota aromática definida como olor a pera es el compuesto impacto de la variedad. Oros dos compuestos contribuyen al aroma global enriqueciéndolo como son el  $\alpha$ -farneseno y el acetato de hex-5-enilo con sus matices a verde, cetónico y éster característico de esta variedad ( verTabla 4-5).

En la pera Bartlett, el aroma varietal se debe a un conjunto de ésteres de etilo y metilo poco comunes. El acetato de hexilo sigue siendo un compuesto impacto pero al encontrarse en mucha menor concentración que en el caso anterior su contribución al aroma varietal es baja, identificándose un segundo compuesto impacto el (E),(Z)-deca-2,4-dienoato de etilo característico de la variedad.

Compuestos contributivos e impacto	Descripción aromática	Estado de madurez	Referencias
<b>France</b>			
$\alpha$ -Farnaseno	Verde-recién pelado	Madurez gustativa	(Shiota Haruyasu 1990)
Acetato de hex-5-enilo	Basto-duro-herbáceo-cetónico-éster-queso azul	Madurez gustativa	(Shiota Haruyasu 1990)
Acetato de hexilo	Pera	Madurez gustativa	(Shiota Haruyasu 1990)
<b>Bartlett</b>			
(E),(Z)-deca-2,4-dienoato de etilo	Varietal	Madurez gustativa	(Shiota Haruyasu 1990)

<b>Compuestos contributivos e impacto</b>	<b>Descripción aromática</b>	<b>Estado de madurez</b>	<b>Referencias</b>
3-hidroxiocetanoato de metilo 3-hidroxiocetanoato de etilo (Z)-oct-4-enoato de metilo (Z)-oct-4-enoato de etilo (E)-oct-2-enoato de metilo (E)-oct-2-enoato de etilo (Z)-deca-4-enoato de metilo (Z)-deca-4-enoato de etilo (E)-deca-2-enoato de metilo (E)-deca-2-enoato de etilo	Sin nota aromática específica contribuyen al aroma global	Madurez gustativa	(Shiota Haruyasu 1990)
Acetato de hexilo	Pera	Madurez gustativa	(Shiota Haruyasu 1990)

• Tabla 4-5: Descripción aromática para los compuestos contributivos e impacto del aroma en algunas variedades de pera.

Al igual que en el caso de la manzana, en general los compuestos predominantes no son los fundamentales a la hora de definir el aroma global de la variedad.

### 4.2.3. Manzana y pera

Si se comparan la Tabla 4-2 y Tabla 4-4 con la Tabla 4-3 y Tabla 4-5, se observa que en general no aparecen los mismos compuestos aromáticos, es decir, que no son necesariamente los compuestos predominantes, muchos de los cuales son comunes en manzanas y peras, los más importantes en la contribución al aroma, como indica el concepto de valor aromático. Sin embargo siguen siendo los ésteres los volátiles más importantes en la construcción de la nota aromática varietal, son compuestos impacto el acetato de 2metil-butilo en la manzana Royal Gala, el 2-metil butirato de etilo en las variedades de manzana tipo Delicious, acetato de hexilo para la pera en general, acetato de hex-5enilo en la pera France y (E),(Z)-deca-2,4-dienoato de etilo en la pera Barllet

A pesar de que se han identificado compuestos impacto en algunas variedades, las diferencias aromáticas entre los distintos cultivares e incluso especies, no pueden justificarse en todos los casos por la existencia de compuestos cualitativamente distintos, sino que es necesario un estudio más profundo de las complejas interacciones que tienen lugar entre los distintos compuestos volátiles sintetizados y emitidos por el fruto. No hay que olvidar que la coincidencia de un pico identificado por CG con una nota aromática descrita por el panel sensorial, no significa necesariamente que sea ese compuesto el único y directo responsable del olor descrito, nunca puede descartarse la presencia de algún compuesto minoritario que sin embargo tenga gran influencia en el análisis sensorial, así como los sinergismos y antagonismos que puedan aparecer entre los distintos compuestos volátiles de la mezcla aromática.

### **4.3. Factores externos que afectan a la composición aromática de la fruta tras la recolección**

Distintos estudios han demostrado que los volátiles producidos por los frutos cambian cuantitativa y cualitativamente con la maduración (Watada et al. 1981). La velocidad de maduración de la fruta tras la recolección estará determinada por la combinación del estado de madurez con el que se recolecte la fruta, las condiciones de frigoconservación y la duración del almacenamiento (Mattheis, Buchanan, and Fellman J.K. 1995). El mayor incremento en la concentración de compuestos volátiles en la fruta se ha detectado varias semanas antes del pico climaterio, a partir de ese momento y a medida que avanza el climaterio la concentración de volátiles va disminuyendo (Fallik et al. 1997).

En este apartado se va a hacer un recorrido por la bibliografía existente sobre este tema.

#### **4.3.1. Fecha de recolección**

La madurez del fruto en el momento de la recolección influye en la producción aromática postcosecha, de forma que cuanto más verde y menos desarrollado se recolecte el fruto menor cantidad de compuestos aromáticos se desarrollarán durante el periodo de almacenamiento (Mattheis, Buchanan, and Fellman J.K. 1995)

El análisis del contenido en ácidos grasos en manzanas Golden Delicious, precursores tempranos de los compuestos volátiles del aroma, indicó que la fruta cosechada tempranamente contiene mucha menor cantidad de estos constituyentes particularmente en los ácidos palmítico, esteárico, oleico y linoleico, con lo que se puede concluir que la baja producción de aroma de manzanas procedentes de una cosecha temprana es debido a la reducida capacidad para la síntesis de ácidos grasos y aminoácidos de estos frutos (Song and Bangerth 1994).

En manzanas de la variedad Bisbee Delicious almacenadas en condiciones de Ultra Bajo Oxígeno (ULO) y Frío Normal (FN) se ha detectado que tras el almacenamiento los frutos procedentes de una cosecha más tardía emitían tras la maduración en estantería mayor cantidad de volátiles que los frutos recolectados en fechas más tempranas. La maduración de la fruta tras el almacenamiento en Atmósfera Controlada (AC) sólo mejoró la emisión de 2-metil butirato de etilo para la fruta recolectada en fechas próximas al climaterio (Mattheis, Buchanan, and Fellman J.K. 1995).

#### **4.3.2. Tipo de frigoconservación**

Los tratamientos de frigoconservación son un medio muy efectivo para retrasar la maduración de la fruta, pero también la síntesis de los compuestos que contribuyen al *flavor* y al aroma puede



inhibirse por un almacenamiento muy prolongado en AC, este efecto supresor aumenta a medida que disminuye la concentración de O<sub>2</sub>, aumenta la de CO<sub>2</sub> y se incrementa la duración del almacenamiento, recuperándose parcialmente la producción de volátiles sólo después de un cierto tiempo de vida en estantería (Mattheis, Buchanan, and Fellman J.K. 1995).

	<b>Tipos de AC</b>		
	<b>AC estándar (ACS)</b>	<b>Low oxigen (LO)</b>	<b>Ultra low oxigen (ULO)</b>
<b>Oxígeno %</b>	3	1.4-2	1-1.3
<b>Carbónico %</b>	2.5-3.8	1.5-2	<1

• Tabla 4-6: Combinaciones de concentración O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> para los distintos tipos de AC. Fuente: (Southgate 1992)

En el caso de la manzana una disminución de la sensibilidad del fruto hacia el etileno se ha sugerido como mecanismo que puede explicar los efectos de la AC, y la necesidad de maduración de los frutos a temperatura ambiente y atmósfera normal (vida en estantería) se explica porque es en estas condiciones cuando se activan los pasos terminales de la ruta de síntesis de los ésteres (Mattheis, Buchanan, and Fellman J.K. 1995). Por otro lado investigaciones sobre la biogénesis del aroma han señalado que la biosíntesis de ácidos grasos y amino ácidos juega un papel muy importante en la formación del aroma, así la supresión de esta producción durante los almacenamientos en ACS y ULO puede ser debida a la baja capacidad para la biosíntesis de ácidos grasos en estos frutos (Song and Bangerth 1994).

<b>Fruto</b>	<b>Efecto</b>	<b>Referencia</b>
<b>FN vs AC</b>		
① Golden Delicious ② Starking Delicious	Incluso tras largos períodos de almacenamiento emisión volátiles en FN y AC > frente recolección	① (López et al. 1999), (López et al. 2000) ② (López et al. 1998b)
Golden Delicious	LO emisión aromática ~ FN Cortos periodos de almacenamiento (3 meses) no son suficientes para detectar diferencias entre los dos tipos de almacenamiento	(López et al. 1999)
Golden Delicious	FN mayor emisión aromática que AC	(Mattheis, Buchanan, and Fellman J.K. 1995)
<b>ACS vs LO vs ULO</b>		
① Golden Delicious ② Granny Smith ③ Starking Delicious	LO emisión aromática >> ACS > ULO, especialmente para almacenamientos superiores a 5 meses	① (López et al. 1999), (Streif and Bangerth 1988) ② (Lavilla et al. 1999) ③ (López et al. 1998b)

Fruto	Efecto	Referencia
Golden Delicious	LO emisión de butirato de 2-metilo >>> ACS y ULO	(López et al. 1999)
Golden Delicious	ULO emisión aromática <<<ACS a partir de 3 meses de almacenamiento	(Streif and Bangerth 1988)

• Tabla 4-7: Efectos del tipo de almacenamiento sobre la emisión aromática de distintas variedades de manzana.

En la variedades de la familia Delicious consideradas (ver Tabla 4-7) es el almacenamiento en LO la mejor combinación dentro de las AC, al mantener los parámetros de firmeza, ácidos y azúcares en la fruta sin provocar una disminución significativa en la emisión aromática con respecto al FN y no restringiendo la síntesis de los ésteres de cadena ramificada como el 2-metil butirato de etilo que se define como uno de los compuestos responsables del *flavor* en manzanas de la familia Delicious.

#### 4.3.3. Duración de la conservación frigorífica

En general la capacidad del fruto de recuperar la producción aromática tras el almacenamiento en AC durante la vida en estantería disminuye a medida que aumenta la duración del almacenamiento. Manzanas Golden Delicious almacenadas durante tres meses son capaces de recuperar casi por completo su capacidad de emisión de volátiles para todos los tratamiento de LO y ULO a las que fue sometida, según se va alargando el periodo de almacenamiento la capacidad de la fruta a recuperarse disminuye sobre todo para los lotes sometidos a los tratamientos de AC más eficientes. Esta menor emisión de volátiles se ha correlacionado en los test organolépticos con el reducido *flavor* que presentan manzanas que han sido almacenadas durante un largo periodo de tiempo (Streif and Bangerth 1988).

Durante el almacenamiento frigorífico el fruto produce distintas sustancias volátiles como consecuencia de su metabolismo, estos compuestos contribuyen significativamente a la calidad organoléptica de la fruta almacenada, que son de especial importancia en almacenamientos de larga duración (seis a nueve meses) (Rizzolo and Polesello 1989).

Análisis estadísticos han demostrado que la interacción entre el periodo de almacenamiento y los días de maduración en estantería es el factor que presenta el efecto más significativo sobre la producción total de ésteres y alcoholes en manzanas Golden Delicious (López et al. 1999), siendo en la variedad Starking Delicious el periodo de almacenamiento el factor que produce el principal efecto sobre los distintos parámetros de madurez (Lavilla et al. 1999).

Para las variedades Delicious el periodo de almacenamiento de 5 meses (ver Tabla 4-8) es el óptimo para la máxima emisión de volátiles.

Fruto	Efecto	Referencia
<p>① Starking Delicious ② Golden Delicious</p>	<p>Aumento de la emisión aromática durante la vida en estantería para frutos conservados tanto en FN como AC</p>	<p>① (López et al. 1998b) ② (Streif and Bangerth 1988)</p>
<p>① Starking Delicious ② Golden Delicious</p>	<p>Para todas las cámaras <b>máxima emisión de volátiles a los 5 meses</b> de almacenamiento, periodos de almacenamiento &gt; a 5 meses se traducen en un descenso en la emisión aromática</p>	<p>① (López et al. 1998b) ② (Streif and Bangerth 1988), ② (López et al. 1999)</p>
<p>Golden Delicious</p>	<p>Producción de ésteres &gt; producción de alcoholes para todos los tiempos de almacenamiento considerados</p>	<p>(López et al. 1999)</p>

• Tabla 4-8: Efecto del tiempo de almacenamiento sobre la emisión aromática en distintas variedades de manzana.

#### 4.3.4. Vida en estantería

En general, tras un almacenamiento en AC, se necesita un tiempo de maduración en condiciones ambientales para que la fruta recupere su capacidad de emisión de volátiles y por tanto la producción aromática característica de un fruto maduro. El efecto que la vida en estantería tiene en la producción aromática del fruto según diversos autores se indica en la siguiente tabla:

Fruto	Efecto	Referencia
<p>Granny Smith</p>	<p>Condiciones de LO y ULO no favorecen la producción de ésteres ramificados durante la vida en estantería</p>	<p>(Lavilla et al. 1999)</p>
<p>Golden Delicious</p>	<p>FN, ACS y ULO máxima emisión de volátiles tras 5 días de vida en estantería. LO máxima emisión tras 10 días de maduración en estantería</p>	<p>(Lavilla et al. 1999)</p>
<p>Starking Delicious</p>	<p>Máxima emisión de butirato de etil 2-metilo tras 5 días de vida en estantería, para ACS y LO después de 5 meses de almacenamiento</p>	<p>(López et al. 1998b)</p>

• Tabla 4-9: Efecto de la vida en estantería sobre la emisión aromática en distintas variedades de manzana.

## Parte II.

### 4.4. Técnicas para la medida del olor

Para analizar los efluentes gaseosos (olores o aromas) emitidos por los frutos podemos considerar dos aproximaciones tradicionales, el análisis olfatométrico y el análisis físico-químico. Mientras que el primero se basa en el análisis sensorial el segundo se basa en métodos analíticos clásicos. El análisis físico-químico permite identificar la composición de la mezcla olorosa, cuantitativa y cualitativamente, mientras que el análisis olfatométrico permite analizar el olor de una forma global puesto que tiene en cuenta las moléculas químicas en el origen del olor así como el sistema fisiológico sin el cual no habría percepción de ese olor.

Junto con el análisis sensorial se ha desarrollado a lo largo de los últimos 12 años otra técnica que se podría considerar como una segunda aproximación al análisis global del aroma basada en el uso de sensores de gases en los equipos que reciben el nombre de narices electrónicas.

En esta segunda parte de la Revisión Bibliográfica se aborda el estudio dentro del grupo de técnicas de análisis físico-químico del aroma de tres básicas: Cromatografía de gases, Espectrometría de masas y la combinación Cromatografía de gases/Espectrometría de masas, de algunos de los últimos desarrollos que combinan los métodos de análisis físico-químicos con los sensoriales y/o con las narices electrónicas, así como el análisis olfatométrico.

#### 4.4.1. Cromatografía de gases

La definición oficial para la técnica de cromatografía de la *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) es: "Cromatografía es un método físico de separación en el cual la muestra, es separada en sus distintos componentes, al distribuirse entre dos fases, una de las cuales es estacionaria (fase estacionaria) mientras que la otra (fase móvil) se mueve en una determinada dirección. La cromatografía de elución es un procedimiento en el cual la fase móvil está pasando continuamente a través de la fase estacionaria y en el que la muestra entra al sistema en forma de un fragmento estrecho". (McNair and Miller 1999)

En la cromatografía de gases (CG) la fase móvil es un gas y el equipo que se emplea para realizar el análisis recibe el nombre de Cromatógrafo de gases. El cromatógrafo es un equipo versátil permitiendo obtener a través del análisis del cromatograma información de carácter cuantitativo y cualitativo.

➤ **Análisis cuantitativo**

La CG es una técnica eminentemente cuantitativa. El principio básico de la cuantificación es que el área de los picos registrados en el cromatograma es proporcional a la masa del compuesto inyectado. Así, es fundamental para la fiabilidad del análisis que el área de los picos sea medida de la forma más exacta y reproducible posible.

➤ **Análisis cualitativo**

Aunque con limitaciones, el cromatógrafo de gases también puede utilizarse para realizar análisis cualitativos, basándose en los parámetros cromatográficos de volumen de retención ( $V_R$ ) o tiempo de retención ( $t_R$ ) relacionados a través del parámetro flujo del gas portador ( $F_c$ )

$$V_R = t_R \cdot F_c$$

• Ecuación 4-1: relación entre los parámetros de volumen y tiempo de retención

Así el  $t_R$  para un soluto dado puede utilizarse para identificarlo en una muestra desconocida si las condiciones de trabajo de la columna se mantienen constantes: longitud, grosor y tipo de fase estacionaria, temperatura y presión. Así si por ejemplo se desea conocer que alcoholes se encuentran en la composición de una mezcla deberán inyectarse una serie de patrones de n-alcoholes en idénticas condiciones y obtener sus cromatogramas tipo, de forma que aquellos picos cuyos  $t_R$  coincidan con los de los patrones podrán identificarse como el alcohol correspondiente.

Este procedimiento no es efectivo cuando el número de compuestos de la mezcla es grande, ya que distintos compuestos pueden presentar idénticos  $t_R$ , parámetro éste que además es característico para un cromatógrafo de gases y unas condiciones de trabajo determinadas con lo que los  $t_R$  para un mismo compuesto no son únicos.

➤ **Ventajas e inconvenientes en el uso del CG para la medida del aroma**

Las principales ventajas e inconvenientes de esta técnica se indican en la siguiente tabla:

<b>VENTAJAS</b>	<b>INCONVENIENTES</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Es la principal técnica analítica empleada para la separación de compuestos volátiles</li> <li>• Alta resolución</li> <li>• Resultados cuantitativos excelentes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alto consumo de tiempo para la preparación de la muestra</li> <li>• Alto consumo de tiempo en la separación de muestras complejas como olores o sabores</li> <li>• Elevado coste</li> <li>• No puede confirmar la identidad de algunos picos, ni describir exactamente la composición de una muestra</li> <li>• Análisis individualizado de los componentes de la muestra</li> </ul>

• Tabla 4-10: Ventajas e inconvenientes en el uso y aplicación de la técnica de CG

#### 4.4.2. Espectrometría de masas

La Espectrometría de Masas ó Espectroscopía de Masas (EM), es una técnica instrumental que permite la generación de iones en fase gaseosa además de su separación y detección.

Una vez ionizada la muestra, la separación se puede realizar por la aplicación de campos magnéticos, eléctricos, de radiofrecuencia, combinaciones de varios de ellos, o por medida del tiempo de desplazamiento de los iones a lo largo de una distancia fijada previamente. El sistema más tradicional se basa en el empleo de un campo magnético generado por un electroimán, en el cual iones de igual carga describen trayectorias de diferentes radios en función de sus masas. La ecuación fundamental de la EM (ver Ecuación 4-2) indica que la relación masa ( $m$ ) / carga ( $z$ ) depende, de la intensidad del campo magnético ( $B$ ), del radio de curvatura de los iones ( $r_m$ ) y del potencial de aceleración ( $U$ ) (Hesse, Meier, and Zeeh 1997),(McNair and Miller 1999).

$$\frac{m}{z} = \frac{r_m^2 \cdot B^2}{2 \cdot U}$$

• Ecuación 4-2: ecuación fundamental de la EM

Para que se pueda extraer un resultado importante e inequívoco del espectro de masas de una determinada sustancia, la muestra debe ser homogénea, es decir, estar pura. En estas condiciones es posible identificar y cuantificar la muestra problema. Frente a la CG técnica eminentemente cuantitativa la EM es eminentemente cualitativa.

##### ➤ **Análisis cualitativo**

La representación gráfica de la abundancia relativa de los distintos fragmentos de la molécula versus su relación  $m/z$  da como resultado el espectro de masas típico de la molécula original.

Los espectros de masas se pueden digitalizar (masas e intensidades) y almacenar en la memoria de un ordenador de forma que sea posible disponer de una biblioteca de espectros. Para muestras de estructura desconocida se procede a la identificación realizando, con ayuda del ordenador, una comparación del espectro problema con los espectros almacenados en la biblioteca. Las bibliotecas con más de 10.000 espectros diferentes son comercialmente asequibles.

##### ➤ **Análisis cuantitativo**

El detector permite registrar la corriente iónica total (TIC) provocada por la muestra analizada. El valor total de la suma de las intensidades de todos los picos registrados en el espectro de masas, se identifica como el valor de TIC.

### ➤ **Ventajas e inconvenientes**

La técnica de EM presenta las ventajas e inconvenientes que se indican a continuación en la siguiente tabla:

<b>VENTAJAS</b>	<b>INCONVENIENTES</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Requiere sólo microgramos de muestra</li><li>• Permite realizar análisis cuantitativos de la muestra</li><li>• Permite realizar análisis cualitativos de la muestra, aportando información sobre su estructura, composición elemental y peso molecular</li><li>• Se conecta o acopla fácilmente con un cromatógrafo de gases</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Para que el análisis cuantitativo y cualitativo pueda llevarse a cabo necesita emplear muestras puras</li><li>• No es portátil.</li><li>• Requiere personal especializado</li><li>• Uso específico en laboratorio</li></ul>

• Tabla 4-11: Ventajas e inconvenientes en el uso y aplicación de la técnica de EM

#### **4.4.3. Espectrometría de masas de “fingerprint” (EMF)**

La EMF es una técnica que permite la caracterización directa por EM de los compuestos volátiles orgánicos del espacio de cabeza generado por el alimento sin separación previa de los mismos.

Cuando por EM se muestrean mezclas gaseosas todos los componentes de la misma sufren simultáneamente la ionización no pudiendo identificar que fragmentos o relaciones  $m/z$  corresponden a un compuesto u a otro por lo que resulta imposible identificar y cuantificar cada uno de los componentes individuales de la mezcla volátil. Sin embargo cada mezcla genera una fragmentación iónica característica, obteniéndose un espectro superpuesto o “fingerprint” correspondiente a todos los volátiles presentes en la muestra, de ahí que con este tipo de análisis de datos esta técnica sea considerada de análisis global y los equipos comerciales, como por ejemplo la Smart Nose-300, reciban el nombre de “narices electrónicas” aunque su construcción no se ajusta a la arquitectura típica de una NE al no usar como detectores los sensores de gases descritos en la Parte III de la presente tesis.

El instrumento básicamente consiste en un muestreador automático de espacio de cabeza acoplado directamente a un detector de masas cuadrupolar, donde cada fragmento iónico representa un potencial elemento sensible, y la intensidad del fragmento iónico es equivalente a la señal del sensor (Garrigues et al. 2001).

Esta técnica presenta todas las ventajas e inconvenientes típicos de la EM, entre las ventajas la más significativa es que es capaz de proveer una señal, en este caso un “fingerprint”, muy preciso y reproducible de cada muestra por lo que la identificación de la misma es una tarea por lo general sencilla y la comparación de un gran conjunto de datos fácil.

#### **4.4.4. Análisis sensorial y olfatometría**

Como se indicó al inicio de este capítulo el análisis sensorial es una técnica de análisis global del aroma , que utiliza como equipo de medida el órgano olfativo humano de los miembros de un panel sensorial.

##### **4.4.4.1. El mecanismo del olfato**

Aunque actualmente ninguna de las teorías existentes sobre la codificación del olor explican totalmente nuestras sensaciones olorosas, estudios anatómicos y fisiológicos sugieren que dentro del epitelio olfativo (tejido celular que constituye la capa externa de las mucosas) la cualidad de un olor es codificada por un amplio conjunto de células receptoras cuya respuesta crea un patrón topográfico y temporal que constituye la representación no procesada de la cualidad del olor en el cerebro. Tales patrones espacio-temporales podrían ser el resultado de por un lado, la distribución de las moléculas olorosas en las células receptoras impuesta por sus interacciones con el mucus nasal, en función de su vibración, forma y orientación , por otro del ritmo de las inspiraciones y expiraciones y por último, de las diferencias determinadas genéticamente en la distribución de las células receptoras olfativas en el epitelio (Maruniak 1996).

El hecho de que la información olfativa llegue hasta el hipocampo (parte del lóbulo temporal del cerebro) es de gran importancia ya que tiene como resultado que el olfato esté fuertemente asociado a la memoria, de forma que los recuerdos olfativos son muy persistentes (Bauer, Santi, and Utermohlen 2000).

##### **4.4.4.2. El análisis sensorial**

Se entiende por análisis sensorial como la determinación y medida de los atributos, de un producto, percibidos a través de los sentidos: vista, oído, olfato, gusto y tacto (Büking 2000).

La caracterización del análisis sensorial se va a abordar en tres aspectos:

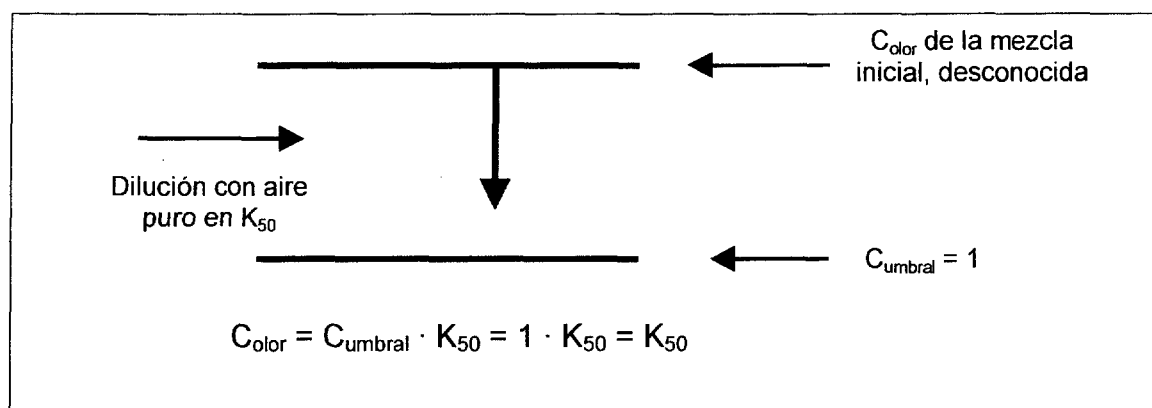
###### **➤ Umbrales en el análisis sensorial**

En el análisis sensorial se consideran los siguientes conceptos:

- ✓ **UMBRAL DE DETECCIÓN:** es la mínima concentración de una sustancia que puede ser detectada en el medio bajo estudio. La convención comúnmente aceptada es considerar la concentración umbral como aquella que tiene una probabilidad de detección correcta del 50% (Shepherd 1999).



Así la concentración de olor ( $C_{olor}$ ) de cualquier mezcla gaseosa olorosa se define con respecto a su concentración al nivel de percepción ( $C_{umbral}$ ), es decir, con respecto su umbral de detección. Se considera  $C_{umbral} = 1$ , donde esta concentración se expresa en “unidades de olor por  $m^3$  ( $uo/m^3$ )”, indicando la cantidad de producto que diluido en  $1m^3$  de aire da la  $C_{umbral}$  de la mezcla considerada. Para llevar la  $C_{olor}$  de una mezcla al nivel de percepción, es necesario diluirla con aire puro e inodoro en una cantidad que recibe el nombre de “factor de dilución ( $K_{50}$ ) al nivel de percepción”, por tanto, la  $C_{olor}$  de una mezcla es  $K_{50}$  veces más elevada que su  $C_{umbral}$ , al considerar éste último valor como igual a uno, la  $C_{olor}$  se obtendrá directamente a partir del  $K_{50}$  que es el parámetro que se deberá determinar (ver Figura 4-2), utilizando un equipo que recibe el nombre de olfatómetro (Gouronnec and Najean 2001).



• Figura 4-2: esquema explicativo de la relación entre  $C_{olor}$  y  $C_{umbral}$  de una mezcla en análisis sensorial

- ✓ **UMBRAL DE RECONOCIMIENTO:** es la mínima concentración de una sustancia que puede ser reconocida en el medio bajo ensayo (Shepherd 1999).
- ✓ **UMBRAL TERMINAL:** es la concentración por encima de la cual, incrementos en la misma no pueden ser diferenciados (Büking 2000).
- ✓ **ANOSMIA:** ceguera olfativa, puede ser muy específica hacia un determinado olor y generalmente es hereditaria (Büking 2000).

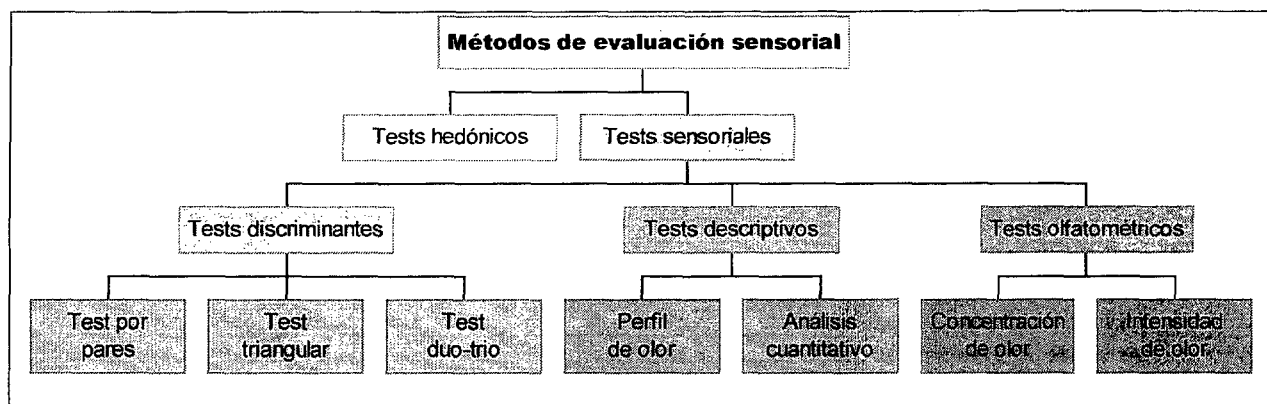
#### ➤ **Métodos de evaluación sensorial**

Existen distintos métodos de evaluación sensorial (ver Figura 4-3) en función del objetivo que se persiga. Los Tests hedónicos miden impresiones subjetivas, mientras que los sensoriales determinan características objetivas midiendo diferencias entre productos similares o describiendo las características del producto (Büking 2000).

Los ensayos sensoriales de carácter objetivo se desarrollan siguiendo métodos de ensayo científicos y exactos, de forma que los resultados que de ellos se obtienen son reproducibles y pueden ser analizados estadísticamente incluso su realización está regulada a través de la norma

UNE 87013:1996. Estos análisis tratan de dar respuesta a dos tipos de preguntas, ¿hay diferencias entre los productos considerados? y ¿cuál es la diferencia y como es de grande? (Shepherd 1999).

Además de los métodos de evaluación sensorial tradicionales, se ha desarrollado una técnica específicamente para el análisis de gases que recibe el nombre de olfatometría y que permite obtener información objetiva sobre la concentración e intensidad de un olor.



• Figura 4-3: organigrama explicativo de los distintos métodos existentes para la evaluación sensorial de los alimentos.

### ➤ Ventajas e inconvenientes de la evaluación sensorial

Las principales ventajas e inconvenientes de esta técnica se enumeran en la siguiente tabla:

VENTAJAS	INCONVENIENTES
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ahorra tiempo, esfuerzo y materiales en el desarrollo de nuevos productos.</li> <li>• Permite identificar las preferencias del consumidor y los nichos de mercado en etapas tempranas</li> <li>• Ayuda a asegurar, que la calidad del producto producido está al día, conociendo la calidad establecida por los estándares y los requerimientos del consumidor.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Elevado coste de realización de los tests debido a la necesidades de instalaciones específicas, a la necesidad de entrenamiento de los catadores y al tiempo requerido por los jueces para cada prueba.</li> <li>• Elevado consumo de tiempo por test. El director del panel sensorial debe invertir entre 1 y 2 horas por cada prueba. El resto de miembros del panel deben invertir entre 0 y 10 horas de entrenamiento y entre 10 y 60 minutos por cada test sensorial que realicen.</li> <li>• Fatiga de los jueces</li> <li>• No es posible la portabilidad a la fuente olorosa</li> </ul>

• Tabla 4-12: Ventajas e inconvenientes de la técnica de análisis sensorial de los alimentos.

## 4.4.5. Técnicas combinadas de análisis

### 4.4.5.1. Cromatografía de gases/Espectrometría de masas (CG/EM)

El emparejamiento de estas dos técnicas trata de aprovechar las ventajas de cada método, eliminando los principales inconvenientes que cada uno de ellos individualmente presenta. Así el cromatógrafo de gases se emplea para separar los distintos componentes de la mezcla, sustituyéndose el típico detector de ionización a la llama (FID) que sólo permite obtener datos cuantitativos, por un espectrómetro de masas de baja resolución al que acceden de forma separada

(y por tanto pura) cada uno de los analitos de la muestra problema procediendo a su identificación (análisis cualitativo) y a su cuantificación. Este método presenta ocasionalmente ventajas para la resolución de problemas específicos como puede ser la identificación de los componentes de un aroma (Hesse, Meier, and Zeeh 1997), (McNair and Miller 1999).

La combinación CG/EM es actualmente un método rutinario de la química analítica orgánica puesto que su uso conjunto presenta las ventajas e inconvenientes que se enumeran a continuación (Frank 2000):

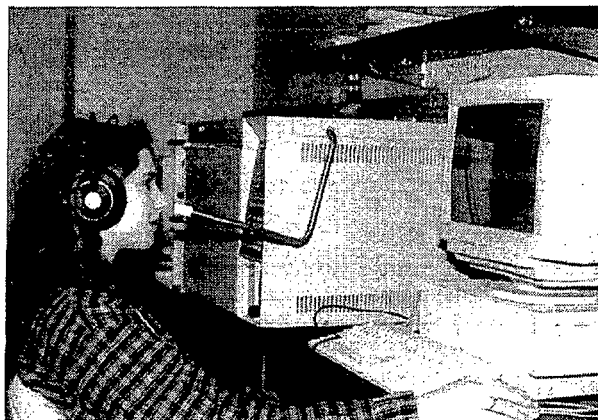
VENTAJAS	INCONVENIENTES
<ul style="list-style-type: none"><li>• Es una técnica analítica real ya que permite la identificación y cuantificación de los distintos componentes de una mezcla</li><li>• Amplio rango de aplicaciones</li><li>• Alta fiabilidad</li><li>• Arquitectura abierta que permite construir distintas soluciones para las aplicaciones posibles</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Alto coste de adquisición ( más de 75.000 €)</li><li>• Altos requerimientos de mantenimiento</li><li>• Manejo por operarios especializados y cualificados</li><li>• La necesidad de un sistema de vacío limita o hace imposible la portabilidad del equipo.</li></ul>

• Tabla 4-13: Ventajas e inconvenientes en el uso y aplicación de la técnica de CG/EM

#### 4.4.5.2. Cromatografía de gases – olfatometría (CGO)

La CGO es una importante herramienta analítica en el estudio del *flavor* de los alimentos puesto que permite caracterizar el olor de cada componente de la mezcla gaseosa de forma individual.

El instrumento consiste en un CG tradicional que presenta al final de la columna dos salidas paralelas, una de las cuales dirige el efluente hacia el detector tradicional ya sea del tipo FID o un espectrómetro de masas, y la otra constituye el puerto de "olfateo" (ver Figura 4-4) que es el que utiliza el juez para oler los compuestos que van saliendo secuencialmente de la columna (Frank 2000).



• Figura 4-4: Imagen de un equipo CGO, en la que la juez está analizando la muestra a través del puerto de "olfateo".

La nariz humana tiene un límite teórico de detección de aproximadamente  $10^{-19}$  moles, lo que convierte a la CGO en una herramienta muy valiosa y sensible para la detección del olor característico de los distintos volátiles.

La CGO es usada habitualmente para detectar compuestos impacto del aroma, de los cuales se encuentran sólo trazas en el espacio de cabeza generado por el alimento así como para la identificación de aquellos compuestos que resultan inodoros para el olfato humano. Sin embargo no

hay que olvidar que esta técnica presenta limitaciones (Mistry, Reineccius, and Olson 1997) (ver Tabla 4-14).

En primer lugar ya se ha indicado que en la mezcla gaseosa se producen una serie de interacciones entre los distintos componentes que modifican la sensación final en el olfato que ofrecen dentro del conjunto, en esta técnica al proceder a la separación previa de los compuestos a lo largo de la columna, hace que el juez emita un juicio sobre el olor de cada compuesto fuera de su contexto, lo que puede hacer que la evaluación de su contribución al olor del alimento sea difícil o imposible de asegurar con precisión. Por otro lado el orden de elusión, el carácter y la intensidad del olor percibido de un compuesto influirá directamente en la intensidad percibida del compuesto eluido inmediatamente después, a este efecto se le denomina “efecto contraste”. Además para poder diferenciar claramente entre dos compuestos consecutivos la distancia mínima entre tiempos de retención consecutivos es de 10 segundos. Otra limitación de la CGO es que la fatiga, la saturación sensorial y la adaptación olfativa del juez, influirá negativamente en las intensidades detectadas, debiendo ser por tanto estos efectos minimizados tomando todas las precauciones y recomendaciones en la realización de las catas que se establecen para cualquier análisis sensorial.

Por último, no deberían ensayarse por CGO sustancias de composición desconocida, puesto que la salud y la seguridad de los jueces que evalúan las muestras debe ser la primera preocupación. Hay sustancias que pueden causar cáncer nasal u otro tipo de intoxicaciones que por su puesto no podrán ser analizadas a través de esta técnica.

<b>VENTAJAS</b>	<b>INCONVENIENTES</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Permite identificar el olor de compuestos con umbrales de detección muy bajos</li> <li>• Permite identificar a los compuestos inodoros</li> <li>• Permite identificar a los compuestos impacto</li> <li>• Aporta información complementaria a la CG tradicional</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• durante el olfateo la intensidad del olor no puede ser evaluada exactamente</li> <li>• necesidad de un entrenamiento exhaustivo de los jueces</li> <li>• distancia mínima entre tiempos de retención de 10 s.</li> <li>• Fatiga de los jueces después de aproximadamente 30 min.</li> <li>• Imposibilidad de testar productos tóxicos</li> <li>• Caro</li> <li>• Consume mucho tiempo</li> <li>• Análisis del aroma individual fuera de contexto</li> </ul>

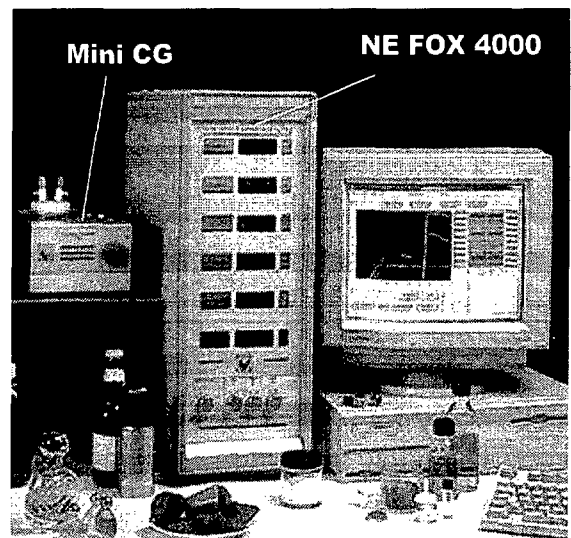
• Tabla 4-14: Ventajas e inconvenientes que presenta la técnica CGO.

#### 4.4.5.3. **Cromatografía de gases – nariz electrónica (CG-NE)**

Este instrumento híbrido que combina una matriz de sensores con un mini-CG, trata de aprovechar las mejores características de una NE y las de un mini-CG, tales como el software de análisis de datos para interpretar las señales de la matriz de sensores y la velocidad, alta sensibilidad y selectividad del CG.

El equipo consiste en un cromatógrafo de gases de columna corta al que se acopla una matriz de sensores como detector que trabaja paralelamente al detector tradicional en CG, por tanto la configuración es muy similar a la utilizada en CGO. El mini cromatógrafo realiza una cierta separación de los compuestos de la mezcla mucho más rápida que el cromatógrafo de gases tradicional, que permite la utilización de matrices de sensores de menor tamaño. La matriz de sensores permite obtener una información global que complementa a la obtenida a través del detector tradicional.

Usando esta configuración se han desarrollado prototipos (ver Figura 4-5) y algunos equipos comerciales, como los desarrollados por la empresa Electronic Sensor Technology (USA), que los fabricantes comercializan bajo el nombre de NE a pesar de que su configuración no se ajusta a lo que estrictamente entenderíamos por una NE (ver Anejo IV Equipos Comerciales).



• Figura 4-5: Prototipo Bio-MEMS de CG-NE desarrollado por la Universidad de Ohio (USA).

#### 4.4.6. Estimación de la emisión aromática

La respuesta de los distintos equipos existentes para la determinación de gases depende en gran medida de la concentración de la muestra gaseosa o espacio de cabeza que se va a analizar.

Esta concentración se puede estimar desde un punto de vista puramente teórico, partiendo de una disolución ideal. Así la concentración que de soluto y disolvente se alcanza en el espacio de cabeza, una vez conseguido el equilibrio entre las fases líquida y gaseosa, se puede estimar a través de las leyes de Raoult y Dalton (Grenier 1998):

$$\textcircled{1} \quad P_{V_i} = X_i \cdot P_{V_i}^0 \quad \textcircled{2} \quad Y_i = \frac{P_{V_i}}{P_{V_T}}$$

$P_{V_i}^0$  Presión de vapor para el producto  $i$  puro (mmHg)  
 $P_{V_i}$  Presión de vapor para el producto  $i$  (mmHg)  
 $X_i$  Fracción molar del producto  $i$  en la fase líquida

• Ecuación 4-3: Ley de Raoult  $\textcircled{1}$  y ley de Dalton  $\textcircled{2}$  para una disolución ideal en el equilibrio.

donde la concentración del soluto  $i$  en la fase gaseosa, se obtiene a través de la siguiente expresión:

$$C_i = \frac{m_i \cdot Pm_{agua}}{(m_i \cdot Pm_{agua}) + (m_{agua} \cdot Pm_i)} \cdot \frac{Pm_i}{Pm_{aire}} \cdot \frac{Pv_i^o}{Pv_T} \cdot 10^6$$

$C_i$  Concentración del analito  $i$  en la fase gaseosa (mg/kg<sub>aire</sub>)

$m$  Masa (g)

$Pm$  Peso molecular (g/mol)

• Ecuación 4-4: Ecuación para la estimación de la concentración de un volátil en el espacio de cabeza a partir de una disolución ideal y una vez alcanzado el equilibrio.

En una mezcla ideal la fuerza de atracción entre las moléculas de los distintos componentes debe ser la misma que entre moléculas de un mismo compuesto, premisa que se cumple sólo en el caso de mezclas entre isótopos, isómeros y vecinos de una serie homóloga (p.ej. benceno y tolueno) (Spang, B., 2001). Según lo expuesto no se podría aplicar la ley de Raoult tal y como se ha considerado ya que se comete un error importante en la predicción de la presión de vapor a través de la ecuación de Antoine, error que se compensa introduciendo los conceptos de actividad ( $a_i$ ) y coeficiente de actividad ( $\gamma$ ). El coeficiente de actividad mide la desviación del comportamiento del componente  $i$  con respecto al de la disolución ideal o diluida ideal, así la ley de Raoult se modifica para tener en cuenta la no idealidad en la disolución según la siguiente ecuación (Levine, 1984);  $Pv_i = \gamma_i \cdot X_i \cdot Pv_i^o$ , si incluimos este coeficiente en la Ecuación 4-4, esta se escribirá:

$$C_i = \gamma_i \cdot \frac{m_i \cdot Pm_{agua}}{(m_i \cdot Pm_{agua}) + (m_{agua} \cdot Pm_i)} \cdot \frac{Pm_i}{Pm_{aire}} \cdot \frac{Pv_i^o}{Pv_T} \cdot 10^6$$

• Ecuación 4-5: Ecuación para la estimación de la concentración de un volátil en el espacio de cabeza a partir de una disolución no ideal y una vez alcanzado el equilibrio.

Si la actividad se define como  $a_i = \gamma_i \cdot X_i$ , y cumpliéndose que en una disolución ideal  $\gamma_i = 1$ , la actividad del compuesto  $i$  coincidirá con su fracción molar en la fase líquida ( $a_i = X_i$ ) en una disolución ideal. Estas ecuaciones no conducen a nada a menos que sea posible determinar los coeficientes de actividad que hay que estimar a partir de datos experimentales basados en la medición de la presión de vapor de la disolución y del análisis químico del espacio de cabeza que permite determinar los valores  $Y_i$  (Fisicoquímica, 1984).

Así la estimación teórica de la concentración está sometida a una primera corrección a través del coeficiente de actividad que aproxima los valores teóricos a los reales, sin embargo, puede que aún así, los valores de emisión aromática reales referidos en la primera parte de la revisión bibliográfica y cuantificados principalmente por CG, sean discutibles en cuanto a la representabilidad

real de la composición del espacio de cabeza generado por un fruto entero, fundamentalmente cuando se utilizan técnicas de obtención de la muestra del tipo espacio dinámico con purga y trampa, donde los volátiles son retenidos y concentrados en TENAX y posteriormente liberados en éter. Este explicaría en gran medida la dificultad de encontrar correlaciones entre las medidas obtenidas por CG y aquellas correspondientes a paneles sensoriales o narices electrónicas (Mielle 2000).

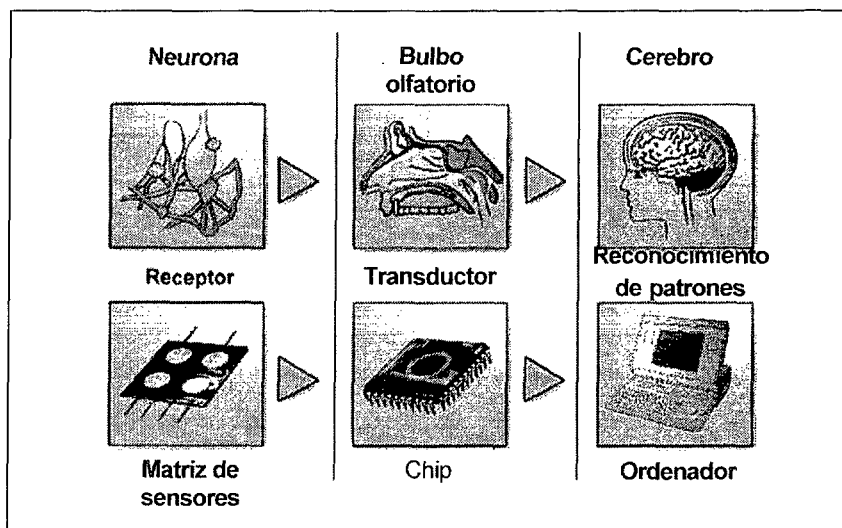
## Parte III.

### 4.5. Narices electrónicas

Las "narices electrónicas", también llamadas (para muchos más correctamente) "sensores de aromas", "sensores de olores" o "sensores de gases", son equipos desarrollados con el objetivo de conseguir la caracterización instrumental del aroma de los alimentos.

Gardner y Bartlett (1993) definieron la NE como: "un instrumento compuesto por un conjunto de sensores químicos electrónicos con especificidad parcial y un apropiado sistema de reconocimiento de patrones, capaz de reconocer olores simples o complejos". (Mielle 1996).

Una nariz electrónica (NE) puede considerarse como una copia muy simplificada del órgano olfativo humano (ver Figura 4-6).



• Figura 4-6: Comparación de los elementos básicos de una NE con el sistema olfativo humano

Células receptoras y cilia son reemplazadas por sensores de gases no específicos que reaccionan con diversos compuestos volátiles, no hay mucus en el que las moléculas olorosas puedan disolverse pero éstas se adsorben sobre el recubrimiento sensible de los sensores. La transducción de la señal desde los receptores olfativos es reemplazada en una NE por circuitos de acondicionamiento de la señal convirtiéndola normalmente en una señal eléctrica de voltaje, y por último la codificación de la señal neuronal para poder reconocer un olor y su intensidad en los humanos es sustituida en la NE por algún tipo de reconocimiento de patrones (Lacey and Osborn 1998).

Al igual que en los humanos es una técnica de análisis global ya que no se necesita identificar concienzudamente cada uno de los distintos constituyentes de un olor sino reconocerlo. Sin embargo no hay que olvidar que los sistemas actualmente disponibles no trabajan exactamente



igual que una nariz humana ya que no detectan los mismos volátiles que ésta además de presentar mucha menor sensibilidad, la nariz humana presenta un umbral de detección que típicamente se sitúa entre 1000 ppm y menos de 1 ppt (ver Tabla 4-15), de ahí que como se ha señalado más arriba, algunos autores prefieran llamar a estos equipos sensores de gases y no narices electrónicas para que no exista esa asociación directa entre este equipo y la nariz humana (Mielle 1996) .

<b>Aspecto</b>	<b>Nariz Humana</b>	<b>Nariz electrónica</b>
Nº de células receptoras olfativas / sensores	40 millones	4 a 32
Area de mucus olfativo / sensores	5 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>
Nº de cilia por célula receptora olfativa	10-30	---
Concentración media para detección del umbral de musk	0.00004 mg/ l de aire	Desconocida

• Tabla 4-15: Comparación de la capacidad sensitiva de la nariz human vs, NE (Lacey and Osborn 1998).

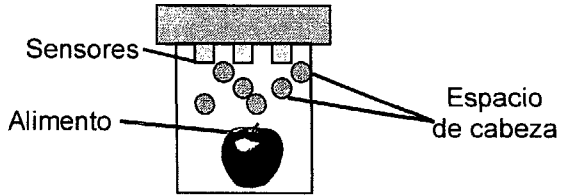
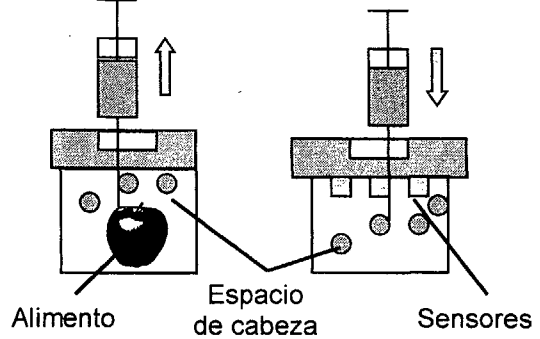
En términos generales se considera que hay varias etapas involucradas en el funcionamiento de una NE como son la preparación, acondicionamiento y transferencia de la muestra, la medida de la muestra gaseosa y por último la adquisición, calibración y procesado de datos.

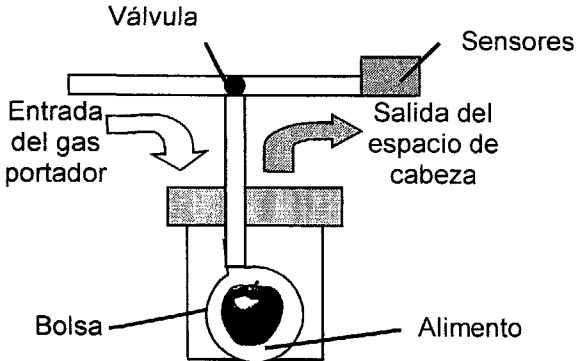
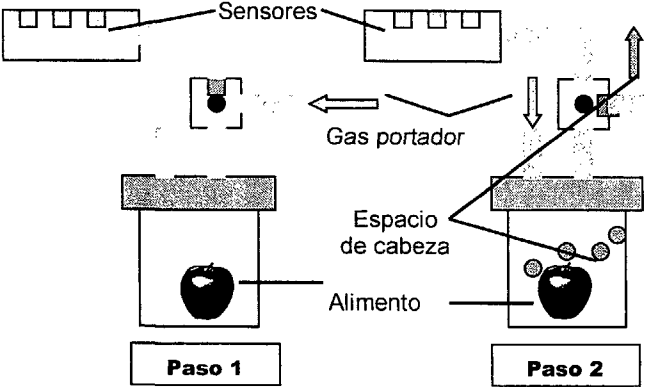
#### **4.5.1. Preparación, acondicionamiento y transferencia de la muestra**

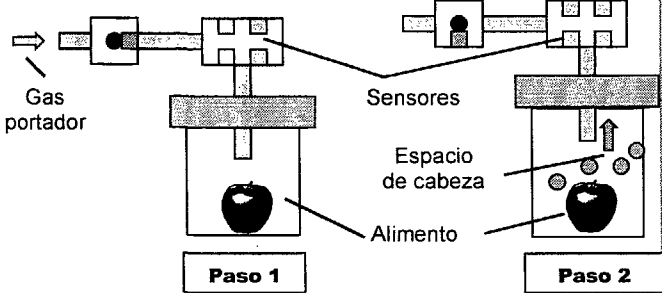
Los sensores de aromas sólo pueden manejar muestras en fase gaseosa por ello para extraer los volátiles que desprende un alimento se utiliza la técnica de "headspace" o espacio de cabeza. La transferencia es simple y eficiente cuando se usa una fase líquida pero en el caso de una fase gaseosa la transferencia es mucho más complicada, así todos los equipos comerciales de NE disponen (o deberían) de un sistema adecuado de manejo y transferencia del espacio de cabeza.

Según (Mielle and Marquis 1999) se pueden considerar dos sistemas básicos usados en NE para la extracción de los volátiles del alimento considerado que por separado o en combinación dan lugar a numerosas técnicas de extracción de volátiles, algunas de las cuales se describen en la Figura 4-7. La primera es lo que se conoce como "Espacio de cabeza estático" que consiste en confinar la muestra de alimento en el interior de un recipiente herméticamente cerrado donde también están situados los sensores durante un cierto tiempo, de forma que los volátiles desprendidos (o espacio de cabeza) por el alimento quedan retenidos en dicho recipiente constituyendo la muestra gaseosa de interés. La segunda y más frecuente resulta de combinar la técnica dinámica con la estática. La fase estática en una primera etapa permite un enriquecimiento de la muestra gaseosa, seguida de una fase dinámica que conduce el espacio de cabeza hasta los sensores proporcionando una uniformidad del flujo y por tanto de la respuesta de los sensores a lo largo de todo el experimento.

Cada técnica muestra distintas características en la eficiencia en la transferencia de la muestra gaseosa hasta los sensores, estimada como la relación entre la concentración que realmente llega a los sensores frente a la concentración real de la fase gaseosa, esta eficiencia depende fundamentalmente de la temperatura de generación del espacio de cabeza, del tiempo hasta el equilibrio y la presión, y la velocidad a la que se produce dicha transferencia.

<b>Técnica de generación del espacio de cabeza</b>	<b>Descripción de la Técnica</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Inconvenientes</b>
 <p><b>TOTALMENTE ESTATICO</b></p>	<p>Sensores colocados directamente en el recipiente y en contacto permanente con el espacio de cabeza.</p>	<p>↑↑ <b>eficiencia</b> de transferencia (100%, no hay dilución)</p>	<p>Largo tiempo de contacto entre efluente y sensores: ↓ <b>velocidad</b> de contacto</p> <p><b>Largo tiempo de recuperación</b> de la línea base de los sensores</p> <p><b>Contaminación</b> de los sensores: ↑ tiempo de contacto</p>
 <p><b>ESTATICO CON INYECCIÓN PARCIAL</b></p>	<p>Dos recipientes separados, del primero una vez alcanzado el equilibrio se extrae una proporción del espacio de cabeza mediante una jeringa, inyectándose seguidamente su contenido en el segundo recipiente donde están localizados los sensores.</p>	<p>Rápida inyección, ↑ <b>velocidad</b> de transferencia.</p> <p><b>Manejo automático:</b> ↓ <b>problemas de reproducibilidad</b> en tiempos y volúmenes de inyección</p>	<p>↓↓ <b>eficiencia</b> de muestreo (↑factor de dilución)</p> <p><b>Manejo manual:</b> ↑ <b>problemas de reproducibilidad</b> en tiempos y volúmenes de inyección</p>

Técnica de generación del espacio de cabeza	Descripción de la Técnica	Ventajas	Inconvenientes
 <p><b>ESTATICO-DINAMICO CON BOLSA DE MUESTREO</b></p>	<p>La muestra es introducida en el interior de una bolsa de plástico inerte, herméticamente cerrada, hasta alcanzar el equilibrio (fase estática), momento en el que el espacio de cabeza junto con el gas portador es conducido hasta la cámara de los sensores (fase dinámica).</p>	<p>↑ <b>eficiencia</b> (no hay dilución). Sistema automático</p>	<p><b>Velocidad de transferencia media</b> ↑ <b>coste</b>: bolsas desechables <b>Bolsas inertes?</b></p>
 <p><b>ESTATICO-DINAMICO CON TRANSFERENCIA DEL EFLUENTE</b></p>	<p>La muestra es introducida en el interior de un recipiente de vidrio donde un flujo de gas portador se encarga de eliminar el aire ambiente y llenar el recipiente con un gas de características controladas, la muestra se deja un cierto tiempo hasta alcanzar el equilibrio (fase estática), momento en el que el gas portador arrastra el espacio de cabeza hasta la cámara de los sensores (fase dinámica).</p>	<p>↓ <b>contaminación</b> de los sensores (sistema hermético y automatizado)</p>	<p>↓ <b>eficiencia</b>: elevada dilución con el gas portador</p>

<b>Técnica de generación del espacio de cabeza</b>	<b>Descripción de la Técnica</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Inconvenientes</b>
 <p><b>ESTATICO-DINAMICO BAJO PRESION</b></p>	<p>La muestra se introduce en un vial, sellado y presurizado con un gas inerte. El equilibrio entre la muestra y la fase gaseosa constituida por el gas portador se alcanza bajo presión (fase estática). Una vez alcanzado el equilibrio se abre la conexión entre el recipiente y la cámara de los sensores de forma que el espacio de cabeza sale rápidamente del recipiente hasta la cámara de los sensores empujado por la diferencia de presión (fase dinámica).</p>	<p>↑ <b>velocidad</b> de transferencia</p>	<p>↓ <b>concentración</b> de volátiles en el equilibrio en condiciones de sobrepresión</p> <p><b>Eficiencia moderada:</b> dilución del espacio de cabeza</p> <p><b>Problemas con muestras en polvo</b></p> <p><b>Flujo no constante:</b> velocidad ↓ con el tiempo</p>

• Figura 4-7: Comparación entre distintos métodos de generación y transferencia del espacio de cabeza típicamente utilizados en las NE. Cuadro modificado de (Mielle and Marquis 1999).

#### 4.5.2. Medida de la muestra gaseosa - sensores de gases

En una NE el componente principal es el sensor o detector. Hay amplias posibilidades de elección de sensores químicos para gases en el mercado en cuyo desarrollo están en la actualidad involucrados numerosas universidades y centros de investigación europeos y norteamericanos, muchos de los cuales serán citados a continuación.

Los sensores químicos de estado sólido se van a clasificar en función del principio de operación que utilicen (ver Tabla 4-16). Las propiedades más empleadas son conductividades, potenciales, capacidades, calentamientos, masas o constantes ópticas las cuales cambian al variar la concentración de las especies químicas que interaccionan con el sensor.

TIPO DE SENSOR	PRINCIPIO DE OPERACIÓN
Semiconductores de óxido de metal	$\Delta c \rightarrow \Delta \sigma \rightarrow \Delta I \rightarrow \Delta v$
Polímeros orgánicos conductores	
Transistor efecto campo de semiconductores de óxido de metal	$\Delta c \rightarrow \Delta \sigma \rightarrow \Delta \phi \rightarrow \Delta I \rightarrow \Delta v$
Amperométricos	$\Delta c \rightarrow \Delta \sigma \rightarrow \Delta \phi \rightarrow \Delta i \rightarrow \Delta v$
de Capacitancia	$\Delta c \rightarrow \Delta \epsilon \rightarrow \Delta C$
Calorimétricos	$\Delta c \rightarrow \Delta Q \rightarrow \Delta T \rightarrow \Delta I \rightarrow \Delta v$
Microbalanzas de cristal de cuarzo	
Onda acústica de superficie (SAW)	$\Delta c \rightarrow \Delta M \rightarrow \Delta f$
SAW sintonizables eléctricamente	
Ópticos de fibra óptica	$\Delta c \rightarrow \Delta n \rightarrow \Delta I \rightarrow \Delta I \rightarrow \Delta v$
Ópticos de colorimetría	$\Delta c \rightarrow \Delta \text{color} \rightarrow \Delta \text{patrón de color}$

• Tabla 4-16: Sensores de gases disponibles en el mercado y principio de operación de cada uno de ellos.  
 $\Delta$ : variación de; c: concentración;  $\sigma$ : conductividad; i: corriente; v: voltaje;  $\phi$ : función de trabajo;  $\epsilon$ : constante dieléctrica; C: capacitancia; T: temperatura; M: masa; f: frecuencia; n: índice de refracción; I: intensidad de la luz.

Un sensor químico es un mecanismo que convierte la interacción entre el material sensible y el compuesto químico en una señal eléctrica. Se pueden utilizar dos tipos de recubrimientos sensibles:

- ✓ INORGANICOS: tales como óxidos de metal ( $\text{SnO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$ , etc..). La ventaja de utilizar materiales inorgánicos es su estabilidad y pureza, aunque resultan también mucho más difíciles de modificar y por tanto de obtener recubrimientos con variedad de propiedades en cuanto a selectividad y sensibilidad, y
- ✓ ORGANICOS: la gran ventaja de los compuestos orgánicos es que pueden ser estructuralmente modificados usando distintos métodos de síntesis con lo que sus propiedades de sensibilidad pueden afinarse. Esto exige comprender a nivel molecular los

mecanismos de interacción entre el material sensible y el compuesto a detectar para introducir modificaciones racionales. El inconveniente fundamental es que en ocasiones la falta de estabilidad de los compuestos orgánicos crea problemas en la respuesta de los sensores.

De entre todos los sensores disponibles en el mercado, los más empleados hasta el momento en la fabricación de equipos comerciales de NE son los semiconductores de óxidos de metal, los polímeros conductores, las microbalanzas de cristal de cuarzo y los de onda acústica de superficie. Todos estos y algunos más se detallan a continuación.

➤ **Sensores de gases basados en las propiedades de conductividad de los materiales semiconductores.**

Los sensores semiconductores pueden detectar gases al producirse un cambio en su conductividad durante la interacción del material químicamente sensible con las moléculas de la fase gaseosa.

❖ **Sensores de óxido de metal (MOS).**

Actualmente se usan principalmente los sensores que usan semiconductores de óxidos de metal (MOS, Metal Oxide Semiconductors) como material sensible, lo que queda reflejado en la gran cantidad de centros que basan sus investigaciones en estos sensores y en la abundancia de publicaciones que existen al respecto:

<b>Centro de investigación</b>	<b>Publicaciones</b>
Universidad de Warwick y Universidad de Southampton (Reino Unido). Warwick – Southampton electronic nose group	(Llobet et al. 2001), (Udrea et al. 2001)
Universidad de Brescia (Italia) - Gas sensor laboratory	(Ferroni et al. 1998; Guidi et al. 1998; Pardo et al. 2001; Sberveglieri 1995; Sberveglieri et al. 1998; Sberveglieri et al. 1992; Sberveglieri et al. 1993; Sberveglieri et al. 1995)
Universidad de Lecce (Italia) - Istituto per lo studio di nuovi materiali per elettronica	(Capone et al. 2001)
Universidad de Barcelona (España) - Laboratorio de Sistemes d'Instrumentació i Comunicacions del Departament d'Electrònica	(Marco 2000), (Perera et al. 2001), (Marco et al. 1998)
Forschungszentrum Karlsruhe (Alemania)	(Goschnick 2001a; Goschnick 2001b)
Universitat Rovira i Virgili. Departament d'Enginyeria Electrònica, Eléctrica i Automática	(Brezmes et al. 2000; Brezmes et al. 2001; Brezmes et al. 1999)

**Centro de investigación**

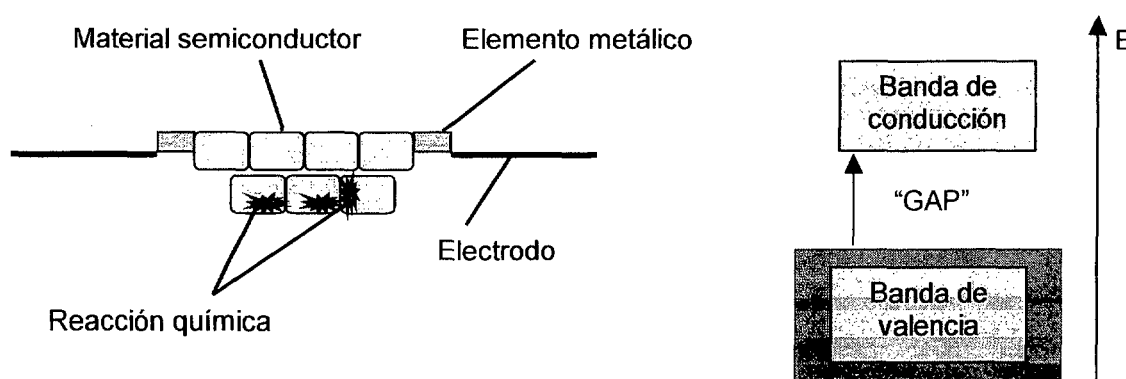
**Publicaciones**

Universidad Politécnica de Valencia -  
Instituto Valenciano de Investigaciones  
Agrarias

(Moltó et al. 1999),(Gutierrez et al. 2000)

• Tabla 4-17: Centros de investigación y publicaciones relacionadas con el desarrollo de sensores MOS

Los recubrimientos más empleados son el óxido de estaño ( $\text{SnO}_2$ ), óxido de wolframio ( $\text{WO}_3$ ) y óxido de zinc ( $\text{ZnO}$ ), de entre estos el más importante es el óxido de estaño que es el más usado por su buena estabilidad y alta sensibilidad a menores temperaturas de trabajo.



• Figura 4-8: Diagrama esquemático, explicativo del funcionamiento de un sensor de gas MOS (modificado de (Mielle 1996)).

El material semiconductor está localizado entre dos electrodos y es mantenido a una temperatura elevada típicamente de  $350^\circ\text{C}$ . La corriente eléctrica pasa entre los dos electrodos a través del óxido de metal, de forma que las interacciones entre la especie gaseosa y la superficie del semiconductor producen cambios en la resistencia eléctrica medida al otro lado del sensor. La conductividad eléctrica del sensor está afectada fundamentalmente por dos tipos de interacciones con la atmósfera gaseosa:

- ✓ adsorción directa de las moléculas volátiles sobre la superficie del sensor actuando éstas como "huecos" para los electrones de la banda de conducción favoreciendo el salto o "gap" de electrones desde la banda de valencia a la banda de conducción, y
- ✓ reacciones de superficie con las especies adsorbidas. El oxígeno es pre-adsorbido sobre la superficie del semiconductor atrapando electrones desde la banda de conducción. Como consecuencia de la oxidación catalítica de gases reductores con los iones de oxígeno, los electrones son inyectados dentro de la banda de conducción del semiconductor.

La consecuencia de ambos tipos de interacciones es la misma un aumento del número de electrones presentes en la banda de conducción, con lo cual aumenta la conductividad del semiconductor produciéndose un descenso de la resistencia eléctrica. Por tanto una menor resistencia eléctrica del sensor es indicativo de la presencia en el medio de un gas reductor.

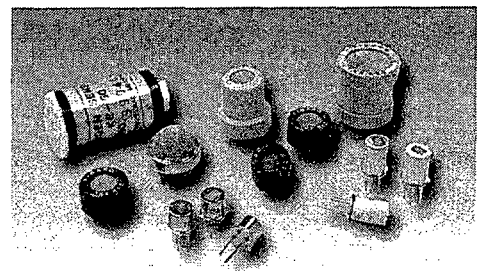


Las características de estos sensores les hacen especialmente interesantes para la monitorización de emisiones de gases y control en tiempo real. Por el contrario es necesario mejorar uno de sus principales inconvenientes que es la falta total de selectividad, para ello se pueden adoptar distintos tipos de estrategias (Sarig 2000):

- ✓ Lo más normal es dopar el óxido de metal con una pequeña cantidad de un metal noble como paladio, platino, plata y oro. Usando distintos materiales dopantes obtenemos sensores que responden preferentemente a determinadas clases de compuestos.
- ✓ Utilizando una matriz formada por sensores semiconductores idénticos, pero en el que cada uno trabaja a diferente temperatura, con lo que se altera la selectividad característica de cada sensor.

Los sensores semiconductores de óxido de metal pueden subdividirse en dos grupos (Sarig 2000):

- ✓ “THICK FILM”. Sensores que se caracterizan por presentar una capa sensible gruesa. Se construyen depositando el material sensible entre dos electrodos, usando normalmente técnicas litográficas estándar.



• Figura 4-9: Sensores MOS tipo thick film de la marca japonesa Figaro.

A pesar de los muchos inconvenientes que presentan y debido a la facilidad de fabricación muchos de los sensores MOS disponibles comercialmente están basados en tecnologías “thick film” como por ejemplo los sensores japoneses “Fígaro” (verFigura 4-9).

- ✓ “THIN FILM”. Sensores en los que la capa sensible es muy delgada. Se construyen depositando una capa muy delgada (300-500nm) de material sensible entre dos electrodos. Hay una amplia gama de métodos para conseguir el crecimiento o formación de estas capas finas como son la técnica de evaporación térmica, “sputtering”, o la nueva técnica de oxidación térmica y crecimiento reotaxial (RGTO). La delgada capa de recubrimiento le otorga sus principales ventajas aunque también se convierte en la principal fuente de inestabilidad.

#### ❖ Sensores de polímeros orgánicos conductores (CP).

Algunos de los problemas que presenta el uso de los sensores MOS “thin y thick film”, pueden ser solucionados mediante el uso de sensores polímeros conductores (CP, Conducting Polymers) y recubrimientos de lípidos biológicos, que permiten mayores posibilidades de elección de las condiciones de trabajo del sensor. Gracias a la investigación y desarrollo del que han sido objeto los

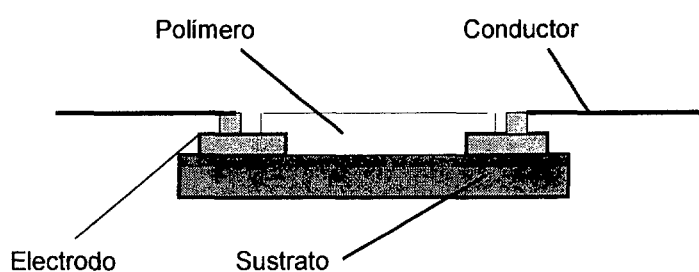
sensores CP (ver Tabla 4-18), muchos polímeros con diferentes grupos funcionales están disponibles en la actualidad, los principales son los polipirroles, los ácidos butano y decano sulfónicos, el ácido p-toluenesulfónico y su sal de tetra-etilamonio, polianilinas, monohidrogenosulfato de sodio, poli (3-metiltiofenes) y el tetrafluoroborato de tetraetilamonio.

Centro de investigación	Publicaciones
Universidad de Manchester – Department of Instrumentation and Analytical Science	(Persaud 2002)
Universidad de Antwerp (Bélgica)	(van de Velde et al. 2002)
Universidad de Valladolid (España)	(Guadarrama et al. 2000), (Álvarez-Benedí et al. 2000)
California Institute of Technology, USA	(Doleman and Lewis 2000; Matzger et al. 2000)

• Tabla 4-18: Centros de investigación y publicaciones relacionadas con el desarrollo de sensores CP

Los sensores CP son obtenidos por electropolimerización de una delgada capa del polímero al hacer pasar a su través corriente de un electrodo a otro.

Al adsorberse moléculas de la especie gaseosa sobre la superficie del polímero se produce un cambio en sus propiedades de conductividad, cambio que es detectado como una variación del voltaje de la corriente que llega al electrodo al otro lado del polímero (ver Figura 4-10).



• Figura 4-10: Diagrama esquemático de un sensor de gas CP (modificado de (Mielle 1996)).

### ➤ Sensores de gases de transistor efecto campo (FET)

El FET (Field Effect Transistor) es básicamente un mecanismo semiconductor el cual actúa como un amplificador con la misma función que un transistor aunque con diferente construcción. Una estructura de efecto campo es en principio una estructura semiconductor que está aislada de un metal donde el metal actúa como puerta para las moléculas de la especie gaseosa siendo la capa o medio conductor. La capa conductora puede además permitirse tener una conductividad bastante pequeña y sin embargo trabajar bien como material "puerta", con lo que la posibilidad de descubrir materiales "puerta" adecuados para cada situación es bastante grande.

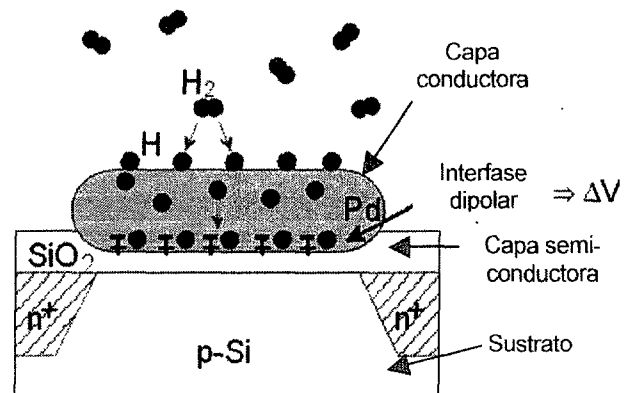
Actualmente los sensores FET están teniendo un interés creciente de ahí que numerosos centros de investigación muestren interés en este tipo de sensores (ver Tabla 4-19), debido a su posible aplicación en la fabricación de microsistemas, al poder usarse en la construcción de una gran matriz de sensores en un único chip.

Centro de investigación	Publicaciones
Universidad de Warwick (Reino Unido). Warwick –Southampton electronic nose group	(Hatfield, Covington, and Gardner 2000), (Covington et al. 2001), (Lu, Gardner, and Udrea 2001)
Universidad de Neuchâtel (Suiza) Sensors, actuators and microsystems laboratory	(Briand et al. 2001)
Universidad Politécnica de Valencia Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias	(Moltó et al. 1999),(Gutierrez et al. 2000)
Universidad de Linköping (Suecia) S-SENCE and division of applied physics	(Svenningstorp et al. 1999)

• Tabla 4-19: Centros de investigación y publicaciones relacionadas con el desarrollo de sensores FET y MOSFET

Se han probado diferentes aproximaciones a la configuración FET una de las más frecuentes es la que da origen a los sensores FET semiconductores de oxido de metal (MOSFET). Este tipo de sensores es bastantes común y se utilizan como sensores de  $O_2$  ,  $H_2O$ ,  $CO$  siendo especialmente importante el sensor desarrollado para la detección de  $H_2$  (Pd MOSFET), que utiliza como metal conductor el Paladio (Pd).

El principio de funcionamiento consiste en que el  $H_2$  es adsorbido sobre la superficie del Pd disociándose en sus dos átomos de hidrógeno, produciéndose la difusión de los átomos a través del metal, hasta alcanzar su cara interior. Por otro lado, en la parte superior del semiconductor hay una acumulación de cargas positivas que actúan como agujeros que atraen a las cargas negativas, de forma



• Figura 4-11: Diagrama esquemático de un sensor de gas MOSFET (modificado de(Franck 1999)).

que cuando los átomos de H llegan a la superficie interior del metal se produce su polarización, alcanzándose un equilibrio entre la capa dipolar y el H quimioadsorbido. (ver Figura 4-11) La capa dipolar causa un cambio brusco del potencial al atravesar la estructura del sensor que se traduce en una caída de voltaje. Luego ante la presencia del  $H_2$ , se observa una disminución en la conductividad del sensor (Franck 1999).

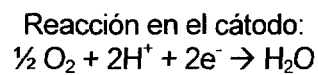
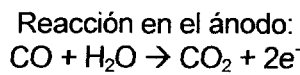
### ➤ Sensores de gases amperométricos

Es un sensor electroquímico que de forma más precisa recibe el nombre de “sensor de gases amperométrico de electrodo poroso”. Este tipo de sensores responden a gases que puedan ser reducidos u oxidados electrolíticamente sobre un catalizador metálico como platino u oro. Los gases

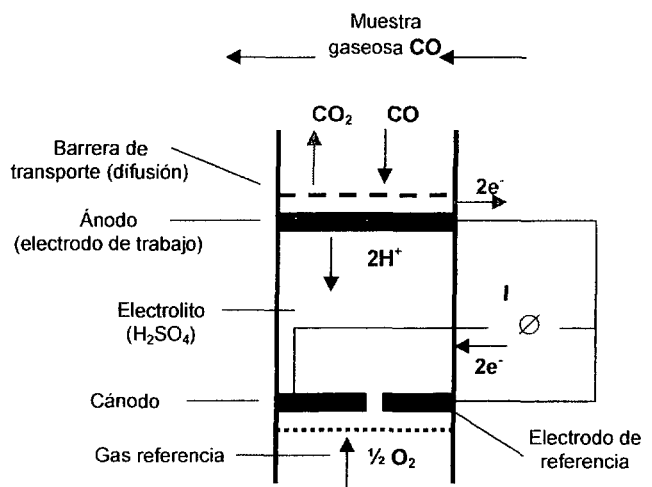
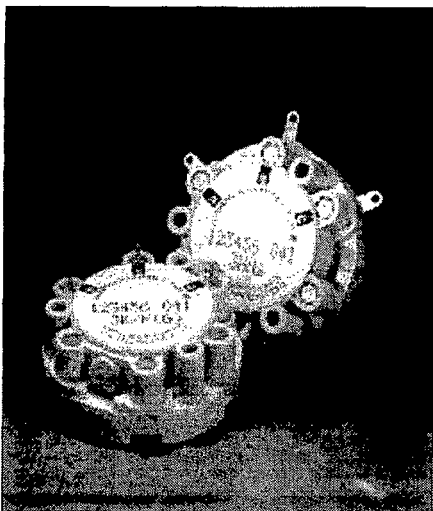
típicamente medidos son  $O_2$ ,  $CO$ ,  $NO_2$  y  $S_2H$ , así como algunos compuestos orgánicos como alcoholes, aldehídos o cetonas.

Su rango típico de sensibilidad está entre los 3-30 ppm, aunque algunos son capaces de detectar cantidades tan pequeñas como 2 ppb de algunos gases como ozono,  $NO_2$  y  $S_2H$ . Presentan una selectividad media que se puede modificar en función del material que se escoja en la construcción del electrodo, del potencial de trabajo del electrodo y de la sustancia que se use como electrolito (solución acuosa de  $H_2SO_4$ , de  $NaOH$ , etc...)

El principio de funcionamiento se basa en la oxidación o reducción del gas sobre un catalizador en la superficie de un electrodo que está en contacto con un electrolito según las siguientes reacciones (ver Figura 4-12):



El sensor se diseña de forma que la magnitud de la corriente generada por la reacción electroquímica del analito sea directamente proporcional a su concentración en la muestra gaseosa. A menudo la transferencia de masa a través de la membrana es el principal factor de control que limita la velocidad de salida de la corriente en este tipo de sensores, corriente que se mide a potencial constante. Luego bajo la presencia de un gas la cesión de electrones al circuito se traduce en un incremento de la intensidad de la corriente detectada.



• Figura 4-12: Imagen real y diagrama esquemático de un sensor de gas amperométrico (modificado de (Franck 1999).

Los sensores de gas amperométricos presentan un gran número de características favorables para su funcionamiento en matrices utilizándolos para el establecimiento de referencias. En la construcción de NE modulares una de sus principales ventajas es que no presentan sensibilidad cruzada al agua en una amplio rango de humedades relativas, por contra su principal inconveniente

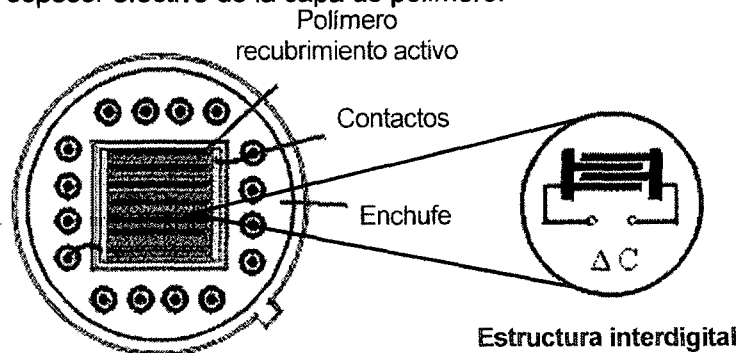
en la construcción de estos equipos es su tamaño y su elevada selectividad hacia un limitado número de gases simples.

➤ **Sensores de gases de capacitancia**

Estos sensores se basan en el cambio en la constante dieléctrica ( $\epsilon$ ) del polímero químicamente sensible cuando un analito se adsorbe sobre él.

Los cambios de capacitancia detectados se producen como consecuencia de: cambios en la constante dieléctrica de la fase gaseosa, cambios en la constante dieléctrica del polímero que actúa como recubrimiento sensible así como del espesor efectivo de la capa de polímero.

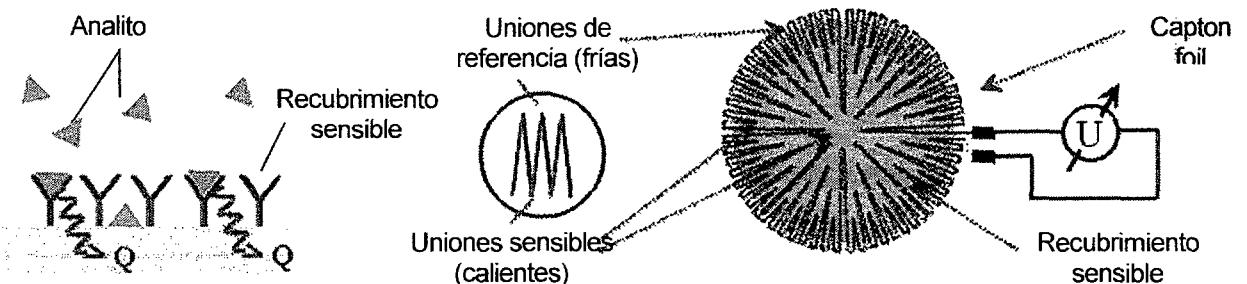
Cuando el recubrimiento es de tipo fino o "thin", la constante dieléctrica total depende de la relación entre las constantes dieléctricas del analito y del polímero. Una vez que el analito se adsorbe sobre el polímero el cambio en la constante dieléctrica provoca un incremento en la capacitancia del detector.



• Figura 4-13: Diagrama esquemático de un sensor de gas de capacitancia (modificado de (Strathmann and Weimar 2000; Strathmann and Weimar 2000))

➤ **Sensores de gases calorimétricos**

Estos sensores también llamados termopilas son capaces de transformar calor en voltaje. El principio de funcionamiento se basa en su construcción usando dos metales diferentes de cuya unión resulta un voltaje. Este voltaje de contacto depende en gran medida de la temperatura, para usar este efecto en la construcción del sensor un gran número de láminas de los dos metales se ponen en contacto dando lugar a numerosas uniones, estas uniones están separadas en dos grupos uniones sensibles o calientes y uniones no sensibles o frías



• Figura 4-14: Diagrama esquemático de un sensor de gas calorimétrico (modificado de(Strathmann and Weimar 2000)).

El recubrimiento sensible se deposita sólo en las uniones calientes. La adsorción del analito sobre el recubrimiento sensible da lugar a un calor de adsorción que origina un pulso de termo-voltaje entre las uniones internas y externas.

Los tres últimos sensores citados sensores de gases amperométricos, de capacitancia y calorimétricos, están menos difundidos en la construcción de NE y por ello también son menos conocidos sin embargo diversos centros de investigación se acercan a la mejora y desarrollo de este tipo de sensores como por ejemplo los que se citan a continuación:

<b>Centro de investigación</b>	<b>Publicaciones</b>
Universidad de Tübingen (Alemania) - Institute of physical and theoretical chemistry	(Franck 1999).(Strathmann and Weimar 2000).(Schweizer-Berberich, Vaihinger, and Göpel 1994)
ETH-Eidgenössische Technische Hochschule Zürich (Suiza) - Physical electronic laboratories	(Hagleitner et al. 2001)

• Tabla 4-20: Centros de investigación y publicaciones relacionadas con el desarrollo de sensores amperométricos, de capacitancia y calorimétricos.

### ➤ **Sensores de gases sensibles a masa**

#### ❖ **Microbalanzas de cristal de cuarzo (QCM).**

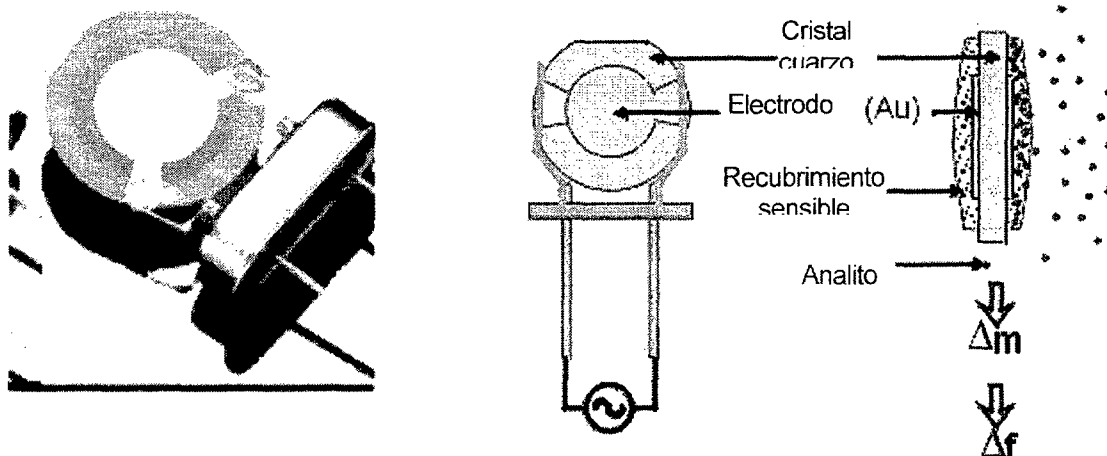
Los osciladores de cristal de cuarzo son mecanismos piezoeléctricos que son usados en circuitos electrónicos para distintos propósitos como en relojes cronómetros, puesto que pueden proporcionar una señal de cronómetro altamente exacta basada en su frecuencia de oscilación. La investigación (ver Tabla 4-21) sobre la aplicación de esta propiedad para fabricar sensores de gases ha permitido el desarrollo de los sensores QCM (Quartz Cristal Microbalance).

<b>Centro de investigación</b>	<b>Publicaciones</b>
Universita di Roma "TorVergata - Dipartimento di Ingegneria Elettronica Sensori e Microsistemi	(Di Natale 1999; Di Natale et al. 1997; Di Natale et al. 1999; Paolesse et al. 1999a)
Universidad de Bonn (Alemania) - Institute of agricultural engineering	(Rechenbach et al. 1999; Schramm et al. 1999)
Universidad Politécnica de Valencia - Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias	(Moltó et al. 1999),(Gutierrez et al. 2000)
Technical University of Munich (Suiza)	---

• Tabla 4-21: Centros de investigación y publicaciones relacionadas con el desarrollo de sensores QCM.

En los sensores QCM si una masa es adsorbida o se coloca sobre la superficie del cristal de cuarzo la frecuencia de oscilación (oscila el cristal entero) cambia en proporción a la cantidad de masa, de forma que midiendo el cambio en la frecuencia de oscilación se puede determinar la cantidad de masa. Estos mecanismos han sido usados como sensores de gases recubriendo el cristal con un material selectivo hacia la especie gaseosa de interés. La sensibilidad de este tipo de

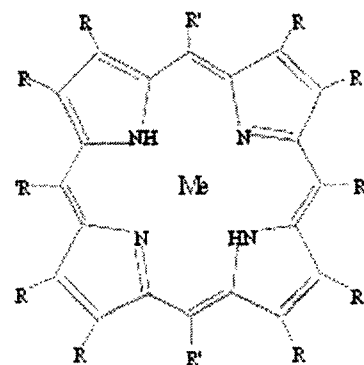
sensores está relacionada con la frecuencia de oscilación del cuarzo (típicamente entre 10-30MHz).



• Figura 4-15: Imagen real y diagrama esquemático de un sensor de gas QCM (modificado de(Franck 1999)).

Para transformar un cristal de cuarzo en un sensor químico es necesario recubrirlo con una capa de una materia capaz de capturar moléculas volátiles del ambiente, de forma que el material define las propiedades del sensor. De entre todos los materiales sensibles en los sensores QCM se prefieren los recubrimientos constituidos por porfirinas.

Las porfirinas se encuentran entre las clases más importantes de familias químicas seleccionadas por la naturaleza para la realización de algunas funciones biológicas muy importantes como son el transporte de oxígeno en la sangre y la fotosíntesis en las plantas. La molécula de porfirina es un sistema planar formado por cuatro anillos pirrólicos,



puentes de methine y dobles enlaces (ver Figura 4-16). La estructura básica puede ser modificada, formando un complejo con un metal que se sitúa en el centro del ciclo y/o en posiciones periféricas (metalo porfirinas), modificación que provoca una variación en las propiedades sensibles del recubrimiento, tanto en selectividad como en sensibilidad (Di Natale 1999).

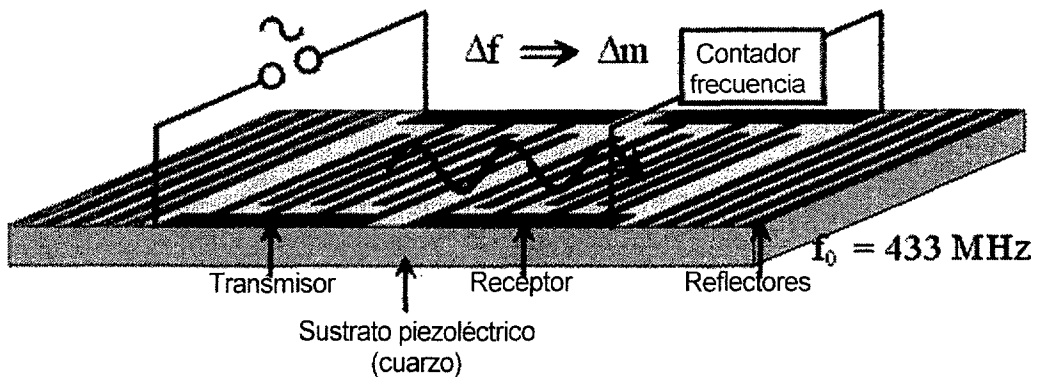
#### ❖ Sensores de onda acústica de superficie (SAW).

En la Universidad de Bordeaux (Rebière et al. 2001) entre otros centros de investigación se trabaja en el desarrollo de sensores SAW (Surface Acoustic Wave). El principio de funcionamiento de estos sensores y de las QCM es muy similar, excepto que en los primeros las oscilaciones de radiofrecuencia (ondas Rayleigh) son transmitidas por el campo eléctrico creado por los electrodos situados sobre la superficie del sólido y no dentro del cristal. Su frecuencia de vibración

característica está entre los 100 y 1000 MHz.

En estos sensores la conducción de las ondas de radiofrecuencia se modifica con la presencia de moléculas del gas adsorbidas sobre el sensor, de forma que se produce una variación de la frecuencia de oscilación, magnitud que se relaciona con la cantidad de material adsorbido sobre la superficie del recubrimiento.

El cristal (normalmente cuarzo o niobato de litio) está recubierto por dos pares de peines interdigitales, usualmente de aluminio que actúan como reflectores y emisores. Uno de los pares es usado como detector y el otro para establecer la referencia (Mielle 1996).



• Figura 4-17: Diagrama esquemático de un sensor de gas SAW (modificado de(Franck 1999))

#### ❖ Sensores SAW sintonizables electrónicamente.

En el instituto de "Radioengineering and Electronics of Russian Academy of Sciences", (Medved et al. 2002) han desarrollado un sensor de gases basado en la configuración de un sensor SAW típico pero que carece de recubrimiento o capa sensible, de forma que la diferencia en la selectividad de unos sensores a otros se consigue mediante la variación del voltaje eléctrico aplicado al sensor en la manera apropiada.

Su construcción básica consiste en un sustrato piezoeléctrico de  $\text{LiNbO}_3$  en cuya superficie se disponen dos pares de transductores interdigitales de aluminio para la emisión y detección de las ondas acústicas de superficie. Entre ambas estructuras interdigitales se dispone una guía de ondas acústicas de superficie también de aluminio que presenta en ambos extremos unos embudos concentradores de ondas, dos electrodos de aluminio para la aplicación del voltaje se colocan a ambos lados de la guía. La respuesta del sensor hacia un gas dado provoca un cambio en el desplazamiento mecánico de las ondas acústicas de superficie, propagándose en una dirección cristalográfica dada sobre el sustrato. En este caso el desplazamiento mecánico de la ondas depende de las variaciones debidas a la influencia del voltaje eléctrico aplicado.

Las ventajas fundamentales de este sensor se derivan fundamentalmente del hecho de no usar recubrimientos sensibles, principalmente se evita el desgaste de los sensores por agotamiento de los recubrimientos así como la falta de reproducibilidad en la fabricación por problemas en las



técnicas de deposición de los recubrimientos. Por otro lado es una tecnología nueva y en desarrollo cuyas posibilidades finales todavía están por determinar.

➤ **Sensores ópticos de gases.**

Son sensores que se basan en la detección óptica de la interacción química. Esta categoría de sensores comprende un amplio rango de tecnologías de forma que hay muchas aplicaciones de mecanismos ópticos de pequeña escala dentro del área de los sensores de gases debido a las distintas ventajas que presentan especialmente en lo que se refiere al uso de fibras ópticas y a la aplicación de nuevos recubrimientos sensibles, de ahí también que existan varios centros de investigación que se dedican a su estudio ( ver Tabla 4-22).

<b>Centro de investigación</b>	<b>Publicaciones</b>
Universidad de Illinois (USA) - School of chemical sciences	(Suslick and Rakow 2001)
Universidad de Tufts (USA)	---
Universidad de Tübingen	(Franck 1999),(Strathmann and Weimar 2000)

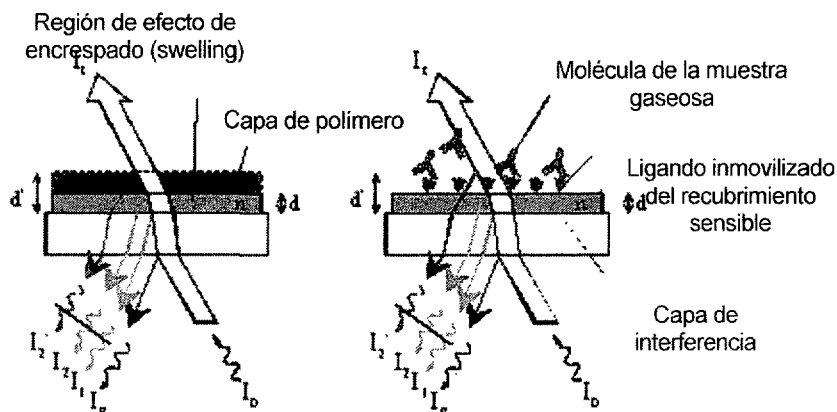
• Tabla 4-22: Centros de investigación y publicaciones relacionadas con el desarrollo de sensores ópticos de gases.

El principio de funcionamiento de algunas de estas técnicas se describirá a continuación.

❖ **Espectroscopia de interferencia reflectométrica**

Es una técnica que se basa en la medición de la variación del índice de refracción de un haz de luz al pasar a través de una capa o recubrimiento sensible sobre el que se han adsorbido las moléculas gaseosas de la muestra de interés (Strathmann and Weimar 2000).

El principio de funcionamiento se basa en la detección del tiempo de resolución de interferencia de la luz blanca incidente. El haz luminoso sufre reflexión según ángulos diferentes al atravesar los distintos materiales. Al atravesar la capa de polímero se refractan según un índice de refracción  $n$ . La intensidad de la luz refractada es detectada en función de su longitud de onda (matriz de diodos-espectrómetro). Al adsorberse las moléculas gaseosas de la muestra sobre el polímero sensible se produce un incremento en el grosor de la capa que debe atravesar el haz luminoso, produciéndose un cambio en el patrón de interferencia proporcional al cambio del espesor óptico, lo que permite detectar cambios muy pequeños que se produzcan en el polímero.

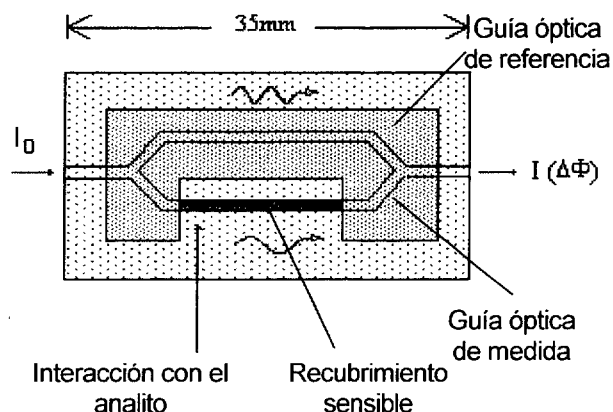


• Figura 4-18: Principio de funcionamiento de un sensor basado en espectroscopia de referencia reflectométrica

### ❖ Interferómetro óptico integrado

El principio de funcionamiento se basa en el hecho de que la propagación de la luz en la guía óptica está influenciado por el campo evanescente, por lo que se puede determinar el índice de refracción de la muestra gaseosa circundante (Strathmann and Weimar 2000).

Este sistema consta de dos guías ópticas una de referencia y otra de medida dispuestas en un único chip (ver Figura 4-19). En el camino de la guía óptica de medida se intercala una capa de un material polímero sensible sobre el que se adsorben las moléculas de la muestra gaseosa, lo que provoca un cambio del cladding de la capa que produce un cambio en las intensidad de la luz que llega al final del interferómetro.



• Figura 4-19: Diagrama esquemático de un interferómetro (modificado de (Strathmann and Weimar 2000)).

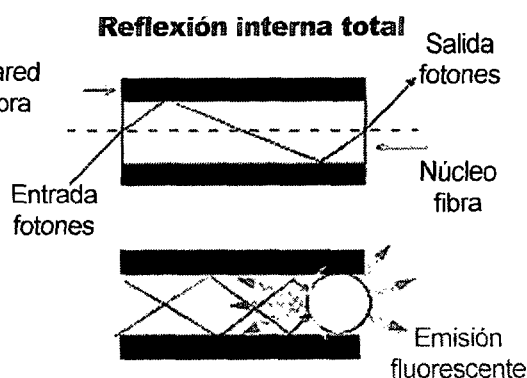
### ❖ Fluorescencia y fosforescencia

El uso de la propiedad de fluorescencia consiste en fotodepositar sobre uno de los extremos de una fibra óptica una mezcla de un material polímero fluorescente.

Sobre un mismo extremo de una guía se pueden delimitar hasta 30 regiones sobre las que se aplican distintos tipos de mezclas o recubrimientos. Un flash de luz es aplicado sobre el extremo no sensible de la guía óptica, produciéndose la excitación de los haces que la componen hasta llegar al otro extremo originándose una intensidad de fluorescencia, a la longitud de onda seleccionada, desde el elemento sensible (ver Figura 4-20). Diferentes combinaciones polímero / tinte fluorescente interaccionan de forma distinta con los gases de forma que bajo la exposición a una muestra dada

las diferentes regiones teñidas de la guía óptica o las diferentes fibras aportan una única información, midiendo el espectro de emisión de fluorescencia de cada una de las regiones que cambia al adsorberse moléculas volátiles sobre ellas.

Junto con el efecto de la luminiscencia fluorescente puede utilizarse, otro efecto óptico como la luminiscencia fosforescente que entre otras diferencias con la anterior se caracteriza porque la luminiscencia de las moléculas continua incluso después de que la radiación incidente pare. Este tipo de sensores tienen varias ventajas sobre los sensores fluorescentes, incluyendo un estado de excitación más largo y emisión en longitudes de onda más compatibles con la tecnología de control existente (Sarig 2000).



• Figura 4-20: Diagrama esquemático de un sensor óptico de fluorescencia. (tecnología sensores Ilumina ®).

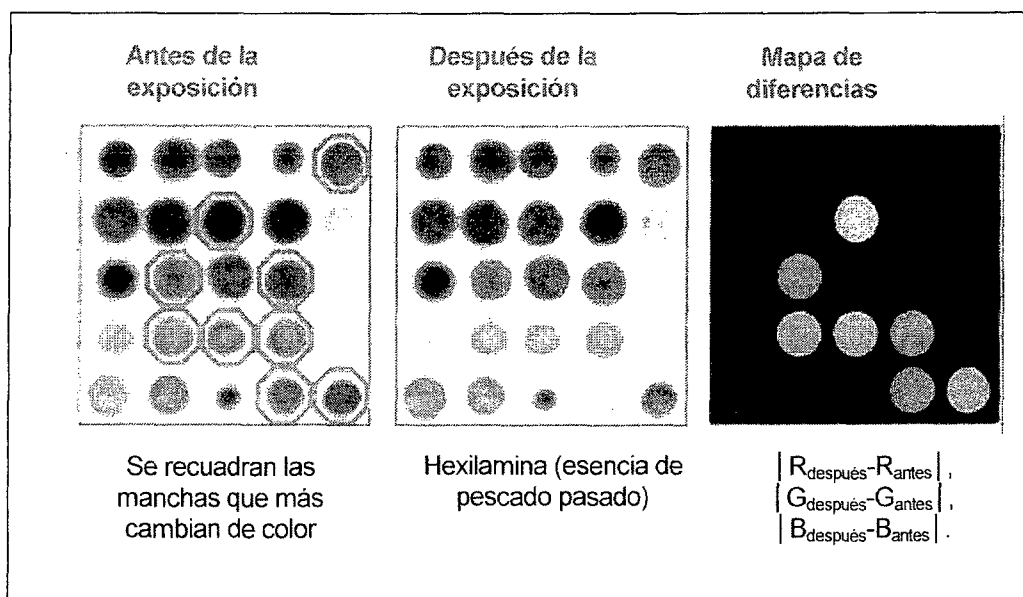
#### ❖ Colorimetría

La técnica se basa en la detección por colorimetría de un amplio rango de olores usando una matriz de recubrimientos sensibles a los gases del tipo metaloporfirinas en forma de distintas pegatinas de tinte inmovilizadas sobre el dorso de una placa de gel de sílice.

Estas matrices se construyen fundamentalmente usando librerías de tetra-fenil-porfirinas combinadas con distintos metales. Cuando una de estas matrices depositada sobre un soporte inerte es expuesta a distintos analitos se observan cambios en el color de los distintos complejos de porfirinas que a menudo son drásticos (Suslick and Rakow 2001).

Substrayendo simplemente la imagen digital RGB de la matriz antes de ser expuesta a la mezcla gaseosa de la imagen después de la exposición se puede obtener un patrón de cambio cuantitativo de color (ver Figura 4-21), patrón que recibe el nombre de oler-viendo del inglés "smell-seeing" que da nombre a un equipo comercial basado en esta tecnología. Estos patrones de cambio de color permiten una llamativa identificación visual de la muestra gaseosa. Las imágenes son tomadas por una cámara digital acoplada a la matriz miniaturizada de metaloporfirinas.

Esta técnica tiene una serie de ventajas, de entre ellas la más importantes es la no sensibilidad hacia el vapor de agua pero además presenta una muy buena sensibilidad hacia distintos compuestos, las matrices de sensores son desechables y su precio no es elevado y los patrones obtenidos a menudo son obvios.



• Figura 4-21: Perfil de cambio de color de una matriz de metaloporfirinas antes y después de la exposición a hexilamina y patrón o mapa de diferencias objeto de análisis final.

Sensor / Referencias	Ventajas	Inconvenientes
<p><b>MOS</b> (Sarig 2000), (Mielle 1996)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fácilmente disponibles (producción comercial)</li> <li>• Alta sensibilidad</li> <li>• Indicados para la construcción de matrices: alta disponibilidad de sensores con distintas sensibilidades</li> <li>• Construcción resistente: larga duración</li> <li>• Respuesta relativamente rápida: &lt;10 s</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Escasa selectividad.</li> <li>• Tamaño grande</li> <li>• Alto consumo de energía: trabajan a temperaturas ↑↑</li> <li>• Alta sensibilidad a etanol, CO<sub>2</sub> o la humedad</li> <li>• Recuperación lenta de la línea base.</li> <li>• Riesgo de envenenamiento del sensor por destrucción del material sensible ante ácidos, compuestos azufrados...</li> </ul>
<p><b>CP</b> (Sarig 2000), (Mielle 1996)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• mejor selectividad que los MOS y altas sensibilidades (0.1-100 ppm).</li> <li>• trabaja a temperaturas cercanas a la temperatura ambiente (20-60°C).</li> <li>• Tamaño muy pequeño.</li> <li>• Aptos para la construcción de matrices con un tamaño final muy pequeño (32 sensores en varios mm<sup>2</sup>).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• conductor muy pobre: dificulta la medida de la conductividad.</li> <li>• Térmicamente inestables: dificulta su uso a temperaturas a las que las interacciones gas-sólido se realicen rápida y reversiblemente, y tiempo de respuesta largo (20-40 s).</li> <li>• deriva de la señal ↑ con el tiempo o con cambios en la temperatura</li> <li>• Reproducibilidad ↓ entre lotes en la fabricación de un mismo sensor</li> <li>• Caros: construcción en laboratorio</li> </ul>
<p><b>FET - MOSFET</b> (Sarig 2000)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alta sensibilidad</li> <li>• Mecánica robusta</li> <li>• Tamaño pequeño</li> <li>• Bajo coste</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La reproducibilidad del sensor en cuanto a sus características eléctricas y su sensibilidad no son suficientes para usarlos en sistemas de medida real, ante mezclas complejas de gases.</li> </ul>

Sensor / Referencias	Ventajas	Inconvenientes
<b>Sensores de gases amperométricos</b>  (Strathmann and Weimar 2000)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alta estabilidad y fiabilidad</li> <li>• Elevada resistencia</li> <li>• Respuesta lineal versus concentración</li> <li>• Baja deriva</li> <li>• Alta sensibilidad</li> <li>• No sensibilidad cruzada con el agua</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tamaño grande y elevado coste</li> <li>• Elevada selectividad hacia un limitado número de gases simples</li> </ul>
<b>QCM</b>  (Sarig 2000), (Mielle 1996), (Di Natale 1999)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Extremadamente versátil: cualquier tipo de recubrimiento selectivo puede ser usado.</li> <li>• Pequeño tamaño (8 x 5 mm)</li> <li>• Aptos para la construcción de matrices.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Los recubrimientos son su principal inconveniente: técnicas de deposición no muy reproducibles a escala comercial.</li> <li>• La selectividad depende de diversos factores que pueden dificultar el control, como la temperatura y humedad.</li> </ul>
<b>SAW</b>  (Sarig 2000), (Mielle 1996)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Muy exactos.</li> <li>• Inmunes a temperaturas extremas.</li> <li>• Tiempo de respuesta pequeño.</li> <li>• No les afectan la mayoría de las interferencias eléctricas</li> <li>• Pueden utilizarse en instrumentos de tipo portátil.</li> <li>• Alta sensibilidad a cambios de masa sobre su superficie: amplio rango de análisis.</li> <li>• Funcionamiento eficiente del sensor a temperatura ambiente.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sensibilidad limitada por el ruido causado por la alta frecuencia de operación tanto del sensor como de los elementos electrónicos asociados.</li> <li>• Las elevadas frecuencias de trabajo, encarece la fabricación.</li> <li>• Falta de reproducibilidad en la fabricación de los sensores de un lote a otro.</li> <li>• Deriva en la respuesta con los cambios de temperatura.</li> </ul>

Sensor / Referencias	Ventajas	Inconvenientes
<b>Sensores ópticos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Desarrollo de técnicas, fibras y guías ópticas, que ha permitido la miniaturización de sensores para medidas in situ.</li> <li>• Aplicación de las propiedades de quimio y bioluminiscencia para el desarrollo de sensores ópticos.</li> <li>• Alta sensibilidad y especificidad de la espectrometría óptica particularmente de la fluorescencia.</li> <li>• desarrollo de sensores continuos y a distancia de gases gracias a la baja pérdida de transmisión de fibras y guías</li> <li>• Fibras ópticas con excelente aislamiento eléctrico, inmunidad a interferencias electromagnéticas y resistencia a medios hostiles y peligrosos.</li> <li>• Adaptación de los materiales de fibras ópticas a cada aplicación</li> <li>• Disponibles técnicas de deposición de mono y multi capas sobre la superficie de las guías.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Señales ópticas "parasitarias" debido a la dispersión de la luz en el medio o contaminadas por la absorción provocada por las suspensiones en el medio a analizar.</li> <li>• La interacción de la luz y los procesos químicos introduce limitaciones.</li> <li>• La naturaleza de la detección química introduce un tiempo de retraso en la respuesta debido a la transferencia de masa entre el sólido (capa sensible) y el compuesto a analizar.</li> </ul>

• Tabla 4-23: Comparación de ventajas e inconvenientes de algunos de los principales sensores que se utilizan en la construcción de NE

### **4.5.3. Medida de la muestra gaseosa – matrices de sensores**

Una matriz es un conjunto formado por varios sensores siendo la disposición usual de los sensores en una NE fundamentalmente por dos razones:

- ✓ se trata de imitar el sistema olfativo humano caracterizado por poseer una gran cantidad de neuronas receptoras olfativas que presentan una respuesta no específica y en la que distintos receptores reaccionan de forma diferente ante la misma muestra gaseosa,
- ✓ se trata de usar sistemas con una vida útil larga lo que fundamentalmente depende del binomio selectividad-reversibilidad característico de cada sensor. La selectividad es la capacidad del sensor a responder de forma preferente ante una sola especie en presencia de otras, los mecanismos sensitivos están basados en equilibrios termodinámicos, esto significa que para que un sensor sea reversible necesita que las interacciones sean débiles sin embargo para que exista alta selectividad o especificidad son necesarias fuertes interacciones. Por tanto un sensor no puede ser al mismo tiempo específico y reversible eligiéndose típicamente para la construcción de NE sensores reversibles con especificidad parcial (Di Natale 1999).

La falta de especificidad de los sensores dificulta la obtención de datos significativamente útiles para poder discriminar entre muestras olorosas lo que limita el uso de sensores aislados. Con cada sensor un punto adicional más es creado en el espacio vectorial, cuantos más puntos existan en ese espacio mas capaz será el sistema de análisis de datos de discriminar entre analitos, aunque hay un límite superior de falta de efectividad y de tediosos cálculos matemáticos que pueden consumir una gran cantidad de tiempo con cada nueva adición de un sensor a la matriz.

Según (Mielle 1996) el número de sensores que va a constituir la matriz depende del tipo de sensores elegidos y del análisis de datos que se vaya a desarrollar. Los sensores MOS son inherentemente poco selectivos y se usan en estos sistemas en conjuntos de 4 a 32 sensores, otros como los sensores QCM o SAW aunque presentan mejor selectividad se usan también en conjuntos para mejorarla. Hay dos construcciones típicas de matrices para NE (Griffin):

- a) varios sensores de idéntica construcción con medida del mismo parámetro. Esta construcción ha sido la más frecuente eligiéndose sensores idénticos en construcción pero con selectividades y sensibilidades ligeramente diferentes. Esas diferencias se consiguen usando recubrimientos sensibles distintos y/o sometiendo a cada sensor a unas condiciones de trabajo distintas ( $t^a$ , voltaje, etc...).



b) varios sensores de distinta construcción con principios de funcionamiento diferentes y por tanto con transductores que miden la variación de distintos parámetros físicos. Estas se llaman matrices híbridas y son cada vez más frecuentes y recomendadas en la construcción de NE, como por ejemplo el equipo desarrollado por Applied Sensor Technologies que presenta una matriz híbrida de 10 sensores MOSFET más 5 sensores MOS.

El principal problema que aparece con las matrices de sensores es que aunque incluso sea posible reemplazar sensores individuales, la variabilidad lote a lote en la construcción de sensores individuales provoca una variabilidad en su selectividad que obliga a recalibrar y reentrenar al sistema (Mielle 1996).

#### **4.5.4. Análisis de datos - Reconocimiento de patrones**

Una vez que los sensores de la NE han respondido ante un olor la señal de los sensores debe ser codificada y aplicado un método de reconocimiento de patrones para caracterizar el olor.

El proceso de codificación y reconocimiento de patrones en humanos no está actualmente comprendido del todo, sin embargo en NE hay varias aproximaciones posibles para el análisis de datos que se engloban dentro de lo que llamamos métodos quemométricos o quemometría que se define como “la disciplina química que usa las matemática, estadística y otros métodos para diseñar y seleccionar los procedimientos óptimos de medida y experimentos, así como para extraer la máxima información relevante del análisis de los datos químicos” (Tauler 2000).

Las NE contienen entre 4 y 32 sensores, cada uno de los cuales responde ligeramente diferente y no específicamente ante una molécula dada, por tanto los datos se obtienen a partir de muchos sensores donde cada uno de ellos depende de muchas variables y cuya respuesta no es lineal. Este tipo de datos recibe el nombre de multivariantes y uno de los principales problemas que plantean es que están representados en un espacio multidimensional cuya dimensión es igual al número de sensores utilizados en la NE que recibe el nombre de espacio sensorial . Una única medida es una entidad en este espacio y se representa como un vector n-dimensional, de forma que las operaciones de clasificación e identificación tienen que desarrollarse en este espacio (Di Natale 1999).

Un patrón está compuesto de los rasgos o características de un individuo, para la clasificación un patrón está representado por dos variables (x,y) donde x es el conjunto de características observadas (vector característico) e y es el concepto que se encuentra detrás de la observación (clase). La calidad de un vector característico está relacionada con su capacidad de discriminar muestras de diferentes clases, de forma que muestras de la misma clase deberían tener valores característicos similares y muestras de diferentes clases deberían tener valores característicos

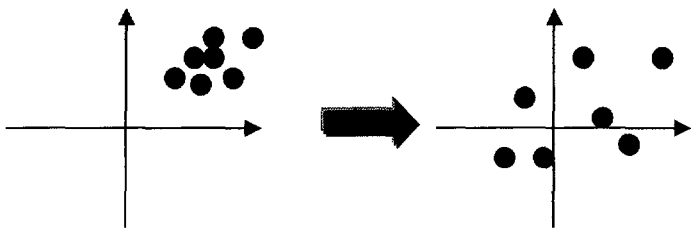
diferentes. El objetivo de una herramienta de clasificación es partir el espacio característico en regiones de decisión para cada clase (Gutierrez-Osuna 2000).

Un sistema típico de reconocimiento de patrones está formado por el sensor, un sistema de preprocesado, un sistema de extracción de las características de la muestra, un algoritmo de clasificación o descripción y un conjunto de muestras (de entrenamiento) ya clasificadas o descritas, donde los tres últimos pasos pueden realizarse según métodos lineales o no lineales de clasificación (Gutierrez-Osuna 2000).

### ➤ **Preprocesado de datos**

Para que los datos obtenidos puedan ser comparados es fundamental convertirlos ya que pueden proceder de sensores que tengan diferentes rangos o de sensores que tengan diferentes unidades de medida.

Muchos de los algoritmos de reconocimiento de patrones se desarrollan mejor al trabajar con datos que cubren rangos similares, por lo que generalmente es muy útil escalar los datos originales a una



media y rango común, se puede así escalar la matriz de datos a una media de cero y una desviación típica de uno (Lacey and Osborn 1998). Por otro lado las NE presentan en general problemas importantes de deriva cuyo efecto hay que tratar de compensar, por lo que se proponen modelos de corrección previa antes de realizar ningún tipo de análisis realizándose distintos tipos de calibraciones (Holmberg 2000).

### ➤ **Métodos lineales de clasificación**

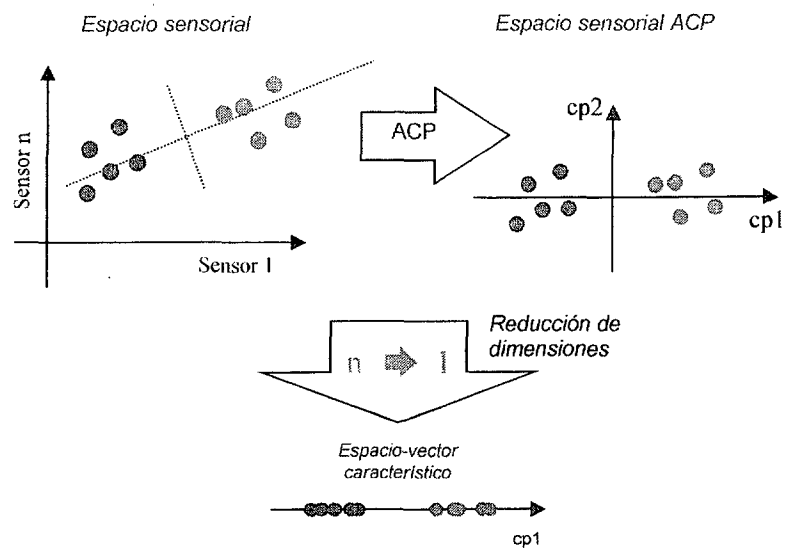
Uno de los métodos lineales de análisis de datos más usado y descrito en la bibliografía sobre NE es el análisis de componentes principales (ACP).

Algebraicamente, el ACP consiste en la creación de una base de vectores en un espacio dado o universo inicial compuesto por las variables instrumentales (sensores) que se introducen en el análisis. Los vectores (o "Componentes Principales" (CP)) que constituyan la base vectorial son ortogonales entre sí y por tanto independientes. Estos son hallados mediante el establecimiento de combinaciones lineales entre las variables de partida de tal manera que la forma en que se agrupan dichas variables en torno a los nuevos ejes del espacio, definirán la coincidencia en la información proporcionada por las mismas, por tanto el propósito de este método es describir el conjunto de datos dado en un espacio cuya dimensionalidad es menor que el número de sensores, eliminando la información redundante que pueda existir entre variables similares. Cada CP tiene asociado un

autovalor que se relaciona con la proporción de varianza explicada que posean. Los CP que mayor varianza explicada posean son extraídos antes del espacio vectorial. Teóricamente, en un diseño experimental en el que se hubieran tenido en cuenta todas las fuentes de variación posibles la suma de la varianza explicada por todos los CP debería ser 100% (Tauler 2000), (Gutierrez-Osuna 2000).

Una forma rápida de observar los resultados de un ACP es utilizando las gráficas de los círculos de correlación. Estas representaciones son proyecciones ortogonales del nuevo espacio vectorial definido por la base calculada en las que se dibujan las variables introducidas en el ACP (proyección de las variables) sobre un plano definido por una pareja de CP.

En este nuevo espacio definido por los CP se recalculan las medidas obtenidas con cada variable, representándose en él y obteniéndose un gráfico llamado "Proyección de los individuos" que permite observar las agrupaciones de los individuos correspondientes a los distintos factores considerados, como se separan



entre sí y como se correlacionan con las variables de origen en función de su peso en la construcción de cada uno de los CP considerados (Di Natale 1999).

La principal limitación del ACP es que no considera la separabilidad de clases puesto que no tiene en cuenta la clase a la que pertenece el vector característico, es decir, el ACP simplemente lleva a cabo una rotación coordinada que alinea los ejes transformados con las direcciones de máxima varianza de forma que no hay garantía de que la dirección de máxima varianza contenga la característica adecuada para la discriminación. El otro problema que se plantea con el ACP es que está basado en transformaciones lineales mientras que los datos de los sensores tienen una forma no lineal (Di Natale 1999).

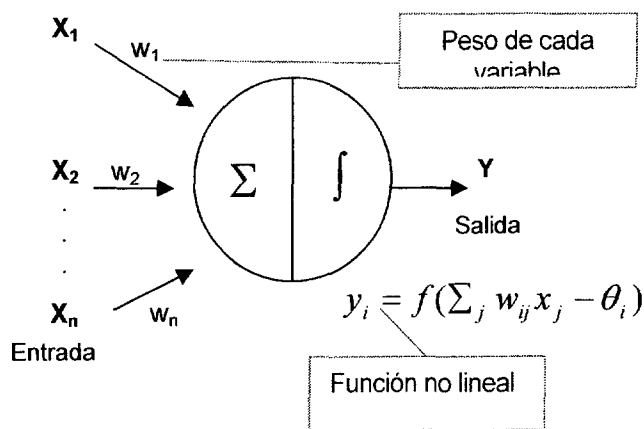
### ➤ Métodos no lineales - redes neuronales artificiales

Para intentar superar las limitaciones que plantean los modelos lineales, se han desarrollado nuevos métodos de análisis no lineales como las redes neuronales artificiales.

La comprensión del funcionamiento del bulbo olfatorio y el cerebro ha llevado a la creación de las redes neuronales artificiales (ANN) del inglés "Artificial Neural Networks". Todas las técnicas de ANN están construidas bajo el modelo simple de una neurona que acepta una entrada de datos (ver

Figura 4-22) y genera una señal de salida basada en la función de transferencia de la neurona. La naturaleza de esta transformación a lo largo de la neurona según una función de transferencia define el modelo neuronal. Diferentes aplicaciones pueden utilizar diferentes modelos neuronales. Redes complejas se construyen conectando neuronas entre sí, bien en serie o bien en paralelo. La arquitectura de la red esta determinada por el modelo neuronal, la conexión entre neuronas y el método de entrenamiento usado para ajustar los parámetros de la red adecuadamente con los datos de entrenamiento(Lacey and Osborn 1998).

Se puede definir una ANN desde un punto de vista externo como un mecanismo de regresión especialmente indicado para espacios multidimensionales no lineales, y desde un punto de vista interno como un conjunto de unidades de procesado simples con un alto grado de conexión que permite el intercambio de señales de excitación e inhibición (Marco 2000).



• Figura 4-22: Esquema explicativo del principio de funcionamiento de una red neuronal.

Uno de los modelos neuronales más importantes es el Mapa de Auto-Organización (SOM), del inglés "Self Organizing Map", está dentro de la categoría de métodos de aprendizaje competitivo y se basa en un aprendizaje no supervisado. Este último aspecto significa que el algoritmo SOM no requiere ninguna información adicional a parte de las señales de entrada procedentes de los sensores, así por ejemplo SOM puede descubrir los grupos escondidos en un conjunto de datos sin conocer previamente la clase a la que pertenece, esta propiedad convierte a este modelo en una herramienta muy útil para investigar y comprender las propiedades de clasificación de sistemas multidimensionales como los que caracterizan a los generados por las NE (Di Natale 1999).

#### 4.5.5. Fuentes de error en una nariz electrónica

En general las fuentes de error incluyen una falta de sensibilidad a los olores de interés, interferencias de las moléculas no olorosas, inespecificidad, efecto de la temperatura y humedad, falta linealidad en la respuesta de los sensores y errores en el sistema de muestreo.

➤ **Falta de sensibilidad**

La sensibilidad del olfato humano se establece generalmente mediante la determinación del umbral de olor, estas determinaciones demuestran que los umbrales de detección típicos están entre 1000 ppm y menos de 1 ppt.

En el caso de las NE aunque el umbral absoluto de detección debería ser muy bajo ya que sólo se requieren unas pocas moléculas para reaccionar con los recubrimientos sensibles, en la práctica esa sensibilidad está próxima a las ppm o algunas decenas de ppm. Existiendo tres razones principales para este descenso de la sensibilidad esperada (Mielle and Marquis 1999):

- ✓ el nivel de ruido y la deriva a corto plazo para todos los tipos de sensores puede ser muy alta, disminuyendo drásticamente la relación señal vs ruido,
- ✓ la eficiencia del método de muestreo usado para generar el efluente y transferirlo hasta los sensores, y
- ✓ el sistema de transferencia del efluente y el control de parámetros tales como la elección y control de la velocidad de flujo del efluente, inadecuado control de la temperatura de las líneas de transferencia del efluente de la cámara de medida de los sensores etc...

➤ **Respuesta a las moléculas no olorosas**

Las NE responden fuertemente a algunas moléculas como el etanol o el glicol de propileno mientras que para los humanos el etanol es inodoro y el glicol de etileno sólo se detecta ligeramente. Sin embargo la mayoría de los olores de interés son una mezcla compleja de moléculas volátiles, entre las cuales se pueden encontrar el etanol en el caso de vino, o el etileno en el caso de fruta (Lacey and Osborn 1998).

➤ **Efecto de la temperatura y humedad**

La variación de la temperatura durante la realización de los ensayos causa tres tipos de errores (Lacey and Osborn 1998):

- ✓ En el proceso de obtención de la muestra gaseosa el control de la temperatura es necesario ya que al variar la temperatura de generación del espacio de cabeza varía la presión de vapor para cada una de los compuestos de la mezcla, por lo que la concentración que alcanzarán en la fase gaseosa una vez alcanzado el equilibrio cambiará, lo que se traduce en una variación en la respuesta de los sensores.
- ✓ En el proceso de medida de la muestra gaseosa en la cámara de los sensores es necesario controlar la temperatura de medida ya que esta afecta al coeficiente de partición entre la fase gaseosa y la fase adsorbida sobre el sensor y por tanto a la respuesta del sensor.

- ✓ En la construcción de muchos sensores usados en NE se usan mecanismos resistivos cuya resistencia es función no sólo de las moléculas adsorbidas sino también de la temperatura. Variaciones en la temperatura de trabajo de los sensores pueden producir variaciones en sus propiedades de sensibilidad y selectividad y por tanto deben tenerse en cuenta.

Por otro lado la humedad relativa del medio bajo muestreo puede introducir dos fuentes de variación sobre las medidas (Lacey and Osborn 1998):

- ✓ La mayoría de los sensores son sensibles a la humedad ambiental lo que significa que variaciones en la humedad relativa, provocan variaciones en la señal registrada por los sensores.
- ✓ El vapor de agua puede desplazar a otras moléculas de interés al ocupar los puntos reactivos de los recubrimientos sensibles.

#### ➤ Falta de linealidad en la respuesta de los sensores

Los sensores de gases se caracterizan por presentar una respuesta no lineal ante la muestra gaseosa. A este comportamiento no escapan los sensores QCM, así (Bodenhöfer et al. 1997) y (Paollesse et al. 1999b) explican el cambio de frecuencia de oscilación en cada sensor debido a la interacción entre las moléculas presentes en la fase gaseosa y su capa sensible como la suma de dos contribuciones independientes debido a la adsorción de estas moléculas en posiciones diferentes. Existe una primera adsorción sobre sitios preferentes (específicos) y una vez ocupados, se inicia la adsorción sobre posiciones no preferentes (inespecíficos) (Bodenhöfer et al. 1997):

$$\Delta f_{sum} = \Delta f_{espec} + \Delta f_{noespec}$$

• Ecuación 4-6: Explicación de la variación de la frecuencia de oscilación de los sensores QCM como suma de dos efectos

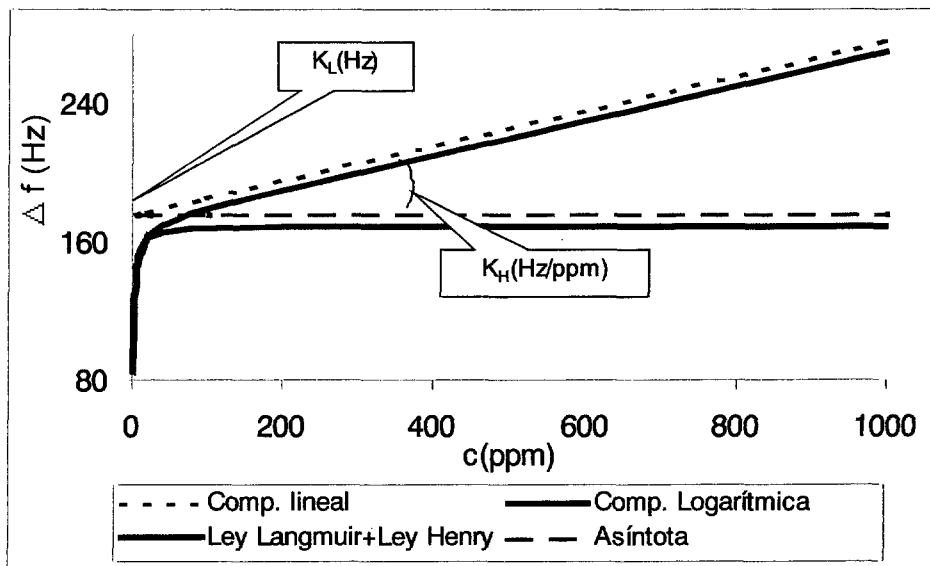
Bodenhöfer y cols., 1997, establecen que la curva analítica de respuesta de cada sensor frente a distintas concentraciones de un analito (ver Figura 4-23), puede ser definida asumiendo una combinación de los dos tipos de interacciones descritas en la ley de Langmuir o de interacciones específicas (componente logarítmica de la curva) y la ley de Henry o de interacciones no específicas (componente lineal de la curva):

$$\Delta f_{sum} (Hz) = K_L (Hz) \cdot \frac{k(ppm^{-1}) \cdot c(ppm)}{1 + k(ppm^{-1}) \cdot c(ppm)} + K_H (Hz / ppm) \cdot c(ppm)$$

• Ecuación 4-7: Curva analítica de respuesta de un sensor QCM

$K_L$  es la constante que se corresponde con la señal del sensor cuando todas las posiciones específicas están saturadas, es decir, cuando se produce la saturación de la curva descrita por la ley

de Langmuir.  $K_H$ , constante que se corresponde con la pendiente de la parte lineal a altas concentraciones.  $k$  es la relación de las constantes cinéticas de los procesos de adsorción y desorción del analito en los puntos de reconocimiento del sensor.  $c$  es la concentración del analito.



• Figura 4-23: Curva teórica de respuesta de los sensores tipo QCM. Se presentan las dos componentes de la curva; la componente de Langmuir (logarítmica) y la componente de Henry (lineal)

### ➤ Protocolo de muestreo

Las muestras de alimentos se encuentran en fase condensada en forma de sólidos, líquidos o en polvo, por tanto los compuestos volátiles que van a constituir la muestra gaseosa deben ser extraídos de la matriz inicial. La eficiencia de la extracción es generalmente muy baja y depende de numerosos factores algunos de los cuales se han tratado en puntos anteriores (Mielle and Marquis 1999):

- ✓ parámetros externos como la temperatura, tiempo hasta el equilibrio, volumen, presión, y
- ✓ parámetros internos tales como la naturaleza del sustrato, interacciones entre los distintos compuestos del aroma o entre estos y la matriz, oxidación de la muestra, etc...

Todo esto supone que el espacio de cabeza obtenido ya sea desde un punto de vista cuantitativo o cualitativo puede representar pobremente al producto original.

Por otro lado se presentan dos problemas complementarios por un lado los volátiles de mayor volatilidad están sobre representados en oposición a los de baja volatilidad y por otro la mayor parte de los compuestos presentes en el espacio de cabeza tienen generalmente una baja contribución a la apreciación hedónica mientras que ciertos compuestos que aparecen sólo como trazas tienen una contribución muy elevada, como es el caso por ejemplo del aroma a corcho presente en algunos vinos. Esto explicaría porqué las correlaciones entre los análisis sensoriales e instrumentales son muy difíciles de obtener (Mielle and Marquis 1999).

Los problemas descritos no son específicos de las NE, afectando por igual a los métodos de análisis separativos como la CG o CG/EM.

#### 4.5.6. Ventajas e inconvenientes del uso de una nariz electrónica

Se ha visto que la caracterización de la calidad aromática como método para valorar la calidad es de gran interés para la industria de la alimentación, por tanto la evaluación objetiva y en tiempo real de la intensidad de olor de los compuestos volátiles que son responsables del aroma de las muestras de alimentos es muy interesante y actualmente potencialmente posible por el uso de los sensores de aromas. Esta nueva tecnología es una herramienta en potencia capaz de detectar en línea derivas o defectos en un proceso o en un producto, aunque en la mayoría de los casos no podría detectar la naturaleza u origen de ese defecto, a pesar de ello permitiría detener la producción automáticamente cuando un proceso derivara demasiado con respecto a un estándar predefinido (Mielle 1996), (Bartlett, Elliot, and Gardner 1997).

Es importante recordar que estos sistemas no son sustitutos sino complementarios de los métodos sensoriales o de análisis por separación (CG o EM) tradicionales que son reconocidos por todos los laboratorios. Los sensores de aromas son rápidos pero tienen precisión sólo en un rango medio, sin embargo hacen posible recurrir a los métodos tradicionales sólo en el caso en el que un defecto necesite ser examinado más profundamente, las ventajas e inconvenientes principales de estos equipos se indican a continuación (ver Tabla 4-24) (Mielle 1996):

<b>VENTAJAS</b>	<b>INCONVENIENTES</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Método de análisis global del aroma</li> <li>• Rápida respuesta de los sensores ante la muestra gaseosa (1-5 min versus los hasta 45 min de una cromatografía de gases).</li> <li>• Disponibilidad de equipos comerciales portátiles.</li> <li>• Respuesta objetiva.</li> <li>• Posibilidad de instalación en líneas de producción, para medidas en continuo.</li> <li>• Amplio rango de precios en los equipos disponibles, algunos de ellos relativamente baratos (la mitad del precio de un CG) y en general ninguno de ellos supera el precio de un CG/EM.</li> <li>• Método no destructivo</li> <li>• Procedimiento de muestreo poco complejo</li> <li>• Permite muestrear volátiles peligrosos para la salud (toxinas, esporas, gases tóxicos, etc...).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Baja sensibilidad en relación con la nariz humana</li> <li>• Deriva de la señal con el tiempo de trabajo y las variaciones de la temperatura</li> <li>• Falta de reproducibilidad en la fabricación de los recubrimientos de los sensores</li> <li>• Elevada influencia en la respuesta del sensor de temperatura y humedad relativa</li> <li>• Sistema de obtención del espacio de cabeza en general poco eficiente que introduce muchas fuentes de variación</li> <li>• Sensibilidad de los sensores hacia moléculas no olorosas.</li> <li>• Largo tiempo de obtención de la muestra gaseosa (≈ 40 min)</li> </ul>

• Tabla 4-24: Ventajas e inconvenientes de las narices electrónicas.



#### **4.5.7. Modelos comerciales y prototipos de narices electrónicas**

En la última década, se ha producido un rápido desarrollo comercial y tecnológico de las tecnologías de los “sentidos electrónicos” o “e-senses”. El primer sentido en ser instrumentalizado fue el oído de forma que han aparecido una serie de mecanismos que podríamos llamar “orejas electrónicas” que han sido desarrollados para aplicaciones industriales como por ejemplo la detección de termitas. El sentido con más desarrollo industriales es el del tacto, en el cual se basan muchas aplicaciones para ordenadores como los “joy-sticks”, las pantallas táctiles, etc... que generan varios millones de dólares al año de beneficios. Los “ojos electrónicos” están teniendo en la actualidad un amplio desarrollo para aplicaciones biométricas como por ejemplo tecnologías de reconocimiento del iris del ojo para asegurar la seguridad de las transacciones bancarias.

Las narices electrónicas y más recientemente la lengua electrónica son ya una realidad industrial existiendo en la actualidad más de 20 compañías que comercializan este tipo de productos. Desde 1986 se han solicitado más de 250 patentes para proteger las innovaciones en sensores y sistemas específicos y la Unión Europea ha realizado grandes esfuerzos en I+D con la aportación de fondos (Galdikas et al. 2001). En el Anejo II se incluye una referencia de cada uno de los equipos comerciales que podemos encontrar en el mercado.

El desarrollo industrial de las narices electrónicas ha sido de hecho el comienzo o spin-off de nuevas compañías muchas de ellas asociadas a laboratorios de investigación y universidades. Por otro lado muchas de estas empresas presentan algunas particularidades comunes, por un lado son compañías con un elevado capital y coste de sus acciones a pesar de presentar un bajo nivel de negocio ya que las ventas son relativamente pequeñas ascendiendo a aproximadamente 15 millones de dólares con un coste de la unidad entre 25.000\$ y 100.000\$ (datos de 1999) , por otro los costes en I+D están siendo financiados en gran parte con fondos públicos y por último la reciente fusión entre compañías (por ejemplo la nueva empresa Applied Sensor Technologies surge de la fusión de la sueca Nordic Sensor Technologies y la alemana Motech) por razones de mercado.

A pesar del esfuerzo realizado en I+D las tecnologías desarrolladas en el campo de las narices electrónicas tienen en la actualidad su aplicación principal en el laboratorio no realmente en plantas o factorías para el control de la calidad o monitorización de procesos.

El explosivo desarrollo de la tecnología de las NE, también ha alcanzado a los centros de investigación españoles. Algunos de los prototipos que actualmente se están desarrollando para diversas aplicaciones en España se presentan a continuación.

### ➤ **Universitat de Barcelona (Cataluña)**

En Cataluña, concretamente en la Universitat de Barcelona, el equipo de trabajo dirigido por el profesor Santiago Marco en el laboratorio de Sistemes d'Instrumentació i Comunicacions del Departament d'Electrònica, en colaboración con la Wright State University (Ohio, USA), ha desarrollado un equipo que recibe el nombre de "IpNose", que es una NE diseñada fundamentalmente como sistema de monitorización remota de los malos olores en campo (Perera et al. 2001).

Este equipo ha sido diseñado dentro del concepto "Smart Nose", con el doble significado que el vocablo inglés "Smart" presenta, es decir una NE pequeña y por tanto portátil a la vez que inteligente y su diseño busca alcanzar dos objetivos principales, primero proveer al instrumento de una plataforma potente de procesado de la señal y segundo incrementar las posibilidades de la NE implementando la conexión remota por red al analizador.

El actual diseño del sistema incorpora una plataforma versátil para poder ser controlado o reprogramado por control remoto. Una vez se establece la conexión las ordenes pueden ser enviadas al instrumento para ejecutar un muestreo o entrenamiento, tomar los valores de la señal de los sensores, controlar la bomba y las válvulas o incluso reprogramar el instrumento. Estas características permiten monitorizar las lecturas correspondientes a los análisis realizados, extraer o modificar la base de datos interna o incluso cambiar el programa de procesado de la señal de la matriz de sensores desde la misma estación de trabajo u ordenador. Aunque el sistema completo opera de forma remota a través del sistema TCP/IP bajo la estructura cliente/servidor, puede enviar señales activas a través de sistemas externos como mensajes electrónicos al usuario cuando las muestras se están tomando fuera de las especificaciones indicadas por él.

El instrumento puede controlar tres módulos de sensores cada uno formado por una matriz de cuatro sensores MOS comerciales, un sensor de temperatura, y la una tarjeta de circuito electrónico impreso con toda la electrónica necesaria para el acondicionamiento / excitación de la señal. Los sensores y su cámara de acero inoxidable se montan directamente sobre la placa.

El sistema de inyección del flujo consiste en un manifold multicanal con una electroválvula por cada puerto de entrada. Un programa controla el orden y el tiempo de apertura de cada válvula y el funcionamiento de la bomba. El instrumento está provisto de un ordenador "embebido" que es el corazón del sistema. Un módulo PC/104 de adquisición de datos es utilizado para adquirir las señales de los sensores y generar la señal de salida transformada. El uso del sistema operativo abierto LINUX aporta al equipo las posibilidades clásicas del sistema UNIX tales como realización simultánea de multitareas, librerías compartidas, red de trabajo TCP/IP o incluso multi usuarios. Los parámetros de configuración del instrumento se almacenan en archivos de texto internos. Esta

configuración en carpetas permite al usuario definir varios parámetros, incluyendo el número y duración de los ciclos, velocidades de muestreo, etc...

➤ **Universitat Rovira i Virgili de Tarragona (Cataluña)**

El Departament d'Enginyeria Electrònica, Eléctrica i Automàtica de la Universitat Rovira i Virgili de Tarragona, está desarrollando un prototipo de NE especialmente dirigido a la determinación del estado de madurez de la fruta (Brezmes et al. 1999), (Brezmes et al. 2000), (Brezmes et al. 2001).

La NE esta basada en una matriz de sensores químicos y un adecuado sistema de reconocimiento de patrones. Esta aproximación general se implementa en diferentes módulos en función de la aplicación que vaya a tener cada uno de ellos.

El módulo de espacio de cabeza controla el flujo de aire del circuito durante el proceso de medida. Dentro de él se distinguen dos cámaras, una bomba de aire, tubos y varias electro válvulas. La cámara de concentración es donde se localiza la muestra, tiene un volumen de 5 litros y su principal propósito es acumular los compuestos aromáticos emitidos por la fruta durante la fase de concentración. El número de frutos depende de su tamaño, pero una media de 8 frutos pueden ser medidos simultáneamente. La otra cámara es en la que están dispuestos los sensores de gases.

El módulo de la matriz de sensores, es aquel que está formado por la cámara de sensores y toda la electrónica necesaria para poner en funcionamiento a los sensores. La matriz está formada por un número variable de sensores MOS, un sensor de humedad y un sensor de temperatura. La electrónica que se necesita es muy sencilla y sirve para calentar los elementos sensibles de los sensores y para transformar los cambios de conductividad en cambios de voltaje.

El módulo del ordenador está formado por un PC incluido en el sistema del instrumento, controla el proceso de medida y procesa los datos originales para transformarla en información útil para el usuario usando algoritmos de reconocimiento de patrones. Con la ayuda de una tarjeta de adquisición de datos comercial con canales de entrada/salida analógico digital, un programa del ordenador controla el proceso de medida. Las electroválvulas se controlan mediante señales de salida binarias generadas por el programa para redirigir el flujo del aire durante las diferentes fases de cada medida. Cuando se completa la realización de una medida los datos obtenidos se almacenan en el disco duro como un archivo de texto para su uso posterior. Un paquete de programas matemáticos es entonces usado para extraer los aspectos relevantes de cada archivo y probar distintos métodos de reconocimientos de patrones según el objetivo particular de cada estudio.

### ➤ **IVA (Valencia)**

En Valencia, el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias en colaboración con la Universidad Politécnica de Valencia ha desarrollado un prototipo de NE constituido por un “sensor de aromas” y un sistema de transferencia del espacio de cabeza adaptados a las características y naturaleza de los volátiles procedentes del aceite de oliva, lo que ha permitido establecer un procedimiento de medida adecuado para detectar atributos sensoriales negativos presentes en el mismo (Gutierrez et al. 2000).

El “sensor de aromas” está formado por ocho sensores de gas sensibles en mayor o menor medida a los volátiles desprendidos por el aceite de oliva. El sistema de transferencia diseñado provoca el arrastre de los componentes volátiles de aceite de oliva, favoreciendo el proceso el burbujeo de la muestra, por difusión natural hacia el sensor de aromas distribuyéndose de forma homogénea y uniforme a través del mismo.

El procedimiento de medida diseñado se compone de tres etapas: una etapa de estabilización mediante flujo de nitrógeno a través del sensor de aromas con duración de 30 s, una etapa de reacción con duración de 3 min y una etapa de recuperación y limpieza de la cámara de sensores mediante nitrógeno con duración de 1 min.

Los ensayos de verificación del equipo así diseñado permitieron demostrar que esta NE es una herramienta válida para detectar y evaluar dos atributos negativos (rancidez y avinado) del aceite de oliva. Además su adaptación a la naturaleza de los volátiles del aceite de oliva permite asegurar que es capaz de detectar otros atributos sensoriales tanto positivos como negativos

### ➤ **Universidad de Valladolid (Castilla y León)**

El 1 de julio 2002 comenzaron formalmente en Castilla y León y La Rioja los trabajos de investigación de un proyecto europeo para conseguir en el plazo de dos años un catador por ordenador que con una nariz, unos ojos y una lengua electrónicos distinguirá todo tipo de vinos en un equipo que recibirá el nombre de "Panel integrado para la caracterización organoléptica de vinos". El proyecto con participantes de España, Portugal, Francia e Italia cuenta con un presupuesto cercano al millón de euros la mitad procedente de una ayuda de la Unión Europea y el resto aportado por los integrantes del proyecto. La ayuda está destinada a desarrollar entre el 1 de julio de 2002 y la misma fecha de 2004 un programa europeo CRAFT destinado a iniciativas innovadoras de pequeñas y medianas empresas.

La investigación será coordinada por la Universidad de Valladolid bajo la supervisión del director del Departamento de Física de la Materia Condensada José Antonio de Saja, con amplia experiencia en el campo del desarrollo de sensores y aplicaciones para la detección de compuestos volátiles (Guadarrama et al. 2000), (Gutierrez, Rodríguez-Méndez, and de Saja 2001), (Álvarez-

Benedí et al. 2000), en colaboración con las estaciones enológicas de Castilla y León y La Rioja, dos bodegas riojanas (Viña Ijalba y Finca Allende), otras dos francesas (Earl Sainte-Marie Monnot y Dejean) y dos más portuguesas (Adega de Mogofores y Montez-Champalimaud). Además en el proyecto participa también la empresa italiana Tecnicapompe Zanin.

El panel pretende "hacer objetivo" el trabajo del catador pero "no sustituir" a este profesional y sus promotores esperan que se convierta en patente industrial en 2004.

#### ➤ **Universidad de Extremadura (UEX)**

El proyecto "JAMOTRÓN" es un proyecto de I+D presentado a la convocatoria de Proyectos de I+D de 2001 cofinanciada con Fondos FEDER, por la UEX y cuyo investigador principal es el Dr. Francisco Javier López Aligué Catedrático de Electrónica de la UEX.

El objetivo del trabajo es desarrollar un sistema electrónico que ayude a la determinación de la calidad del Jamón Ibérico y que posteriormente permita actuar sobre el proceso de curación. El trabajo se está realizando en colaboración con los siguientes grupos de investigación, además de la empresa JAPASUR y FUNDECYT:

- ✓ Grupo de Tecnología de los Alimentos (Facultad de Veterinaria - UEX).
- ✓ Instituto de Física Aplicada (CSIC - Madrid).
- ✓ Grupo de Sensores (Universidad Politécnica de Cataluña).
- ✓ Centro Nacional de Microelectrónica (CNM - CSIC - Barcelona).

En el proyecto se trabaja en desarrollar un conjunto de sensores olfativos (nariz electrónica) particulares para el caso de Jamón Ibérico. Los datos ofrecidos por estos sensores (en torno a 16 sensores) serán clasificados por un sistema de clasificación basado en redes neuronales; el cual será entrenado usando los resultados ofrecidos por un experto, así como con la ayuda de análisis de volátiles. Actualmente se están poniendo a punto los sensores y se espera comenzar a tomar medidas próximamente.

#### **4.5.8. Aplicaciones de las narices electrónicas**

Las narices electrónicas tienen un amplio rango de aplicaciones potenciales en la industria de la alimentación y muchas más pueden surgir en el futuro, un resumen de estas se presentan en la siguiente tabla (Mielle 1996):

<b>INDUSTRIA DE LA ALIMENTACION</b>	<b>OTRAS APLICACIONES</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Valoración de la calidad en productos no procesados y manufacturados</li><li>• Monitorización de los procesos de cocinado</li><li>• Monitorización de los procesos de fermentación</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Control de los sistemas de aire acondicionado</li><li>• Industria del automóvil</li><li>• Detección de volátiles contaminantes y</li></ul>

<b>INDUSTRIA DE LA ALIMENTACION</b>	<b>OTRAS APLICACIONES</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Monitorización de procesos de mezclado, macerado etc...</li><li>• Control de los productos almacenados</li><li>• Evaluación del envejecimiento y maduración de vinos, quesos, productos cárnicos etc...</li><li>• Monitorización de las interacciones producto-envase</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• monitorización de la calidad del aire medioambiental</li><li>• Control de aparatos de cocina en el hogar</li><li>• Industria cosmética</li><li>• Industria del tabaco</li><li>• Diagnósticos médicos e industria farmacéutica</li></ul>

#### 4.5.8.1. **Industria hortofrutícola**

Gelperin et al. usando una NE comercial (Neotronics) basada en una matriz de 12 sensores CP conseguían diferenciar entre muestras con una producción aromática muy similar, como distintas variedades de manzana (McIntosh, Rome, Braeburn, Red Delicious y Fuji) o de naranja (Valencia, Florida). Lo más significativo del sistema es que las muestras gaseosas se obtenían a partir de fruta entera de la cual se "olfateaba" su espacio de cabeza durante sólo un segundo.

La determinación de la fecha óptima de recolección es de extrema importancia en relación con la preservación de la calidad de la fruta durante el almacenaje. En general frutos recolectados demasiado temprano no maduran suficientemente después del almacenamiento pudiendo sufrir además desórdenes fisiológicos, mientras que la fruta recolectada demasiado tarde se ablandará antes y durará menos tiempo en condiciones óptimas durante el almacenamiento. Saevels, di Natale, and Nicolai 2002 han construido un modelo de calibración para representar la madurez fisiológica de la fruta en tiempo (semanas) antes de la recolección comercial a partir de los datos obtenidos del análisis de la producción aromática de dos variedades de manzana Jonagold y Braeburn semana a semana durante 9 antes de la recolección comercial, con la NE "Libra Nose". Esta NE puede ser usada para medir los cambios en madurez durante el periodo preclimático puesto que las señales de los sensores se correlacionan muy bien con los índices tradicionales de madurez y el índice de almidón. Brezmes et al. 2001 utilizaron un prototipo de NE basado en una matriz de sensores MOS para determinar con éxito la fecha óptima de recolección en melocotones y nectarinas. Young et al. 1999 midieron los cambios en el aroma de manzanas Royal Gala cosechadas en cuatro fechas distintas correspondientes a la recolección comercial (dos tempranas, una media y una última tardía). Usando una NE Fox 4000 de la casa Alpha Mos pudieron diferenciar entre las distintas fechas de recolección.

Son múltiples las citas bibliográficas que describen el uso con éxito de NE para monitorizar la evolución del estado de madurez de la fruta a lo largo de la vida en estantería. Hines, Llobet, and Gardner 1999 fueron capaces de detectar distintos grados de madurez en un lote de manzanas Golden Delicious mantenidas en vida en estantería a lo largo de 21 días. El prototipo de sensor de

gases formado por una matriz de 4 sensores MOS comerciales de la marca Figaro permitió diferenciar entre manzanas verdes (ensayadas los dos primeros días), manzanas con madurez media (ensayadas entre los días 3 y 9) y manzanas totalmente maduras (ensayadas entre los días 10 y 21). Mismo resultado obtuvieron estos investigadores (Llobet et al. 1999) usando una NE similar con plátanos. Diferenciaron así de nuevo tres estados de madurez a lo largo de un periodo de 29 días de vida en estantería, fruta verde durante los primeros 8 días de maduración, madurez media entre los 9 y 15 días y madurez total que se correspondía con la fruta ensayada durante los 14 días restantes. Brezmes et al. 2000 usando un prototipo de NE basado en 8 sensores MOS logran diferenciar en muestras de melocotones y peras madurando durante 15 y 26 días respectivamente, los mismos tres estados de madurez, verde, maduro y sobremaduro.

Saevels et al. 2002 dan en este sentido un paso hacia adelante ya que utilizando el equipo "Libra Nose" para evaluar la calidad de manzanas Jona Gold después del almacenamiento, observaron que al analizar las manzanas almacenadas durante 8 meses bajo tres diferentes atmósferas ultra bajo oxígeno, atmósfera controlada normal y frío normal y mantenidas una vez acabado el almacenamiento en condiciones de vida en estantería durante 1, 5, 8, 12 y 15 días, los datos mostraban que las diferencias detectadas en los lotes correspondientes al almacenamiento en distintas atmósferas no eran significativas, sin embargo la NE podía determinar el tiempo de vida en estantería que había sufrido la fruta con un error inferior a 3 días.

Durante el almacenamiento se pueden desarrollar distintos tipos de daños y patologías, que provocan una alteración de la producción aromática de los productos, siendo por tanto esta una potencial aplicación de la NE. Así una NE comercial de Neotronics la e-nose 4000, fue utilizada para detectar la existencia de daños por frío en tomates antes de que los síntomas externos de este desorden aparecieran. Maul et al. 1999 consiguieron diferenciar entre cuatro tratamientos a los que fue sometida la variedad Solimar de tomate partiendo de tomates verdes maduros y verdes inmaduros almacenados durante 7 días a 5°C y 20°C, sabiendo que el tratamiento a 5 °C era inductor de la aparición de daños por frío. Di Natale et al. 1997 utilizaron una NE "Libra Nose" para analizar pulpa de tomate con el objetivo de estimar el límite de resolución detectable de ácido acético en pulpa de tomate, ya que el ácido acético es uno de los compuestos más importantes producido por la pulpa de tomate durante el proceso de spoilage. Normalmente la presencia de este compuesto se comprueba usando un panel de catadores que degustan pulpa de tomate a la que se le va añadiendo distintas cantidades de acético, mostrando éstos un límite de resolución de 90 ppm, mientras que los sensores de gases evaluando las mismas muestras presentan una resolución entre 50 y 100 ppm, lo que es comparable con la resolución del gusto humano y por tanto hace a este equipo potencialmente útil en este tipo de determinaciones.

<b>Referencia</b>	<b>Equipo</b>	<b>Aplicación</b>
(Gelperin et al. )	NE de Neotronics (12 CP)	Diferenciación entre distintas variedades de manzana
<b>Fecha de recolección</b>		
(Saevels, di Natale, and Nicolai 2002)	Libra Nose (8 QCM)	Construcción de un modelo de calibración para representar la madurez fisiológica de manzanas en semanas desde la recolección
(Brezmes et al. 2001)	Prototipo sensores MOS	Determinación de la fecha óptima de recolección en melocotones y nectarinas
(Young et al. 1999)	FOX 4000 – Alpha MOS	Diferenciación entre lotes de manzana recolectadas en 4 fechas distintas
<b>Vida en estantería</b>		
(Hines, Lobet, and Gardner 1999), (Llobet et al. 1999), (Brezmes et al. 2000)	Prototipo sensores MOS	Diferenciación en manzanas (21 días), plátanos (29 días), melocotones (15 días) y peras (26 días), a lo largo de la vida en estantería, de tres estados de madurez: verdes, madurez media y totalmente maduro.
(Saevels et al. 2002)	Libra Nose (8 QCM)	Determinación del tiempo de vida en estantería, al que habían estado sometidos frutos de manzana, con un error inferior a tres días.
<b>Tipo de almacenamiento</b>		
(Saevels et al. 2002)	Libra Nose (8 QCM)	Diferencias no significativas en lotes de manzana correspondientes al almacenamiento en distintas atmósferas
<b>Daños y patologías</b>		
(Maul et al. 1999)	e-nose 4000 (Neotronics)	Detección de daños por frío en tomates anterior a la aparición de los síntomas externos
(Di Natale et al. 1997)	Libra Nose (8 QCM)	Detección con un límite de resolución entre 50-100 ppm (similar al del panel de catadores) de ácido acético en pulpa de tomate.

• Tabla 4-25: Resumen de aplicaciones de NE en la industria hortofrutícola. Los equipos comerciales señalados están descritos en detalle en el Anejo V.



#### 4.5.8.2. **Otras industrias alimentarias**

##### ➤ **Bebidas.**

Uno de los campos más interesantes para aplicar un sensor de gases ha sido la industria del vino. La idea de poder utilizar un equipo que permita un análisis global, rápido y objetivo del aroma del vino, una de sus principales parámetros de calidad es especialmente atractiva en este mundo. Sin embargo esta gran potencialidad de las NE se ha visto truncada en numerosas ocasiones por la grave interferencia que en las señales de los sensores provoca el vapor de agua y sobre todo el etanol. De forma que muchos de los ensayos realizados con NE para tratar de diferenciar entre, por ejemplo, vinos de distintas denominaciones de origen se ha visto que en la mayoría de los casos la diferenciación estaba fuertemente correlacionada con la distinta graduación alcohólica de los caldos estudiados. Esta interferencia ha sido descrita por Guadarrama et al. 2000 al tratar de identificar tres vinos procedentes de tres denominaciones de origen diferentes (Rioja, Ribera del Duero y Albariño) con un prototipo de NE de fabricación propia formado por una matriz de seis sensores tipo CP.

Di Natale et al. 1997 utilizando equipo "Libra Nose" fueron capaces de monitorizar la evolución aromática de un vino tinto italiano (tipo Cabernet Sauvignon) tras 1.5, 3, 4.5, y 24 horas de abrir la botella. Este mismo grupo de investigadores aporta una de las aproximaciones más innovadoras para tratar de aplicar con mayor eficacia la NE al estudio de los vinos Di Natale et al. 2000 al proponer el uso combinado de una NE y una "lengua electrónica". La NE utilizada es un modelo "Libra Nose" con una matriz de 8 sensores QCM y la "lengua electrónica" es un prototipo constituido por 6 electrodos y un electrodo convencional de pH. Tanto los sensores de la NE como los de la "lengua electrónica" presentan distintos recubrimientos sensibles todos ellos basados en metaloporfirinas. La utilización conjunta de ambos equipos ha permitido mediante el análisis de datos construir un modelo conjunto basado en 5 de sus variables que permiten predecir con un error medio inferior al 5% parámetros tales como el pH, la acidez total, contenido en SO<sub>2</sub>, ácido tartárico, contenido total en polifenoles, antocianos, Ca, K y Mg del vino.

Di Natale et al. 1999 también desarrollaron una NE óptica basada en el principio de variación de la absorbancia espectral, donde los elementos sensibles son metaloporfirinas, y que aplicaron con éxito en la diferenciación entre distintas bebidas espirituales como coñac y digestivos.

##### ➤ **Otros alimentos**

Di Natale et al. 1997 mostraron distintas aplicaciones del instrumento "Libra Nose" en la industria de la alimentación. Con las medidas obtenidas de los sensores y un adecuado sistema de análisis de datos se pudieron clasificar filetes de bacalao por un lado y de carne de ternera por otro, en función de los días de almacenamiento en frigorífico a 5°C.

Otro de los campos en los que el uso de las NE sería potencialmente muy útil es el del pescado puesto que su degradación conduce a la aparición de olores característicos y penetrantes, se han realizado por ello múltiples experimentos en este sentido, un ejemplo de ello se ha indicado en el párrafo anterior, otro es el ofrecido por el grupo de investigación de Schweizer-Berberich, Vaihinger, and Göpel 1994 que utilizaron un prototipo basado en una matriz formada por ocho sensores amperométricos de gases (optimizados para CO, H<sub>2</sub>S, SO<sub>2</sub> y NO) y pudieron correlacionar los cambios en el olor del pescado con la duración del almacenamiento.

Dentro de éste área de detección de la degradación del alimento a lo largo del periodo de almacenamiento, Galdikas et al. 2001 van un paso más allá al intentar detectar la presencia de bacterias en la carne usando una NE. Una matriz de diez sensores MOS era capaz de diferenciar entre los volátiles emitidos por carne de pollo sana e infectada varias horas antes del test con bacterias *Pseudomonas* y *Listeria monocytogenes*.

Otro de los alimentos en los que la evaluación aromática es un índice de calidad es el aceite de oliva, que ha sido objeto de numerosas investigaciones. Así Gutierrez, Rodríguez-Méndez, and de Saja 2001 han desarrollado un prototipo de NE formado por una matriz de 5 sensores que permite la diferenciación entre cuatro tipos de aceite con características organolépticas muy diferentes (aceite de oliva, de oliva virgen extra, lampante y refinado). El prototipo diseñado y descrito por el IVIA y citado en el apartado 4.5.7 tenía también como aplicación principal la determinación de la calidad del aceite de oliva a través del análisis de la emisión aromática.

#### 4.5.8.3. Diagnósticos médicos

Paulsson 2000 está desarrollando un prototipo de instrumento para la detección del alcohol en el aliento basado en el concepto de una NE. El elemento principal del equipo es una matriz de 10 a 14 sensores de gases integrados en un sistema de flujo de gas y un ordenador para el control y adquisición de datos. El prototipo fue usado para cuantificar la cantidad de etanol presente en el aliento de individuos que habían consumido bebidas que contenían distintos grados alcohólicos y en cantidades diferentes.

El sudor producido por los humanos tiene un olor característico que depende de un equilibrio entre las emisiones procedentes de las glándulas sudoríparas de la piel, controladas hormonalmente, y las procedentes de poblaciones de bacterias que viven en la superficie de la piel. Di Natale et al. 1999 han iniciado investigaciones en este campo, utilizando un prototipo de NE "Libra Nose". Para ello analizaron el sudor retenido por compresas de algodón mantenidas en las axilas de los donantes durante 30 minutos y que después se introducen en un recipiente cerrado para obtener su espacio de cabeza. El objeto de estos ensayos era por un lado tratar de diferenciar entre el sudor emitido por personas sanas y personas enfermas en las que el equilibrio del que

depende el olor del sudor se ve alterado y por otro analizar las variaciones del olor del sudor de las mujeres en relación con las distintas fases del ciclo ovulatorio.

#### 4.5.8.4. **Varios**

La calidad del medio natural es una problemática real e importante en la sociedad moderna. Una amplia variedad de contaminantes están implicadas en este fenómeno tales como los óxidos de carbono, nitrógeno y azufre y los compuestos orgánicos volátiles. Para monitorizar las emisiones y controlar la eficiencia del abatimiento del olor la legislación medioambiental necesita un sistema objetivo y rápido de medida. Las NE son por tanto una tecnología potencialmente útil en este tipo de medidas. La bibliografía indica que han sido aplicadas con éxito en las siguientes situaciones Dubreuil, Talou, and Gaset 2001:

- ✓ reconocimiento de distintos contaminantes del aire,
- ✓ monitorización de los contaminantes en el aire, suelo y agua,
- ✓ localización de la fuente de contaminación u olor,
- ✓ medidas cuantitativas de los gases,
- ✓ control del olor emitido por las basuras,
- ✓ detección de compuestos peligrosos.

En esta área Perera et al. 2001 con el prototipo de NE IpNose localizada en la periferia de un basurero y controlada a distancia, realizaron una exploración de los malos olores generados en estos lugares mostrando que era posible discriminar en campo entre el biogás emitido y los olores a basura, gracias al sistema de procesado de la señal disponible en este instrumento.

En el confort de las personas no sólo se tiene en cuenta la contaminación y el olor del medioambiente que nos rodea, sino que en la industria del automóvil también preocupa la contaminación con malos olores que aparece en el interior de los vehículos después de un cierto uso. Hay una serie de componentes en la construcción de un vehículo que contribuyen al "olor a coche nuevo" como son la espuma de poliuretano para los asientos, polipropileno y PVC para el salpicadero, puertas, etc.... Un aspecto importante por tanto, es tratar de disminuir el número de fuentes potenciales de malos olores para ello Garrigues et al. 2001 utilizando varios modelos comerciales de NE, analizaron y fueron capaces de discriminar ente 5 lotes de muestras de polipropileno por un lado, y por otro entre 5 muestras de espuma de poliuretano desarrolladas específicamente para la industria del automóvil, permitiéndose así la diferenciación en función del suministrador.

Otra aplicación posible de las NE, en un área completamente distinta a las indicadas hasta el momento es en la industria textil. Kleperis and Grinberga 2001 usando una NE construida por la empresa Nordic Sensor (ahora Agilent Technologies), formada por una matriz híbrida de diez

sensores MOSFET y cuatro sensores amperométricos, eran capaces de diferenciar entre el olor desprendido por cinco fibras textiles distintas (algodón, rayón, poliéster, lino y seda) antes y después de ser expuestas al humo del tabaco.

# **Antecedentes y**

# **Objetivos**

---

## 5. Antecedentes y objetivos

### 5.1. Antecedentes

Del estudio realizado en los apartados de planteamiento del problema y revisión bibliográfica, se pueden extraer los siguientes antecedentes de interés como punto de partida para el planteamiento de los objetivos de la presente tesis:

- ✓ Manzanas y peras son frutos de gran importancia en cuanto a superficie de cultivo y nivel de producción, siendo usual su comercialización tras un periodo de almacenamiento más o menos largo, bajo distintas condiciones, que afectan a la calidad final del producto que llega al consumidor.
- ✓ La emisión de compuestos volátiles producida por la fruta es un importante parámetro de calidad interna, contribuyendo de forma fundamental a la calidad organoléptica percibida por el consumidor.
- ✓ Se han descrito numerosas aplicaciones con resultados positivos del uso de las narices electrónicas (NE) como técnica de análisis global del aroma de la fruta .
- ✓ La mayoría de las aplicaciones de las NE al análisis de fruta plantean la evaluación del efecto del tiempo de almacenamiento ya sea en frío o en estantería sobre la calidad de la fruta, siendo prácticamente inexistentes los estudios que evalúen el efecto de las distintas atmósferas de frigoconservación sobre la emisión aromática de la fruta.
- ✓ La respuesta de los sensores de gases de las NE depende de numerosos factores que pueden ser difíciles de controlar, tales como la temperatura y la humedad del gas portador. Todos estos factores producen cambios en la sensibilidad y selectividad de los sensores que afectan a la reproducibilidad de las medidas.
- ✓ A pesar de la existencia de numerosos estudios con narices electrónicas no existe ningún procedimiento establecido para la calibración de los sensores de QCM en relación a la medida de la calidad organoléptica en fruta.

### 5.2. Objetivos

El objetivo global de esta tesis es “Desarrollo de una aplicación a la detección de aromas para una nariz electrónica del tipo Microbalanzas de Cristal de Cuarzo (QCM) para su adaptación a la determinación de calidad en frutas”, planteándose un serie de objetivos parciales en función de los antecedentes anteriormente expuestos:

1. Identificar las fuentes de variación que afectan a la calidad de los datos que se obtienen de una NE ya sea por afectar a las condiciones de funcionamiento de los sensores QCM, como a la generación del espacio de cabeza.
2. Establecer sistemas de corrección que permitan eliminar las fuentes de variación no deseadas.
3. Determinar las características metrológicas que definen el funcionamiento de los sensores de la NE. (Acotar las condiciones experimentales que puedan derivar en errores en los ensayos metrológicos de la nariz por incluir ruido en la referencia considerada, cuya concentración en aire se calcula teóricamente).
4. Establecer cuales deben ser las especificaciones que debe cumplir una NE para poder ser empleada en la evaluación de la calidad aromática de la fruta.
5. Segregar, en distintos estados de calidad aromática (madurez), empleando la NE, las variedades de manzanas y peras seleccionadas, sometidas a diferentes condiciones y tiempos de almacenamiento.

# **Materiales**

---





## 6. Materiales

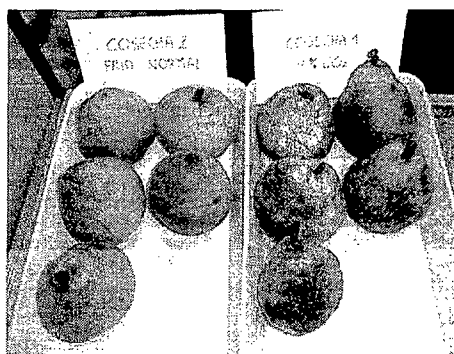
### 6.1. Material vegetal

Para la realización de los ensayos se empleó fruta de pepita concretamente una variedad de pera la Doyenne du Comice, y otra de manzana el cultivar Fuji. La fruta ha sido recolectada y seleccionada por los expertos del Departamento de Postcosecha, del centro UdL-IRTA de Lleida, que además han sido los encargados de almacenarla bajo las condiciones adecuadas así como de la realización de los envíos al Laboratorio de Propiedades Físicas (LPF) de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de Madrid.

#### 6.1.1. Criterios de selección

La elección de manzanas y peras como objeto de estudio para la realización de la presente tesis se debe a distintas motivaciones: por su importancia económica (ver punto 3), por el conocimiento experto que de ellos tienen los miembros del Dpto. Postcosecha del IRTA, por la facilidad en la disponibilidad del producto y por la facilidad de someter a la fruta a distintas condiciones comerciales de almacenamiento debido a la presencia en la zona de numerosas cooperativas especialistas en su manipulación y conservación; motivaciones derivadas en su mayor parte de la colaboración establecida a través del proyecto AROFRU, dentro del cual se enmarca esta tesis, con el Departamento de Postcosecha del IRTA de Lleida.

Se seleccionó así una variedad de pera representativa de la zona de Lleida, cv. Doyenne du Comice (campaña 1999-00). Esta es una de las variedades de pera más apreciadas, para muchos la mejor pera del mercado, debido a las buenas características organolépticas que desarrolla cuando está completamente madura (ver Figura 6-1). Esta variedad de pera es de forma cónica, algo abombada en el centro. Su piel es de color amarillo verdoso, lisa y delicada. La carne o pulpa es fina y jugosa de una tonalidad amarilla blanquecina.



• Figura 6-1: Peras cv. Doyenne du Comice preparadas para ensayar

En el caso de la manzana se seleccionó la variedad cv. Fuji (campañías 1999-00 y 2000-01) por la que han apostado numerosos agricultores de la zona pero de introducción relativamente reciente

y por tanto de la que se carece de información suficiente sobre su comportamiento al ser sometida bajo distintas condiciones de frigoconservación (ver Figura 6-2).

Esta es un manzana de una forma muy redonda y en general de mayor tamaño al promedio, proveniente de Nueva Zelanda. De piel de color rosa pálido sobre fondo verde. Su carne es crujiente y de sabor intenso, dulce, aromática, muy jugosa y refrescante.



• Figura 6-2: Manzanas cv. Fuji preparadas para ensayar.

## 6.2. Materiales de referencia

Los ensayos metrológicos y de calibración se realizaron utilizando distintos compuestos químicos puros por separado o en combinación. Los compuestos químicos seleccionados fueron los que se identificaron como algunos de los más abundantes en el aroma de distintas variedades de manzanas, peras y melocotones, a partir de datos obtenidos por CG/EM, y que aparecen abundantemente en la bibliografía (Rizzolo and Polesello 1989),(López et al. 1998a; López et al. 1998b),(Mattheis, Buchanan, and Fellman J.K. 1995),(Crouzet, Etievent, and Bayonove 1990).

Producto	Formula	Fabricante	Grado de pureza
Acetato de etilo	$C_4H_8O_2$	Sigma	99%
Acetato de propilo	$C_5H_{10}O_2$	Aldrich	99%
Acetato de butilo	$C_6H_{12}O_2$	Fluka	99%
Acetato de pentilo	$C_7H_{14}O_2$	Aldrich	99%
Acetato de hexilo	$C_8H_{16}O_2$	Aldrich	99%
1-Propanol	$C_3H_8O$	Fluka	99.5%
Butanol	$C_4H_{10}O$	Fluka	99.5%
1-Hexanol	$C_6H_{14}O$	Fluka	98%
Linalool	$C_{10}H_{18}O$	Aldrich	97%
Etanol	$C_2H_6O$	MERCK (pro-analysi)	99.8%
Benzaldehido	$C_8H_{16}O_2$	Sigma	99%
Acetaldehido	$C_2H_4O$	Aldrich	99.5%
$\gamma$ -Undecalactona	$C_{11}H_{20}O_2$	Aldrich	98%
$\gamma$ -Decalactona	$C_{10}H_{18}O_2$	Aldrich	98%
$\delta$ -Decalactona	$C_{10}H_{18}O_2$	Aldrich	98%

• Tabla 6-1: Descripción de los compuestos químicos puros empleados en los ensayos metrológicos.

---

# Métodos

---

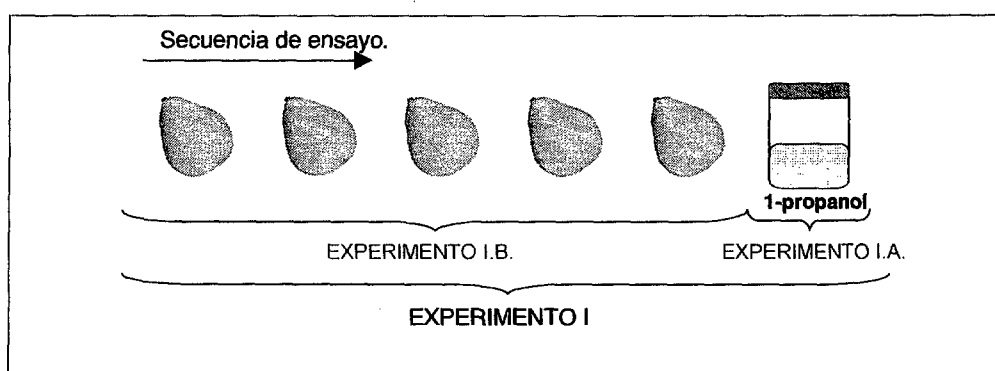
## 7. Métodos

### 7.1. Diseño de experimentos

#### 7.1.1. EXPERIMENTO I: evaluación de pera cv. Doyenne du Comice en almacenamiento frigorífico

Este experimento se plantea para evaluar la posibilidad de diferenciar lote y fruta sometida a distintas condiciones de almacenamiento (objetivo 5). Dado que este tipo de experimentos supone el análisis del material vegetal en días distintos se estableció la necesidad de efectuar un control de la deriva de la respuesta de la NE.

Por ello este experimento se dividió a su vez en dos experimentos parciales (ver Figura 7-1) que se realizaron simultáneamente a lo largo de la campaña de 1999-2000 correspondientes: a la evaluación del almacenamiento frigorífico y calibración de la NE.



• Figura 7-1: Esquema explicativo del Experimento I, para un lote ejemplo de 5 frutos.

#### ➤ EXPERIMENTO I.A.: utilización de referencias para la calibración de la señal de los sensores

Los problemas de deriva en la respuesta que afecta a los sensores de gases recomienda el uso de referencias (materiales estables y reproducibles). Concretamente este experimento se plantea para evaluar la deriva de la señal entre secuencias de ensayos o días de trabajo empleando 1-propanol como referencia, durante un año de medidas (septiembre 99 – mayo 00). Este estudio fue llevado a cabo simultáneamente con un experimento a gran escala con peras (Experimento I.B.).

#### ➤ EXPERIMENTO I.B.: aplicación en la evaluación del efecto del almacenamiento en pera cv. Doyenne du Comice

En este experimento se eligió un diseño factorial que engloba aquellos factores, que según la bibliografía, influyen en la calidad final que alcanza la fruta tras el almacenamiento (ver Tabla 7-1):

condiciones de almacenamiento (CA), tiempo de almacenamiento (TA), y tiempo de vida en estantería (VE) tras la salida de cámara. Los lotes tuvieron un tamaño de 15 frutos, analizándose un total de 180 frutos (ver Tabla 7-8).

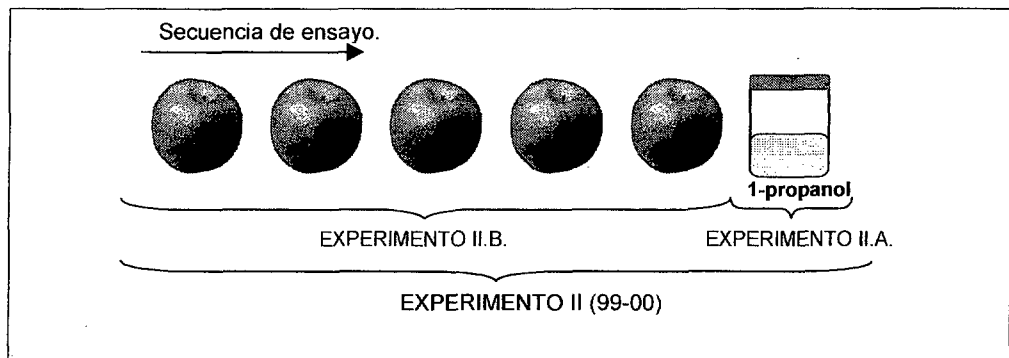
Tipo	CA		TA (meses)	VE (días)
	%O <sub>2</sub>	%CO <sub>2</sub>		
FN	21	0,03	Recolección	1
AC	2	0,7	6	4
AC	2	2	8	7
AC	2	5	9	

• Tabla 7-1: Tabla explicativa de las características del diseño factorial del Experimento IB. Para todas las CA las cámaras se mantuvieron a 1°C de temperatura y a un 92% de humedad relativa.

### 7.1.2. EXPERIMENTO II: evaluación de manzana cv. Fuji en almacenamiento frigorífico

Este experimento se plantea buscando dar respuesta a los mismos objetivos que el Experimento I pero esta vez aplicado a la evaluación de manzana cv. Fuji (ver Figura 7-2) y se realiza en dos campañas.

#### 7.1.2.1. Campaña 1999-2000



• Figura 7-2: Esquema explicativo del Experimento II realizado en la campaña 99-00, para un lote ejemplo de 5 frutos.

#### ➤ EXPERIMENTO II.A.: utilización de referencias para la calibración de la señal de los sensores

El experimento II.A. es complementario al Experimento I.A., realizado de igual modo y con los mismos objetivos que éste, los datos de ambos se analizan conjuntamente.

➤ **EXPERIMENTO II.B.: aplicación en la evaluación del efecto del almacenamiento en manzana cv. Fuji**

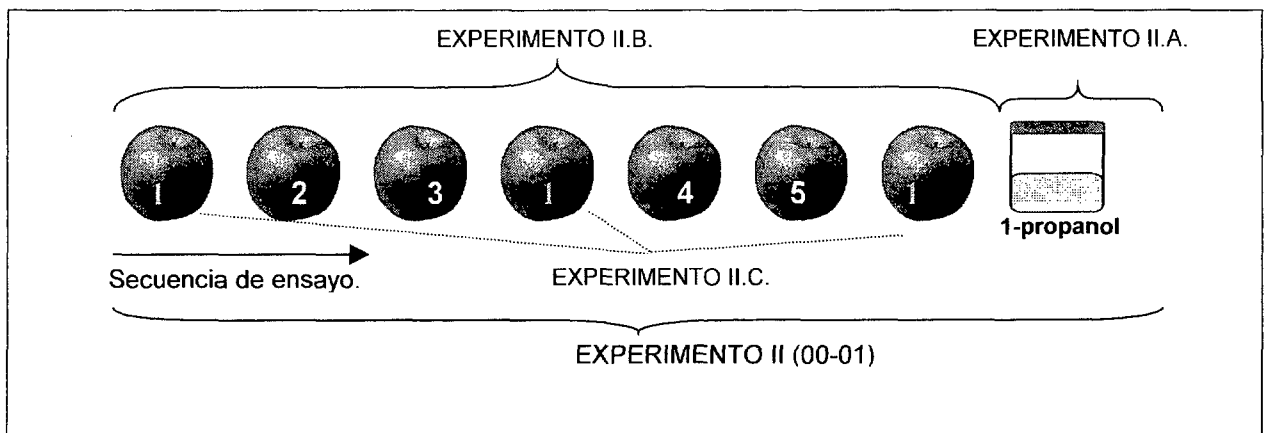
El diseño de experimentos en este caso considera los siguientes factores (ver Tabla 7-1): fecha de recolección (FR), CA, TA, y VE. Los lotes estuvieron formados por 15 frutos analizándose un total de 240 frutos (ver Tabla 7-8).

Tipo	CA		TA (meses)	VE (días)	FR
	%O <sub>2</sub>	%CO <sub>2</sub>			
FN	21	0,03	Recolección	1	
ACS	3	2	5	5	1 (13/10/99)
ULO1	1	1	7	10	2 (21/10/99)
ULO2	1	2			

• Tabla 7-2: Tabla explicativa de las características del diseño factorial del Experimento II.B. Para todas las CA las cámaras se mantuvieron a 1°C de temperatura y a un 92% de humedad relativa.

7.1.2.2. **Campaña 2000-2001**

En esta campaña se repitió el Experimento II.A., parcialmente el Experimento II.B. y se planteó un nuevo experimento II.C. para identificar nuevas fuentes de variación no caracterizadas hasta este momento pero esbozadas con el análisis de los resultados de los Experimentos I.A. y II.A.



• Figura 7-3: Esquema explicativo del Experimento II realizado durante la campaña (00-01), para un lote ejemplo de 5 frutos.

➤ **EXPERIMENTO II.A. 2ª campaña: utilización de referencias para la calibración de la señal de los sensores**

El experimento II.A.2ª campaña es complementario al Experimento II.A., realizado de igual modo y con los mismos objetivos que éste.

➤ **EXPERIMENTO II.B.2ª campaña: aplicación en la evaluación del efecto del almacenamiento en manzana cv. Fuji**

Los factores considerados en este diseño de experimentos fueron los mismos que en el Experimento II.B. pues se trata de experimentos complementarios (ver Tabla 7-3), los lotes estuvieron constituidos por 15 frutos analizándose un total de 360 frutos (ver Tabla 7-8)

Tipo	CA		TA (meses)	VE (días)	FR
	%O <sub>2</sub>	%CO <sub>2</sub>			
FN	21	0,03	3	1	
ACS	3	2	5	5	1 (9/10/00)
ULO1	1	1	7	10	2 (18/10/00)
ULO2	1	2			

• Tabla 7-3: Tabla explicativa de las características del diseño factorial del Experimento IB. Para todas las CA las cámaras se mantuvieron a 1°C de temperatura y a un 92% de humedad relativa.

➤ **EXPERIMENTO II.C.: utilización de referencias para la calibración de la señal de los sensores**

Evaluación de la deriva de la señal dentro de cada secuencia midiendo el mismo fruto tres veces durante un día de trabajo: al principio, a la mitad y al final de cada secuencia (ver Figura 7-3). Para la realización de este experimento no se empleó la referencia (1-propanol) ya que la alta concentración a la que se encuentra su espacio de cabeza alteraría la señal de los sensores dentro de un experimento. Este estudio se repitió a lo largo de toda la campaña 2000-2001 y se llevó a cabo junto con un experimento a gran escala con manzanas (Experimento II.B 2ª campaña).

**7.1.3. EXPERIMENTO III : metrología de la nariz electrónica**

Este experimento se plantea para dar respuesta fundamentalmente a los Objetivos 3 y 4, permitiendo alcanzar un conocimiento profundo de las características del equipo y de las posibilidades reales de su uso en diversas aplicaciones.

**7.1.3.1. EXPERIMENTO III.A.: Evaluación de la respuesta de los sensores QCM frente al vapor de agua.**

Este experimento se realizó analizando con la NE el espacio de cabeza generado por tres muestras: etanol 12% v/v, etanol 6%v/v y agua destilada pura, para determinar la influencia de la presencia de vapor de agua en la respuesta de los sensores en relación con una dilución de etanol en agua destilada.



Los espacios de cabeza se generaron a partir de un volumen de 60 ml de cada muestra que se introducían en el interior de un bote hermético, mediante el sistema TIPO 1 de generación del espacio de cabeza (ver apartado 7.2.3). Las muestras se mantuvieron en un baño termostático a una temperatura constante de 22.5°C durante 45 minutos. Las medidas se realizaron con los sensores correspondientes al Lote 2 (ver apartado 7.2.2). Se llevaron a cabo tres repeticiones por muestra siendo 9 el número total de medidas realizadas debidamente aleatorizadas.

Este experimento se llevó a cabo como parte de los realizados dentro de un proyecto fin de carrera titulado “Evaluación de una nariz electrónica tipo QCM para el análisis de vinos”, realizado por el alumno Andrés García García de la Universidad de Valladolid (campus de Palencia) en colaboración con el LPF de la Escuela de Ingenieros Agrónomos de Madrid.

#### **7.1.3.2. EXPERIMENTO III.B.: Estimación de la sensibilidad, especificidad y precisión de una NE de sensores QCM, mediante la generación de espacios de cabeza de concentraciones conocidas.**

El análisis metrológico de la NE se realizó para algunos de los compuestos químicos que aparecen en mayor proporción en el aroma de pera determinándose la precisión, sensibilidad y especificidad del equipo en relación con estos productos.

Los compuestos elegidos fueron un alcohol (1-propanol), dos ésteres (acetato de propilo y acetato de etilo) y 4 concentraciones de espacio de cabeza (5, 20, 100 y 1000 ppm) para cada uno de estos compuestos calculadas a través de la ecuación 4-4 .

Los ensayos se llevaron a cabo a lo largo de la primera semana de noviembre de 2000, realizándose 3 repeticiones por especie química y concentración y aleatorizándose el orden en el cual eran tomadas las medidas. En total se realizaron 36 medidas.

#### **7.1.3.3. EXPERIMENTO III.C.: evaluación de mezclas artificiales de pera y melocotón**

Este experimento se planteó para evaluar la capacidad de la NE para detectar volátiles diferentes que aparecen típicamente en el espacio de cabeza generado por la fruta. Para ello se consideraron dos aproximaciones:

##### **➤ Diferenciación entre cuatro muestras líquidas con fuertes diferencias entre ellas.**

Las mezclas artificiales se formularon (ver Tabla 7-4) con el objetivo de que el olor de su espacio de cabeza imitara al aroma emitido por los frutos: pera, pera senescente (pera más etanol) y melocotón. La cuarta muestra utilizada fue zumo de manzana estabilizado con cisteína para evitar el

proceso de oxidación. Se realizaron tres repeticiones por muestra de forma que fueron 12 el total de medidas realizadas.

<b>Producto (ppm)</b>	<b>Pera</b>	<b>Pera + etanol "pera senescente"</b>	<b>Melocotón</b>
Acetato de etilo	158.7	158.7	--
Acetato de propilo	156.5	156.5	--
Acetato de butilo	155.3	155.3	--
Acetato de pentilo	154.5	154.5	--
Acetato de hexilo	463.4	463.4	--
1-Propanol	283.5	283.5	--
Butanol	285.7	285.7	--
1-Hexanol	288.5	288.5	--
Linalool	--	--	17.38
Etanol	--	278.6	--
Benzaldehído	--	--	21
Acetaldehído	277.9	277.9	--
$\gamma$ -Undecalactona	--	--	188.44
$\gamma$ -Decalactona	--	--	380.5
$\delta$ -Decalactona	--	--	190.2

• Tabla 7-4: concentración en la mezcla líquida, expresada en ppm, de los compuestos químicos puros que constituye la formulación de los patrones artificiales de fruta.

➤ **Diferenciación entre cuatro muestras líquidas con ligeras diferencias entre ellas.**

Dos de las muestras fueron los patrones que imitaban al aroma de pera y melocotón, descritos en el experimento previo y de las que en este experimento se realizó sólo una única medida. Las otras dos muestras se obtuvieron mezclando las muestras artificiales de pera y melocotón en dos porcentajes diferentes ( 60% de pera más 40% de melocotón y 60% de melocotón más 40% pera), tomándose tres medidas de cada una de ellas. En este caso fueron 8 el número total de muestras analizadas.

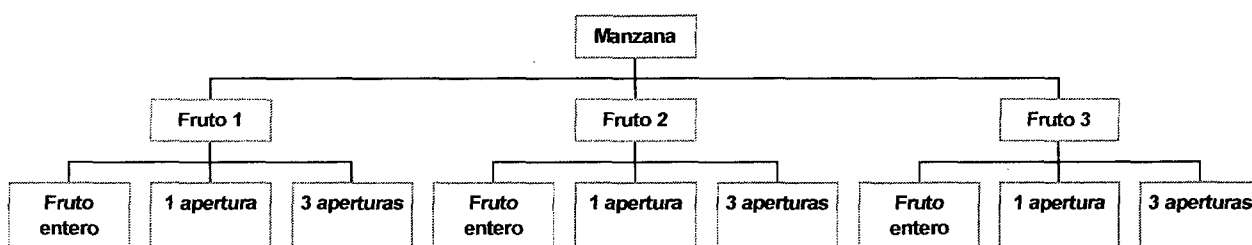
En ambos experimentos se introdujo un volumen de 10 ml de cada muestra en el interior de un bote hermético, donde la generación del espacio de cabeza se hizo siguiendo el sistema Tipo 1, las muestras se mantuvieron en un baño termostático a una temperatura constante de 40°C durante 10 minutos. Las medidas se realizaron con los sensores correspondientes al Lote 1. La concentración que alcanzó el espacio de cabeza generado por las muestras una vez alcanzado el equilibrio estaba alrededor de las 500 ppm.

Estos experimentos se realizaron durante un experimento colaborativo (KU Leuven – Febrero de 2000) dentro del marco de la European Concerted Action ASTEQ.

#### 7.1.3.4. **EXPERIMENTO III.D.: caracterización del efecto de daños en la piel sobre la composición del espacio de cabeza**

Con este experimento se pretende identificar otra fuente de variación (Objetivo 1) que afecta a la reproducibilidad del espacio de cabeza generado por un fruto como es la presencia de daños o roturas en su piel. Para ello se planteó la diferenciación entre manzanas con tres niveles diferentes de daños en la piel. El daño se infringía utilizando una sonda metálica cilíndrica de 1,7 cm de diámetro con la que se practicaron una y tres aperturas cilíndricas sobre la piel de cada fruto.

Cada una de las tres manzanas ensayadas se midieron primero sin ningún daño, luego con una apertura y finalmente con tres aperturas (ver Figura 7-4), siendo 9 el número de medidas realizadas.



• Figura 7-4: Esquema explicativo del diseño de experimentos para el EXPERIMENTO III.C.

Como en el caso del experimento anterior sobre muestras artificiales éste fue llevado a cabo durante los mismos ensayos colaborativos en el marco del programa ASTEQ (KU Leuven – Belgium, febrero de 2000). El reducido tiempo de trabajo disponible (1 semana) explica el bajo número de muestras usadas en este caso.

#### 7.1.4. **EXPERIMENTO IV.: determinación de la concentración del espacio de cabeza por Cromatografía de Gases.**

Este experimento nace de la necesidad de cuantificar la variabilidad en las concentraciones del espacio de cabeza en las muestras de referencia empleadas en los experimentos I.A., II.A. y III. Hasta este punto la concentración en el espacio de cabeza en el equilibrio se habría derivado de la presión de vapor del producto puro que se sabe dependiente de la temperatura.

El diseño de experimentos consistió en la evaluación de 2 analitos y 7 concentraciones. La ecuación 4-4 permitió determinar la dilución del analito en agua destilada que teóricamente derivaba en la concentración deseada en el espacio de cabeza.

Concentración (mg/kg <sub>aire</sub> )	1-Propanol ( $\delta=0.804\text{gr/ml}$ )		Etanol ( $\delta=0.79\text{gr/ml}$ )	
	g	ml	g	ml
1	0.08	0.10	0.04	0.05
5	0.42	0.52	0.20	0.25
10	0.83	1.04	0.40	0.50
20	1.67	2.07	0.80	1.00
40	3.33	4.15	1.59	2.02
60	4.99	6.21	2.39	3.03
80	6.71	8.30	3.20	4.04

• Tabla 7-5: Volumen (y masa) de 1-propanol y etanol a mezclar con 250 ml de agua destilada para obtener una determinada concentración de los mismos, en ppm, en el espacio de cabeza.

Para llevar a cabo este experimento se utilizaron dos alcoholes: 1-propanol referencia habitual para la NE "Libra Nose" y etanol elegido por ser un producto que está presente habitualmente en los productos agro alimentarios, pero su elección se debe fundamentalmente a que ambos cumplen la condición indispensable para este ensayo de ser miscibles en agua.

El experimento es desglosado en dos partes A y B que se detallan a continuación:

#### 7.1.4.1. Experimento IV.A

Con este experimento se pretende determinar los coeficientes de actividad para el etanol y el 1-propanol a través de las derivas de su recta de calibración respecto a la curva teórica (lineal desde el origen (0,0)), comparando la concentración calculada teóricamente (ppm) con la correspondiente con el área de los picos (mv·s) del cromatograma.

Se analizaron para ambos alcoholes 7 concentraciones de espacio de cabeza (1, 5, 10, 20, 40, 60 y 80 ppm) con dos repeticiones por muestra, realizándose sólo una tercera cuando los datos correspondientes a las dos repeticiones previas no concordaban, siendo así 28 el número válido de medidas realizadas.

#### 7.1.4.2. Experimento IV.B

Este experimento consistió en el seguimiento del incremento de concentración del espacio de cabeza hasta el equilibrio entre las fases líquidas y gaseosas a lo largo del tiempo durante la generación del espacio de cabeza. De nuevo se realizó para el 1-propanol y el etanol (mantenidos a una temperatura de 1°C) tomando muestras del espacio de cabeza en seis instantes distintos:

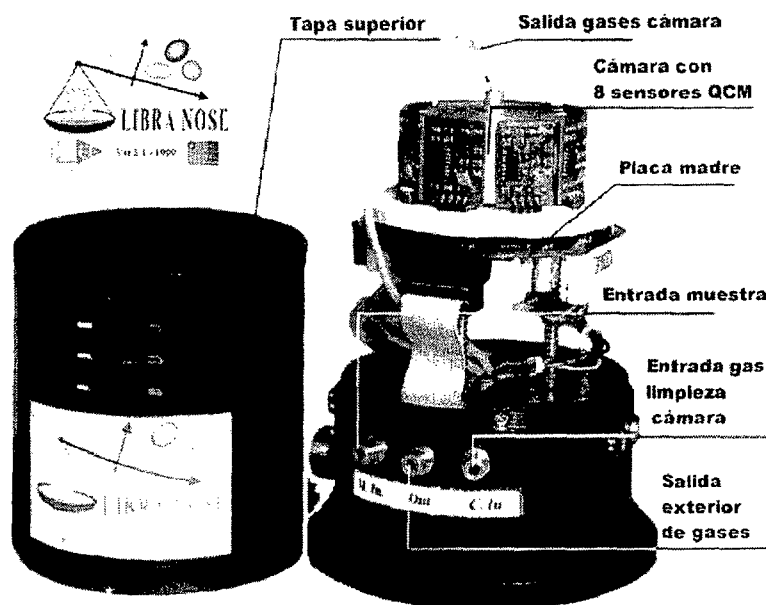
- ✓ cada 1.5, 2.5, 5, 10, 15 y 20 minutos, se muestreó el 1-propanol,
  - ✓ cada 1, 3, 5, 10, 15 y 20 minutos, se muestreó el etanol,
- efectuándose tres repeticiones por muestra con un total de 36 medidas.

## 7.2. Metodología en el uso de la nariz electrónica

### 7.2.1. Descripción de la nariz electrónica "Libra Nose"

La NE "Libra Nose", es un equipo sensor de gases comercializado por la empresa italiana Technobiochip, desarrollado a partir del prototipo diseñado por el grupo dirigido por los profesores Arnaldo D'Amico y Corrado di Natale en el Dipartimento di Sensory e Microsistemy de la Università di Torvergata di Roma (Italia).

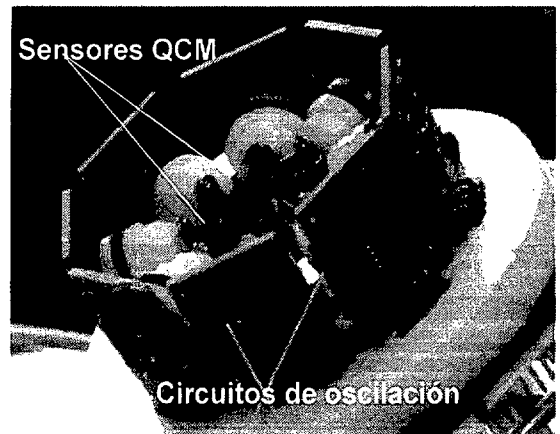
La estructura externa del instrumento (ver Figura 7-5) está basada en un cilindro de aluminio de 17 cm de altura y 10 cm de diámetro en cuyo interior se disponen todos aquellos elementos necesarios para el funcionamiento de la NE. El conjunto tiene un peso total de 1.4 kg, es por tanto un equipo portátil, en el que podemos distinguir los siguientes componentes:



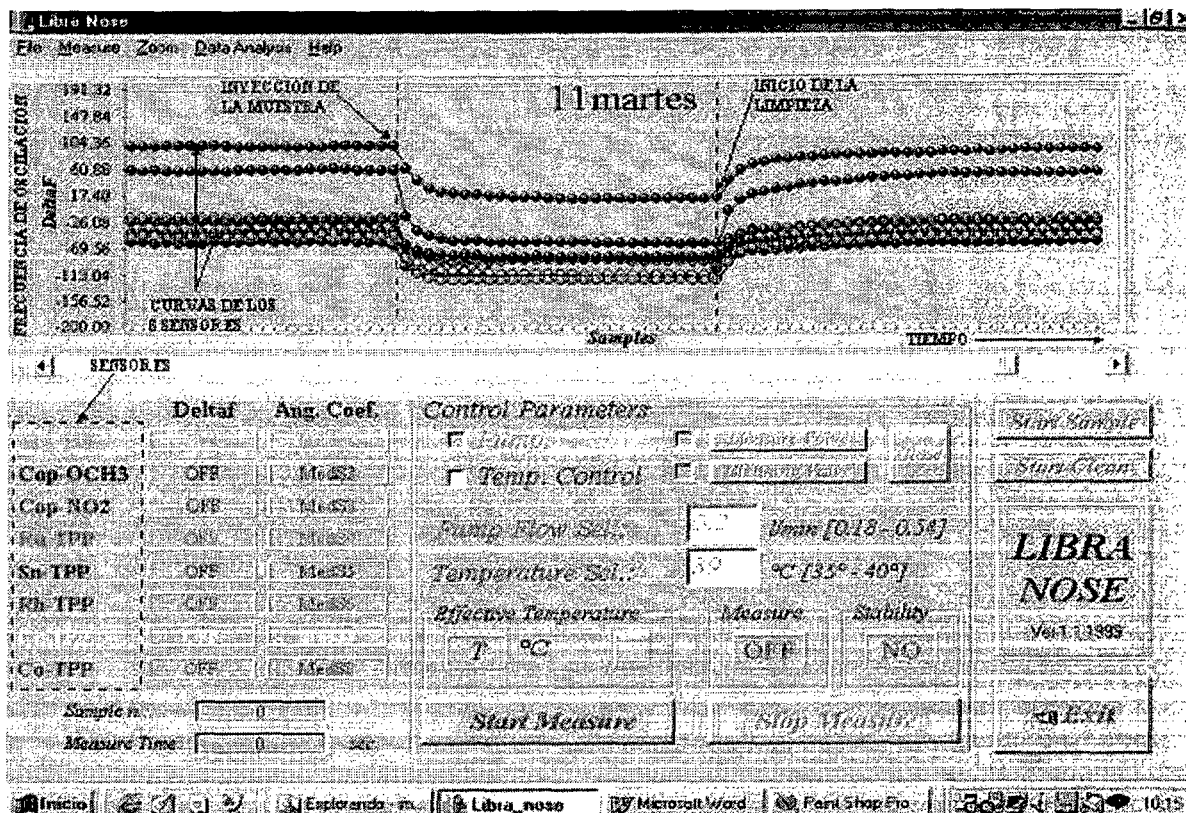
• Figura 7-5: Imagen descriptiva de los distintos componentes de la NE "Libra Nose".

- ✓ SISTEMA DE FLUJO, localizado en la parte inferior del cilindro y formado por una micro-bomba capaz de crear un flujo de absorción constante, tres micro-electroválvulas para canalizar el efluente y un sistema interno de tuberías que conectan estos elementos entre sí y con la cámara de medida,
- ✓ CÁMARA DE MEDIDA, situada en la parte superior del equipo es en la que están situados los sensores. Los sensores están dispuestos equidistantemente a lo largo de la pared interior de la cámara, también cilíndrica, de aproximadamente 20 ml de volumen y fabricada en acero inoxidable.
- ✓ SISTEMA SENSORIAL: es la parte fundamental del instrumento está basado en una matriz de 8 sensores del tipo QCM, recubiertos por una capa sensible de metaloporfirinas. En el recubrimiento de cada uno de los sensores la molécula de porfirina está asociada a un metal distinto, de forma que cada sensor dispone de una capa sensible de características diferentes.

- ✓ **CIRCUITO DE OSCILACIÓN:** cada sensor tiene una frecuencia fundamental de 20 MHz y es parte de un circuito de oscilación. El circuito completo está formado por ocho osciladores que controlan la oscilación del cristal de cuarzo aportándole la energía necesaria para su funcionamiento,



- Figura 7-6: Imagen de los sensores de gases y sus correspondientes circuitos de oscilación dispuestos en el interior de la cámara de medida.
- ✓ **SISTEMA DE CONTROL INTERNO,** formado por una placa base situada en la parte media del equipo inmediatamente por debajo de la cámara de medida, está basada en un microcontrolador programable que maneja el proceso completo de medida y permite la adquisición de las frecuencias de cada sensor, su memorización, el control de la parte neumática, control de la temperatura, y la comunicación bidireccional del conjunto con el ordenador,
  - ✓ **SISTEMA DE ESTABILIDAD TERMICA,** formado por un microventilador y por un sensor térmico situado en contacto con la cámara de medida con dos células de Peltier como accionadores capaces de suministrar o de extraer el calor necesario para obtener la estabilización térmica deseada,
  - ✓ **SISTEMA DE CONTROL CENTRAL,** es un PC conectado vía puerto de serie con la NE con el que el operador puede controlar el procedimiento entero de la medida dirigiendo los accionadores y programando la temperatura y los valores de flujo deseados (ver Figura 7-7). El software Libra Nose 1.2 - 2000 permite también visualizar y elaborar los datos que envía el dispositivo, de forma que el programa establece como referencia interna la frecuencia en el punto de inicio (aproximadamente 20 MHz), es decir, a cada medida se sustrae el primer valor de frecuencia de oscilación obteniendo un valor de frecuencias relativas ( $\Delta f^*$ ).

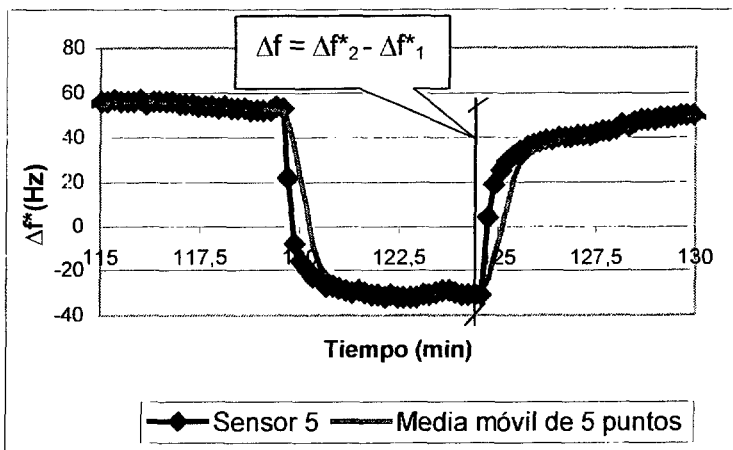


• Figura 7-7: Imagen del display que aparece en pantalla, del programa Libra Nose 1.2.-2000, los rótulos que aparecen en rojo han sido añadidos por la autora como indicaciones explicativas.

Una vez descritas las características del equipo, el otro aspecto fundamental es definir cuales son las características de la señal del sensor que se va a considerar como variable objeto de análisis estadístico.

Así la variable que se va a usar como respuesta del sensor ante una muestra gaseosa es el incremento entre las señales relativas estabilizadas ( $\Delta f$ ) antes y después de la exposición del sensor al gas (ver Figura 7-8).

Durante la realización de la medida y como consecuencia de la adsorción de las moléculas gaseosas sobre el recubrimiento sensible del sensor, la frecuencia a la que este oscila disminuye y el sistema de limpieza debe garantizar la recuperación de la señal a niveles similares a los del inicio.



• Figura 7-8: Ejemplo de la señal de un sensor QCM durante la realización de una medida, antes y después de su suavizado.

Uno de los problemas al evaluar los incrementos es el ruido de la línea base, para corregirlo se ha desarrollado dentro de las actividades de esta tesis doctoral un software de suavizado e integración de la señal (ver apartado 7.6.1. de metodología).

### **7.2.2. Sensores QCM**

Las características de este tipo de sensores, ampliamente abordadas en el apartado 3.2.2, dependen en gran medida del recubrimiento sensible que se les aplique. En el estudio bibliográfico previo se identificaron los compuestos que desde el punto de vista cuantitativo y cualitativo tenían más importancia en la caracterización aromática de manzanas y peras, en base a esta información los expertos en sensores de la universidad de Roma seleccionaron los recubrimientos más adecuados para la detección de dichos volátiles. Así en la realización de esta tesis se han utilizado dos lotes de sensores que se diferencian en las características de sus recubrimientos.

#### **➤ LOTE 1**

Durante el primer año de experimentos (99-00) se utilizaron sensores (S) de una sola capa, es decir, el recubrimiento cubre sólo una de las caras del cristal de cuarzo. En este caso las capas de porfirina estaban combinadas con los siguientes metales que caracterizan a los ocho sensores del LOTE 1: Mn (S1), Cop-OCH3 (S2), Cop-NO2 (S3), Ru (S4), Sn (S5), Rh (S6), Cr (S7) and Co (S8)

#### **➤ LOTE 2**

Debido a que el fabricante (Universidad de Torvergata de Roma – Technobiochip) recomienda la sustitución de los sensores tras 400-500 h de trabajo, se utilizó para el periodo de ensayos 00-01 un nuevo lote de sensores esta vez de doble capa, es decir, ambas caras del sensor están recubiertas por material sensible. Este hecho supuso un cambio drástico en la respuesta de los sensores, así, mientras que la respuesta media de los sensores de capa única hacia nuestra referencia (1-propanol) era de 66,4 Hz, la respuesta de los sensores de doble capa hacia el 1-propanol era de 300 Hz.

Los recubrimientos usados en la construcción de este nuevo lote de sensores fueron exactamente los mismos que los empleados en el LOTE 1, sin embargo, para posibles comparaciones posteriores el sensor de cara única S5 (ahora S5A), que resultó ser tras el análisis de los primeros conjuntos de datos el de mayor sensibilidad, no fue eliminado y el S6 del LOTE 1 fue sustituido por un nuevo sensor S5 de doble capa (S5B). Con todos estos cambios el nuevo LOTE 2 se compondrá de los siguientes tipos de recubrimientos: Mn (S1), Cop-OCH3 (S2), Cop-NO2 (S3), Ru (S4), Sn (S5A), Sn (S5B), Cr (S7) and Co (S8).

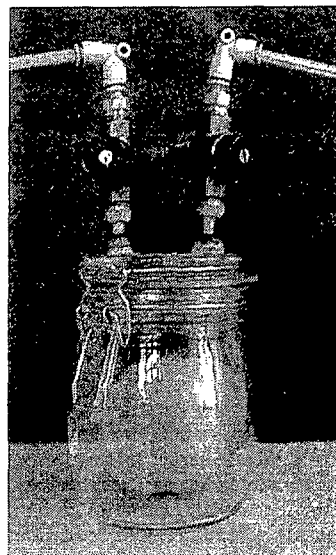


### 7.2.3. Generación del espacio de cabeza

Se ha utilizado la técnica “Estática-Dinámica con Transferencia del Efluente ” (ver Tabla 4-7) para la generación del espacio de cabeza, con distintas modificaciones en función del producto a analizar y de las características de cada experimento.

➤ **TIPO 1: para muestrear fruta.**

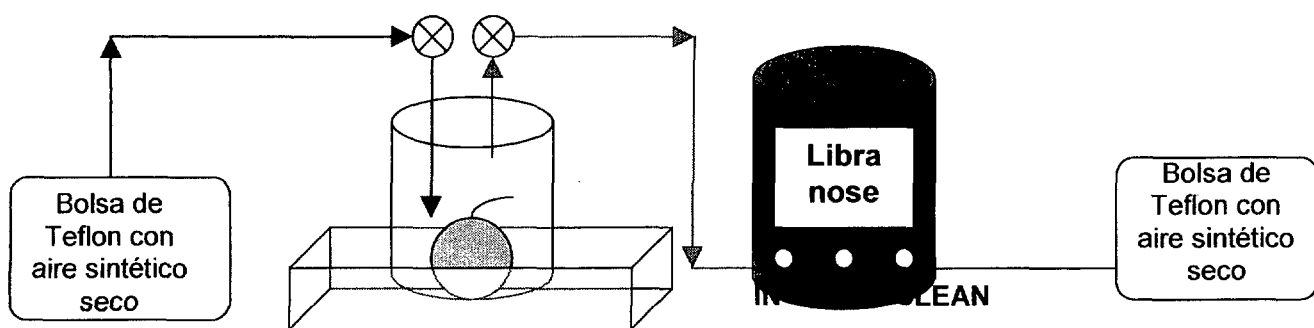
Este sistema consiste en la colocación de un único fruto entero en el interior de un bote hermético de cristal de 0,75 l (ver Figura 7-9). En la tapa del recipiente se han instalado dos válvulas de corte / apertura total de flujo para facilitar la transferencia eficiente del espacio de cabeza a la nariz electrónica. El tiempo de generación del espacio de cabeza es de 1 hora.



➤ **TIPO 2: para muestrear compuestos químicos puros en estado líquido.**

Este sistema ha sido el empleado para la realización de algunos experimentos metroológicos y para el análisis de la referencia (1-propanol) donde el producto químico se introduce en el interior de un bote hermético de cristal de 50 ml, que es llenado entre un 10% y un 40 % según el experimento. Los botes se cierran mediante un tapón tipo septo, usando un sistema de agujas y tubos para realizar la transferencia del espacio de cabeza (ver Figura 7-10). El tiempo de generación del espacio de cabeza es de 20 o 30 minutos.

En ambos casos para mantener constantes la condiciones de generación del espacio de cabeza, los botes herméticos se mantienen en el interior de una baño termostático a 22,5 °C. Además el aire ambiente que queda atrapado en el interior del bote junto a la muestra cuando es cerrado, se elimina empujándolo hacia el exterior mediante un flujo de aire seco que sustituye al aire ambiente en el interior del bote. Con esto se pretende evitar que olores externos contaminen el espacio de cabeza y sobre todo el efecto que la variación de la humedad relativa puede tener sobre la reproducibilidad del espacio de cabeza.



• Figura 7-9: Esquema explicativo de la generación y transferencia del espacio de cabeza generado por un fruto y con sistema de transferencia y limpieza basado en aire sintético seco.

#### 7.2.4. Transferencia del espacio de cabeza

Cuando se alcanza el equilibrio entre la fase gaseosa y la fase líquida o sólida de la muestra un flujo controlado de aire de 0,2 l/min generado por la succión ejercida por la microbomba localizada en el interior de la NE, transporta al espacio de cabeza hacia la cámara de medida donde se encuentran los sensores.

Para evitar que aparezcan depresiones en el interior del recipiente el aire seco, ya sea aire sintético seco almacenado en el interior de una bolsa de teflón o aire ambiente desecado al pasar a través de un cartucho de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , conectado a través de un sistema de tubos a una de las válvulas (aguja) del bote hermético, entra en el interior del bote por su parte inferior empujando al espacio de cabeza hacia la NE a través de la otra válvula (aguja) (ver Figura 7-9 y Figura 7-10).

#### 7.2.5. Sistema de limpieza y gas portador

Cuando la muestra gaseosa alcanza la cámara de medida la frecuencia de oscilación de los sensores cambia obteniéndose así la variable de interés una vez estabilizada su señal. Tras la obtención de la señal correspondiente a la muestra gaseosa la cámara de medida debe ser limpiada para que los sensores recuperen su frecuencia normal de oscilación, quedando preparados para realizar la siguiente medida.

Al igual que en la transferencia del espacio de cabeza es la micro-bomba de la NE la que genera un flujo de succión de 0,2 l/min, obligando al gas portador a entrar en la cámara de medida a través de la válvula CLEAN, este aire en principio inodoro y seco, es el encargado de barrer las moléculas del espacio de cabeza que permanecen adsorbidas sobre la superficie de los sensores.

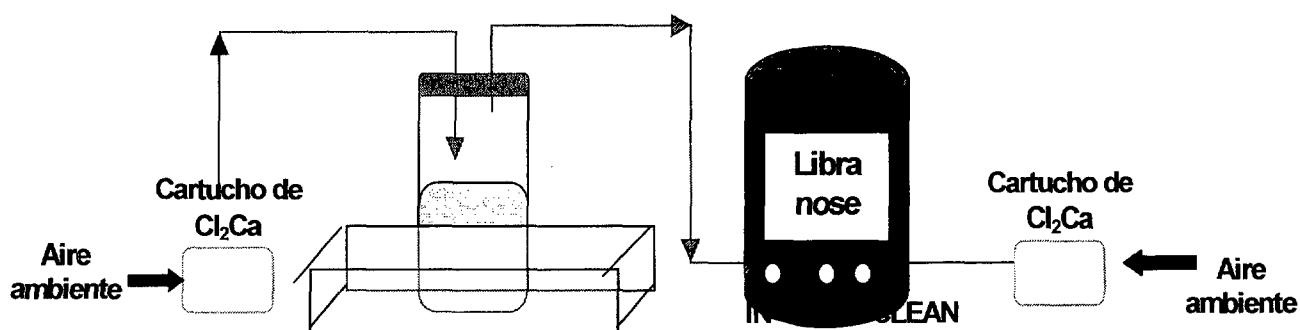
En esta tesis se han utilizado dos sistema de limpieza basados en el uso de dos tipos de gas portador.

### ➤ Aire ambiente, desecado a través de un cartucho de $\text{Cl}_2\text{Ca}$

El sistema consiste en hacer pasar al aire procedente del ambiente a través de un cartucho de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  granulado (granos de 2 a 5 mm) y seco (pureza 96%, PROLABO). El  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  es una sustancia altamente higroscópica que absorbe el vapor de agua presente en el aire ambiental desecándolo.

El sistema completo (ver Figura 7-10) consiste en dos cartuchos de vidrio rellenos con gránulos de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  y conectados por un sistema de tubos y válvulas por un lado a la válvula CLEAN de la NE alcanzando a través de ella la cámara de medida para su limpieza y por otro al bote hermético para la transferencia del espacio de cabeza.

Durante la campaña 99-00 este fue el sistema de limpieza y gas portador empleado en los análisis con la NE.



• Figura 7-10: Esquema explicativo de la generación y transferencia del espacio de cabeza generado por un producto químico, con sistema de transferencia y limpieza basado en  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ .

### ➤ Aire sintético seco

Durante la campaña 00-01 buscando eliminar fuentes de variación no controladas previamente, se optó por un gas portador del que se puede asegurar que está completamente seco, es inodoro y mantiene propiedades idénticas a lo largo de todo el experimento. En este caso aire sintético seco C50 ( $\text{H}_2\text{O} \leq 2$  ppm/v, Carburos Metálicos SA, Madrid) procedente de bombona a presión es almacenado en sendas bolsas de Teflón.

Las bolsas tienen la doble misión de contener el aire sintético seco de forma que no se comunique a la micro-bomba de la NE ninguna sobre-presión que pudiera dañarla como ocurriría si la transferencia se hiciera directamente de la bombona y de no contaminar el aire almacenado con ningún olor extraño, de ahí que se utilicen bolsas de un material inerte como es el Teflón®.

El sistema completo (ver Figura 7-9) consiste en dos bolsas de Teflón rellenas con aire sintético seco y conectadas por un sistema de tubos y válvulas (agujas) por un lado, a la válvula CLEAN de la NE alcanzando a través de ella la cámara de medida para su limpieza, y por otro al bote hermético para la transferencia del espacio de cabeza.

### 7.2.6. Sistema de referencia: 1-propanol

Al igual que en otras técnicas como por ejemplo la CG es necesario usar patrones o referencias para controlar el estado del equipo y poder así tratar conjuntamente los datos obtenidos en diferentes sesiones o días de trabajo, como herramienta de calibración.

Basándose en estudios preliminares se seleccionaron varios compuestos químicos puros importantes en el aroma de pera (ver Tabla 7-4) y se ensayaron con la NE "Libra Nose", de entre ellos el 1-propanol fue el seleccionado como la referencia ya que era el que presentaba una mejor repetibilidad de las medidas.

El espacio de cabeza (generación Tipo 2) del 1-propanol es medido al final de cada día de trabajo para evitar fallos debidos a la alteración de la respuesta de los sensores, puesto que su espacio de cabeza está demasiado concentrado si lo comparamos con el generado por la fruta.

### 7.2.7. Esquema general de los experimentos realizados con nariz electrónica

Como se ha expuesto, a lo largo de las dos campañas de ensayos se han realizado tres grandes bloques de experimentos en los que se ha utilizado la NE, buscando dar respuesta a los distintos objetivos planteados. Las características de cada experimento incluyendo la metodología empleada en el uso de la NE, se especifica en la siguiente tabla:

Experimento	Campaña	Sensores	Generación del espacio de cabeza			Sistema de limpieza y gas portador
			TIPO	Tiempo (min)	Volumen muestra	
<b>Experimento I</b>						
<b>IA</b>	99-00	Lote 1	2	20	5 ml	Aire ambiente + Cl <sub>2</sub> Ca
<b>IB</b>			1	60	1 fruto	
<b>Experimento II</b>						
<b>IIA</b>	99-00	Lote 1	2	20	5 ml	Aire ambiente + Cl <sub>2</sub> Ca
<b>IIB</b>			1	60	1 fruto	
<b>IIA</b>	00-01	Lote 2	2	20	5 ml	Aire sintético seco
<b>IIB</b>			1	60	1 fruto	
<b>IIC</b>			1	60	1 fruto	
<b>Experimento III</b>						
<b>IIIA</b>	00-01	Lote 2	1	45	60 ml	Aire sintético seco
<b>IIIB</b>			2	30	20 ml	
<b>IIIC</b>	99-00	Lote 1	1	10	10 ml	Aire sintético seco
<b>IIID</b>			1	60	1 fruto	

• Tabla 7-6: Esquema general de los experimentos realizados con la nariz electrónica.

### **7.3. Metodología para las técnicas de referencia**

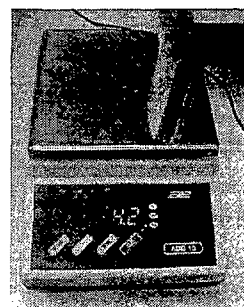
Una de las informaciones que se aporta en la revisión bibliográfica es que se ha demostrado que los volátiles producidos por los frutos cambian cuantitativa y cualitativamente con la maduración, de ahí que para poder correlacionar la emisión aromática del fruto con su estado de madurez, se realicen una serie de medidas de referencia que permitan caracterizar el estado de madurez del fruto en cada momento. Tomando como base la experiencia investigadora del Laboratorio de Propiedades Físicas se decidió que los atributos de calidad más importantes para hacer un seguimiento de la evolución del fruto son:

- ✓ color externo de la piel del fruto, estimado como porcentaje de reflectancia en el espectro visible (desde 400 nm a 700 nm),
- ✓ variables texturales y de firmeza, propiedades mecánicas cuantificadas a través de diferentes ensayos reológicos,
- ✓ contenido en azúcares, estimado mediante el índice de sólidos solubles de su zumo, y
- ✓ contenido en ácidos, estimado mediante la valoración de los ácidos totales titulables.

Por otro lado no hay que olvidar que hasta hace pocos años el único método utilizado para el análisis de los gases emitidos por un fruto era la CG, que sigue siendo el método de referencia reconocido por todos los laboratorios de análisis químico. Este hecho junto con el conocimiento de que ambas técnicas lejos de ser sustitutivas son complementarias, explican la necesidad de comparar y correlacionar las medidas obtenidas con la NE con aquellas obtenidas por CG.

#### **7.3.1. Calibre**

Los frutos son calibrados por peso, uno a uno, al comienzo de cada uno de los días de ensayo, mediante una balanza ADG10 (Adam Equipment CO. LTD, Heraeus, Madrid) de precisión  $\pm 0,1$  g.



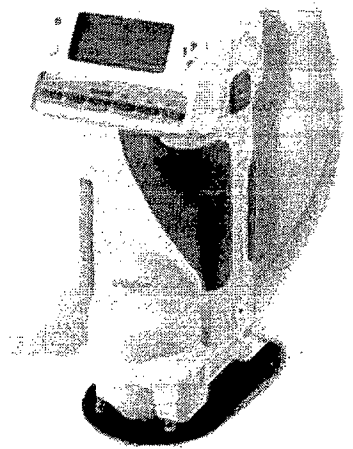
#### **7.3.2. Color de la piel**

Una vez pesados, los frutos se caracterizaban por el color y el espectro visible de la piel. Se empleó un espectrofotómetro portátil CM-508i para registrar el espectro visible de la luz emitida por reflexión por la superficie externa de la muestra, al hacer incidir sobre ella un pulso de luz.

La iluminación empleada fue del tipo d/8 con componente especular incluido. El rango fotométrico es de 0 a 175% de reflectancia. La fuente de luz está constituida por una lámpara xenón pulsante que ilumina un área de medida de 11 mm de diámetro. El rango de longitud registrado fue el correspondiente al visible, de 400 a 700 nm, a intervalos de 20 nm. La interfase de comunicación con el ordenador y con el programa de volcado de datos es un RS-232C normalizado.

Se tomó el espectro visible de la cara más coloreada (chapa) y de la cara opuesta (dos medidas por fruto) y se calcularon las coordenadas CIE  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ .

CM-508i



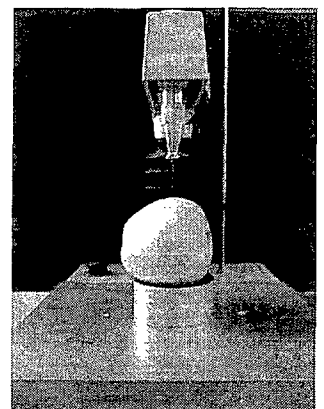
### 7.3.3. Textura

El equipo utilizado para la realización de los ensayos instrumentales destructivos que permiten la caracterización de la textura del fruto fue un Texture Analyser XT2, una máquina universal de ensayos dotada de un microprocesador para el análisis de textura. Está conectado a un PC y es controlable mediante el programa informático Stable Micro System XT.RA Dimensión, versión 2000. La célula de carga admite una fuerza máxima de 245 N (resolución 0,0098 N y precisión  $\pm 0.025\%$ ), pudiendo trabajar en rango de velocidad entre 0.1 mm/s y 10 mm/s (precisión 0.1%). La interfase de comunicación y control está equipado con una salida analógica de fuerza y distancia (puerto de serie RS232). El programa permite ver los datos en formato gráfico y tratarlos mediante macros para obtener los parámetros deseados.

#### ➤ Punción de los frutos

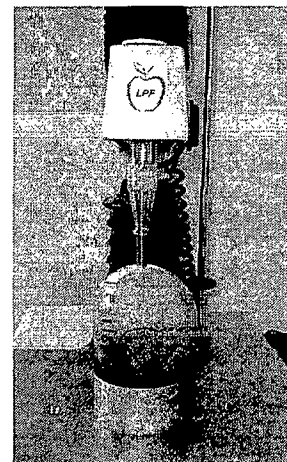
Este método permite medir la fuerza necesaria para pinchar la piel, indicando por tanto la resistencia ( $N/mm^2$ ) de la piel.

El ensayo se realizó usando un vástago en forma de aguja (0,8 mm de diámetro y de base plana) que se aplicó sobre la piel a una velocidad de 20mm/min hasta su rotura, momento en el que la compresión se detiene y la aguja se retira a la misma velocidad. Se realizó una única medida registrándose la fuerza máxima de penetración (PF, N) y ratio fuerza / deformación (PSTE, N/mm).



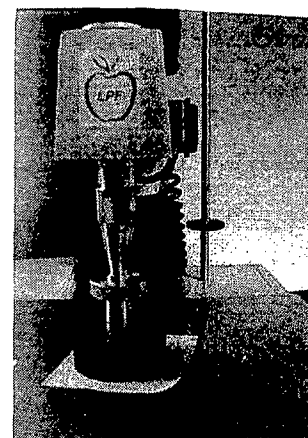
### ➤ **Penetración Magness-Taylor**

Es el método normalizado de determinación de la firmeza. La firmeza de los frutos se establece como la fuerza de penetración necesaria para introducir en la pulpa de los frutos (previa retirada local de la piel) un vástago cilíndrico de 8 mm de diámetro. En este caso, el vástago de cabeza redondeada avanza con una velocidad de penetración de 20 mm/min y se detiene al llegar a 8 mm de deformación, revirtiendo en ese momento el sentido de la marcha. Los parámetros extraídos de este ensayo fueron: fuerza máxima (MF, N), deformación máxima (mm) y ratio fuerza / deformación (MPTE, N/mm).



### ➤ **Carga – descarga en compresión sobre probeta confinada**

Este método permite determinar la deformación a compresión a través del módulo de elasticidad de Young ( $N/mm^2$ ) de la pulpa del fruto, parámetro que se emplea habitualmente como sinónimo de dureza. Para la realización de este ensayo se extrae de la pulpa del fruto una probeta de 17 mm de alto por 17 mm de diámetro mediante un sacabocados cilíndrico aplicado en sentido paralelo al eje de la fruta, perpendicularmente al plano ecuatorial, y en la zona central del mesocarpio. Las probetas se confinan en un disco del mismo diámetro aplicándose una deformación máxima de 2,5 mm a una velocidad de 20 mm/min ( $\Delta l/l = 1/7$ ).



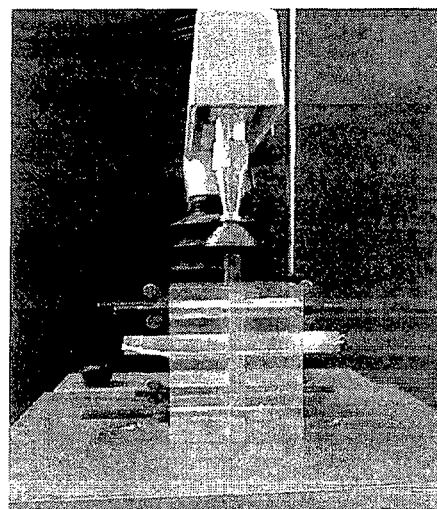
Para evitar el rozamiento con el disco, el vástago utilizado tiene 15 mm de diámetro. Una vez aplicada la deformación indicada, el vástago se retira a la misma velocidad. Se realizó una repetición por fruto y se midieron los siguientes parámetros:

- ✓ Fuerza máxima (CF, N), a 2,5 mm de deformación.
- ✓ Ratio fuerza/deformación (CFD1, N/mm), en la zona elástica de la curva de compresión, esta magnitud será usada como dureza instrumental.
- ✓ Grado de elasticidad, calculado como el porcentaje de deformación elástica o recuperable sobre el total (2,5 mm), esta magnitud será empleada como elasticidad (%).
- ✓ Area de jugo de la mancha acumulada en el papel de filtro colocado debajo de la probeta durante el ensayo de compresión, esta magnitud se usará como jugosidad instrumental ( $cm^2$ ).

### ➤ Rotura de probetas a esfuerzo cortante

La medida de fuerza máxima en este ensayo se denomina crujiencia instrumental (N), al estar esta medida relacionada con la cohesión entre células y la resistencia de las paredes celulares, aspectos ambos correlacionados con la sensación de crujiencia. Para realizar el ensayo se empleó un dispositivo diseñado por (Jarén, Ruiz-Altisent, and Pérez de Rueda 1992) formado por una caja cúbica de metacrilato (8 cm de ancho) con un agujero rectangular en el centro (3 x 8 x 0.8 cm), en el que se coloca una pieza (de 3 x 9 x 0.8 cm).

Tanto el cubo como la pieza rectangular poseen un agujero cilíndrico transversal donde se sitúa una probeta de 20 mm de alto por 14 mm de diámetro extraída de la pulpa del fruto (mediante un sacabocados siguiendo el mismo procedimiento indicado en el apartado anterior), que será cortada por la pieza rectangular al ser presionada por un vástago cilíndrico (3,2 cm de diámetro) de superficie plana. Dos piezas cilíndricas presionan lateralmente la probeta mediante una goma elástica, para mantenerla en la posición central adecuada

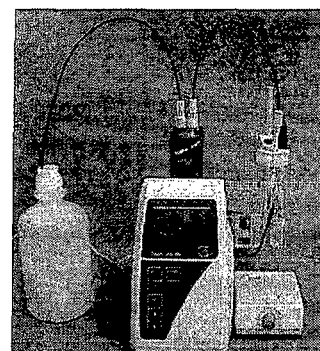


El ensayo consistió en la aplicación de una deformación creciente hasta rotura a una velocidad de 20 mm/min. Se realizó una repetición por fruto y se registró la fuerza máxima o crujiencia instrumental (SF, N).

### 7.3.4. Ácidos

Para evaluar la acidez total valorable de las muestras se extrajo el zumo de los frutos mediante una licuadora, se filtró y se usó para realizar una titulación química con objeto de neutralizar la acidez total presente mediante la adición de una solución 0,1N de NaOH.

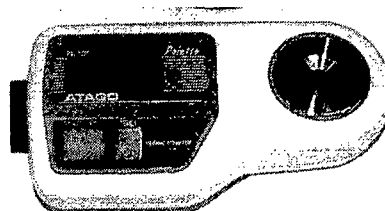
Se empleó un valorador automático Titroline 96 (Schott-Geräte GMBH, Schott Ibérica, Madrid) compuesto por: unidad dosificadora y de control, agitador magnético, barra, trípode, soporte para electrodo y electrodo BlueLine de pH combinado TZ-3096. El punto de viraje indicado era 8,2 que corresponde al de la fenoftaleina. Se calcularon los meq/l de hidróxido sódico utilizados para neutralizar 5 ml de zumo





### 7.3.5. Azúcares

Como indicador del contenido en azúcares de los frutos se usó el índice refractométrico determinado mediante el uso de un refractómetro digital Atago PR-101 (ColeParmer Instruments CO, Hurcoa-Erlöss, Madrid). Con ello se obtuvo el porcentaje de sólidos solubles o grados Brix presentes en el zumo extraído de las muestras y se empleó como sinónimo del contenido en azúcares. Se realizó una única determinación por fruto.



### 7.3.6. Cromatografía de gases

Como complemento a las determinaciones efectuadas en el LPF-UPM en el contexto de AROFRU y ASTEQ se ha dispuesto de dos equipos para la realización de medidas de CG. Dichos equipos y procedimientos se describen a continuación:

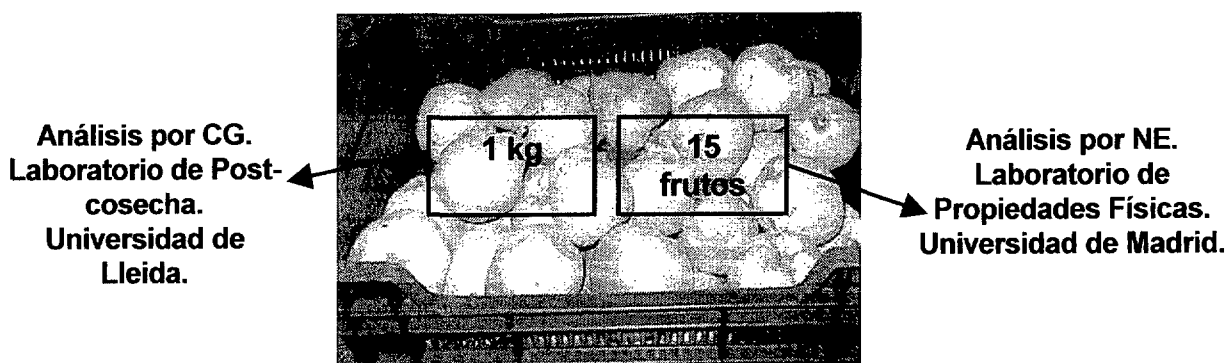
#### 7.3.6.1. IRTA, Lleida

Para los Experimentos IB y IIB las medidas de CG fueron realizadas por el equipo participante con el Laboratorio de Propiedades Físicas (ETSIA, Madrid) en el proyecto nacional CICYT AROFRU (ALI1998-0960-C02-01). Este grupo de la Unidad de Post-cosecha de la Universidad de Lleida dirigido por la profesora M<sup>a</sup> Luisa López, fue el encargado de la recolección de las manzanas y peras de plantaciones comerciales de la zona, de su almacenamiento en las condiciones indicadas para cada tipo de experimento y de su envío a la Escuela de Agrónomos de Madrid.

Cada lote de fruta se dividió en dos muestras duplicadas. Uno de ellos era enviado a Madrid y el otro quedaba en la Unidad de Post-cosecha en Lleida, realizándose simultáneamente en ambas localizaciones los ensayos correspondientes a la NE, en Madrid, y los correspondiente a la CG, en Lleida (ver Figura 7-11). Estas medidas de referencia se realizaron para los Experimentos I y II, con la fruta objeto de estudio dentro del proyecto AROFRU.

#### ➤ Generación y extracción del espacio de cabeza

Para la extracción de compuestos volátiles a partir de frutos intactos (manzanas Fuji y peras Doyenne du Comice) se utilizó el método de espacio de cabeza dinámico descrito por (Kakiuchi et al. 1986) y ampliamente utilizado por el grupo de Lleida en diversas aplicaciones sobre fruta entera (Lavilla et al. 1999; López et al. 2000).



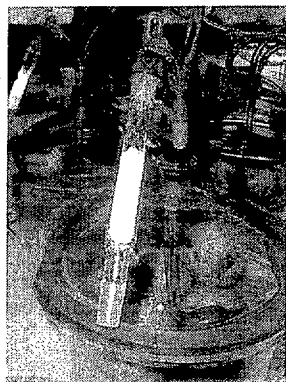
• Figura 7-11: Esquema explicativo de la distribución de la muestra en dos lotes.

La técnica consistió en colocar la muestra constituida por 1 kg de fruta en el interior de un recipiente de cristal Pirex sometiéndola a una corriente continua de nitrógeno (N-50, pureza >99,999%, Air Liquide Barcelona), con un flujo de 50-60 ml/min durante 24 h. El nitrógeno arrastra el espacio de cabeza que la fruta va generando haciendo pasar el fluente a través de una columna de vidrio de 15 cm x 15 cm rellena con 1 g de Tenax-CG de 60-80 mesh (Tecknokroma, Barcelona) (ver Figura 7-12, ❶).

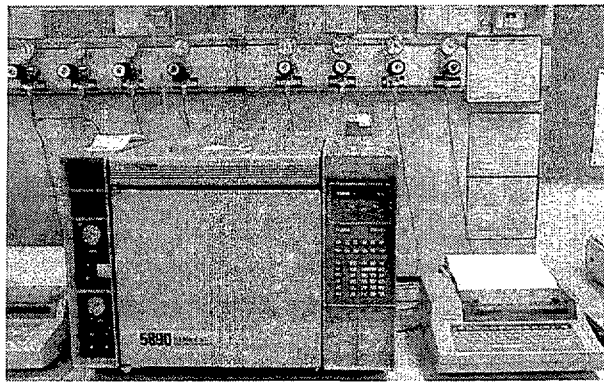
La extracción de los volátiles atrapados en el Tenax, se realizó en una cámara de temperatura regulable (20°C) y en condiciones de oscuridad. Los volátiles se recuperaron del adsorbente con 20 ml de dietil éter (Fluka, ACS>99,8% CG). La fase sólido-éter fue tratada durante 5 min con ondas ultrasónicas y separadas por centrifugación durante 2 min a 1000 rpm y 0°C. Se realizaron dos extracciones posteriores con 20 y 10 ml de dietil éter en las mismas condiciones ya descritas.

Las fases orgánicas obtenidas de las sucesivas extracciones se recogieron conjuntamente y fueron evaporadas por burbujeo de un flujo de 20-30 ml/min de nitrógeno a través de un tubo capilar hasta un volumen de 0,1 ml. A este volumen se le añaden 10 µl de n-hexano con 5% de butil benceno a modo de patrón interno.

❶



❷



• Figura 7-12: Laboratorio de la Unidad de Post-cosecha (Lleida): ❶ Extracción dinámica de espacio de cabeza en pera cv Doyenne du Comice; ❷ Cromatógrafo de gases Hewlett Packard.

### ➤ **Análisis cromatográfico**

La identificación y cuantificación de los compuestos volátiles se realizó en un cromatógrafo de gases Hewlett – Packard 5890 (ver Figura 7-12, ②) con detector FID. La columna OT fue una Crosslinked FFAP (50 m x 0,2 mm x 0,33 μm). El gas portador fue nitrógeno (0,8 ml/min) con una velocidad lineal de 17,4 cm/s con un ratio de separación 1:200. Un volumen de 1 μl se inyectó en todos los ensayos. El análisis se llevó a cabo siguiendo el siguiente programa:

- ✓ T<sup>a</sup> inyector: 240 °C
- ✓ T<sup>a</sup> detector: 240°C
- ✓ Rampa de temperaturas: 70°C durante 1 min, de 70 a 142 °C a 3°C/min, 142 °C durante 2 min, de 142 a 230 °C a 25 °C/min y 230 °C durante 5 min.

Los cuantificación de los compuestos volátiles se realizó por referencia al estándar interno

Un cromatógrafo de gases / espectrómetro de masas fue usado para identificar y confirmar la composición volátil de la muestra. Los análisis se llevaron a cabo usando helio como gas portador con un flujo de 0,6 ml/min y un programa de temperaturas de 40 °C durante 15 min, de 40 a 210 °C a 5°C/min y 210°C durante 15 min. En este caso se utilizaron dos columnas OT: la ya mencionada Crosslinked FFAP y una Carbowax 20M (20m x 0,2 mm x 0,33 μm). Los datos espectrométricos se compararon con la librería original Hewlett-Packard NIST HP59943C. En todos los análisis se inyectó un volumen de 1 μl.

### ➤ **Estimación de la tasa de emisión de volátiles**

Los datos de emisión (*e*) de volátiles por peras cv Doyenne du Comice y manzanas cv Fuji, obtenidos por CG en Laboratorio de Postcosecha del IRTA, se cuantifican en μg/kg<sub>fruta</sub>·h. Para equiparar estas emisiones a las condiciones de generación empleadas en las medidas con la NE, donde se genera un espacio de cabeza con un solo fruto (0.25 kg) en el interior de un recipiente de 0.75 l de volumen (*V*), expresando además esta emisión (*E*) en ppm/h (mg/kg<sub>aire</sub>·h), se emplea la siguiente expresión:

$$E(\text{ppm} / \text{h}) = \frac{e(\mu\text{g} / \text{kg}_{\text{fruta}} \cdot \text{h}) \cdot 0.25(\text{kg}_{\text{fruta}})}{V_{\text{aire}}(\text{l}) \cdot \delta_{\text{aire}}(\text{g} / \text{l})}$$

• Ecuación 7-1: Expresión para la determinación de la emisión de volátiles en ppm, para el caso de un solo fruto

#### 7.3.6.2. **KULeuven, Bélgica**

El análisis cromatográfico fue el objeto principal del Experimento IV en el que no se utilizó la NE. Se llevó a cabo en el Laboratorio de Tecnologías Post-cosecha del Departamento de Agro-

Ingeniería y Economía de la Universidad Católica de Lovaina (Bélgica, agosto de 2001) en el marco del programa europeo ASTEQ. Para realizar este experimento se recurrió a este laboratorio primero por ser un grupo con el que ha existido una estrecha colaboración a lo largo de varios proyectos europeos y en segundo lugar por que en su laboratorio estaba disponible un CG que permite medir directamente muestras en estado gaseoso, no siendo necesario retener en Tenax los aromas, extraer, evaporar, etc..., de forma que la alteración del espacio de cabeza original es mínima, aspecto muy importante en este caso.

#### ➤ **Generación del espacio de cabeza**

El espacio de cabeza se generó colocando aproximadamente 250 ml de muestra en un recipiente de vidrio de 2000 ml de volumen, con tapa también de vidrio sobre la que se han instalado dos bocas roscadas con tapones abiertos de material plástico sellados con juntas de silicona para perforar. Entre bote y tapa se coloca una junta plástica manteniéndose herméticamente cerrados gracias a un apriete metálico con tornillo rosca-chapa.

Tanto la preparación de las muestras como la generación del espacio de cabeza se realizó en cámara de atmósfera controlada a una temperatura de 1°C.

En cuanto al tiempo de generación del espacio de cabeza, se definen dos situaciones: hasta alcanzar el equilibrio en el Experimento IV.A , varios tiempos hasta alcanzar el equilibrio en el Experimento IV. B.

#### ➤ **Extracción del espacio de cabeza**

Se utilizó el sistema de espacio de cabeza estático, junto con la técnica de microextracción de fase sólida (SPME) para tomar la muestra del espacio de cabeza. Se usó una fibra de 1 cm de longitud recubierta con una capa de 65 µm de polidimetilsiloxano y divinilbenceno (SUPELCO® , Bellefonte, USA) para adsorber compuestos polares y no polares respectivamente.

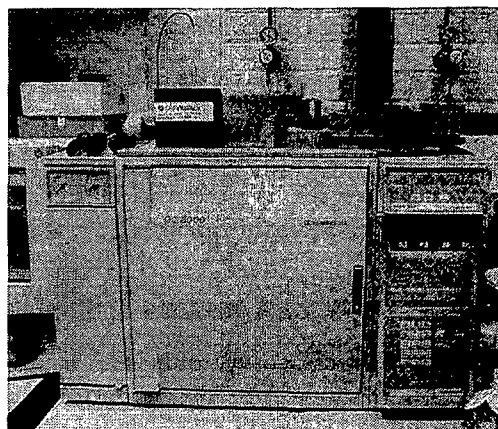
La extracción se realizó perforando los tapones de silicona con la jeringa especial que porta en su interior la fibra que una vez en el interior del recipiente y por deslizamiento quedó expuesta al espacio de cabeza durante un minuto.

#### ➤ **Análisis cromatográfico**

Los volátiles fueron liberados por exposición de la fibra durante 10 s (etanol) o 30 s (1-propanol) a 260°C, en el interior de la camisa de vidrio del puerto de inyección de un cromatógrafo de gases CE-Instruments® modelo GC8000TOP – HWD 800, y separados en una columna capilar marca

Chrompack®, modelo WCOT ULTIMETAL CP-SIMDIST-CB. El programa empleado en el CG para la identificación y cuantificación de los alcoholes a analizar fue el siguiente:

- ✓ T<sup>a</sup> inicial del programa: 35 °C
- ✓ T<sup>a</sup> final del programa: 200 °C
- ✓  $\Delta T^a$  / tiempo: 10°C / min
- ✓ T<sup>a</sup> del detector: 260°C
- ✓ T<sup>a</sup> del puerto de inyección: 260°C
- ✓ Tiempo de desorción de la fibra: 30 s (1-propanol) – 10 s (etanol)



• Figura 7-13: Cromatógrafo de gases CE-Instruments del Laboratorio de Postcosecha de la Universidad de Lovaina

Con este programa, en este equipo el tiempo de retención para el 1-propanol y el etanol fue de 5.2 y 3.8 min respectivamente.

#### 7.4. Resumen de los experimentos realizados

En el siguiente cuadro se presenta un resumen de los experimentos realizados en función de la campaña y del tipo de análisis que se llevó a cabo. La siglas de la tabla refieren al instrumento (NE y/o CG) y al lugar donde tuvieron lugar (UPM, IRTA, KU Leuven).

Experimento	Campaña 99-00	Campaña 00-01
I.A	NE: UPM	---
I.B	NE: UPM + CG: IRTA	---
II.A	NE: UPM	NE: UPM
II.B	NE: UPM + CG: IRTA	NE: UPM + CG: IRTA
II.C		NE: UPM
III.A	---	NE: UPM
III.B	---	NE: UPM
III.C	NE: KU Leuven	---
III.D	NE: KU Leuven	---
IV.A	---	CG: KU Leuven
IV.B	---	CG: KU Leuven

• Tabla 7-7: Cuadro resumen de los experimentos realizados.







## 7.5. Resumen de las medidas realizadas en los Experimentos I y II

En este apartado se aborda la explicación detallada de las medidas realizadas durante los experimentos I y II, los que por la cantidad de muestras analizadas y técnicas aplicadas resultan más complejos.

### ➤ Experimentos sobre fruta

Los experimentos realizados con fruta como ya se ha indicado fueron: Experimento I.B, Experimento II.B (1ª y 2ª campaña). y Experimento II.C. Los lotes de fruta utilizados fueron para todos los factores considerados de 15 frutos.

Los frutos eran numerados del 1 al 15 de forma que las piezas 11, 12, 13, 14 y 15 de cada lote eran reservadas y utilizadas para ser medidas con la NE a lo largo de los tres tiempos de vida en estantería (VE) considerados, haciéndose por tanto un seguimiento de su evolución a lo largo del tiempo. Los frutos del 1 al 5 eran utilizados para realizar las medidas de referencia el día siguiente de la salida de la fruta de la cámara de almacenamiento, los frutos 6, 7, 8, 9, y 10 se ensayaron destructivamente en el segundo tiempo de VE y en el tercer tiempo fueron los frutos del 11 al 15 los que una vez analizados con la NE, eran ensayados destructivamente para obtener las medidas de referencia.

Frutos	1 - 5	6 - 10	11 - 15
<b>Día 1</b>	 <b>Ensayos destructivos</b>		 <b>NE</b>
<b>Día 4</b>		 <b>Ensayos destructivos</b>	 <b>NE</b>
<b>Día 7</b>			 <b>NE + Ensayos destructivos</b>

• Figura 7-14: Esquema explicativo, para un lote de 15 frutos de peras cv Doyenne du Comice, de la distribución de ensayos destructivos y no destructivos a lo largo de tres tiempos de VE.

En estos experimentos se realizaron dos grandes grupos de ensayos: no destructivos (peso, color y NE) y destructivos (firmeza y textura, y análisis químicos), el número de frutos y medidas para cada uno de estos ensayos se indican en la siguiente tabla:

TA meses	NºF	Ensayos no Destructivos				Ensayos Destructivos					Medidas
		Peso	Color	NE	P	Textura		Químicos			
						MT	CC	EC	Ac.	Az.	
<b>EXPERIMENTO IB: Doyenne du Comice (99-00)</b>											
<b>R</b>	15	30	60	15	15	15	15	15	15	15	<b>195</b>
<b>6</b>	60	120	240	60	60	60	60	60	60	60	<b>780</b>
<b>8</b>	60	120	240	60	60	60	60	60	60	60	<b>780</b>
<b>9</b>	45	90	180	45	45	45	45	45	45	45	<b>585</b>
<b>Total</b>	<b>180</b>	<b>360</b>	<b>720</b>	<b>180</b>	<b>180</b>	<b>180</b>	<b>180</b>	<b>180</b>	<b>180</b>	<b>180</b>	<b>2340</b>
<b>EXPERIMENTO IIB: Fuji (99-00)</b>											
<b>R</b>	30	60	120	30	30	30	30	30	30	30	<b>390</b>
<b>5</b>	120	240	480	120	120	120	120	120	120	120	<b>1560</b>
<b>7</b>	90	180	360	90	90	90	90	90	90	90	<b>1170</b>
<b>Total</b>	<b>240</b>	<b>480</b>	<b>960</b>	<b>240</b>	<b>240</b>	<b>240</b>	<b>240</b>	<b>240</b>	<b>240</b>	<b>240</b>	<b>3120</b>
<b>EXPERIMENTO IIB - IIC: Fuji (00-01)</b>											
<b>3</b>	120	240	480	122	120	120	120	120	120	120	<b>1562</b>
<b>5</b>	120	240	480	122	120	120	120	120	120	120	<b>1562</b>
<b>7</b>	120	240	480	122	120	120	120	120	120	120	<b>1562</b>
<b>Total</b>	<b>360</b>	<b>720</b>	<b>1440</b>	<b>366</b>	<b>360</b>	<b>360</b>	<b>360</b>	<b>360</b>	<b>360</b>	<b>360</b>	<b>4686</b>

• Tabla 7-8: Número de frutos (NºF) utilizados y medidas realizadas en cada uno de los ensayos para cada uno de los tiempos de almacenamiento (TA) y la recolección ®.

### ➤ Experimentos sobre la referencia 1-propanol

Los experimentos sobre la referencia fueron: Experimento I.A, Experimento II.A (1ª y 2ª campaña) y Experimento II.C En todos los casos se tomó una única medida con la NE al final de cada día de ensayo tras aproximadamente 10 horas de funcionamiento del equipo en cada sesión.

Experimento Campaña	Experimento			Total	Total horas acumuladas de uso de NE
	I.A	IIA 1ª campaña	IIA 2ª campaña		
<b>1999-2000</b>	21	20	---	41	410
<b>2000-2001</b>	---	---	18	18	180

• Tabla 7-9: Número de medidas realizadas sobre el 1-propanol con la NE y número de horas acumuladas de trabajo del equipo al final de cada campaña.

## **7.6. Metodología del análisis de datos**

El análisis de datos se ha realizado con la ayuda del paquete estadístico Statistica™ versión 5.5'99 (StatSoft, USA) para Windows®. El procedimiento seguido en el análisis de datos consta de las siguientes fases:

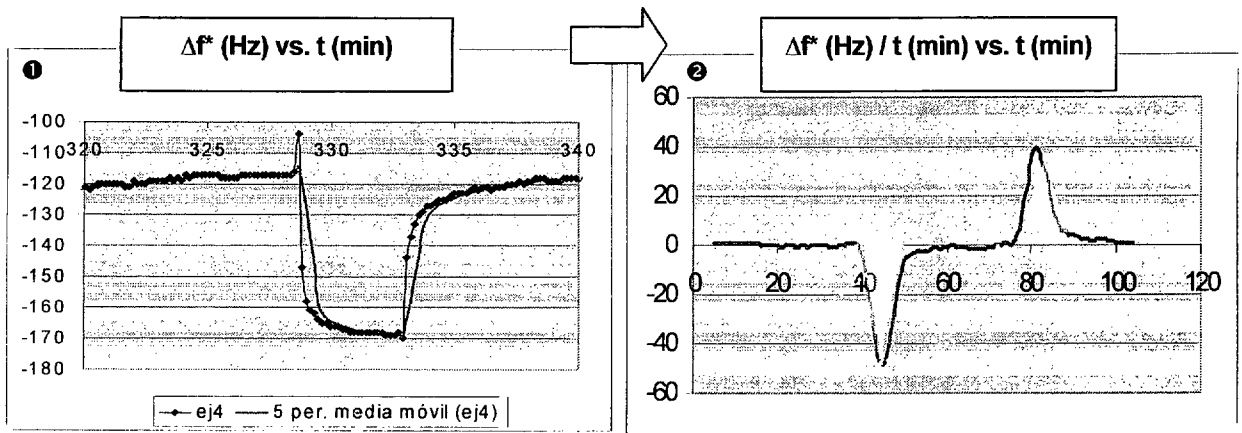
### **7.6.1. Obtención de la variable $\Delta f$ (Hz) de la NE**

Para poder manejar con fluidez los datos generados por la NE y crear las matrices de datos rápidamente se creó un programa utilizando MATLAB, con el que se pretendía extraer rápidamente la variable de interés  $\Delta f$ .

La matriz de datos original, en formato de archivo de texto se caracteriza por presentar nueve columnas (columna (c) 1 = tiempo (s), de c2 a c9 = frecuencia de oscilación ( $\Delta f^*$ (Hz)) de cada uno de los ocho sensores), y n filas en función del tiempo (t) de funcionamiento del equipo, teniendo en cuenta que la NE registra la frecuencia de oscilación de cada sensor cada 12.5 s (así para 1 hora de funcionamiento de la NE tendríamos 288 filas). En esta matriz no hay ninguna indicación de en que momento se produce la inyección de cada muestra ni del inicio de la limpieza de la cámara de los sensores.

El programa de MATLAB primero realiza un suavizado de la señal original para eliminar los valores de  $\Delta f^*$  anómalos y fuera de rango, el suavizado se realiza calculando la media móvil de 5 puntos (ver Figura 7-15 ①). Una vez realizado el suavizado se calcula la pendiente (pdte) de la curva de frecuencia correspondiente a cada sensor a lo largo del tiempo. En condiciones de reposo la frecuencia de oscilación de los sensores no cambia, con lo que la pdte obtenida es igual a cero. Cuando las moléculas de la muestra gaseosa se adsorben sobre el sensor su frecuencia de oscilación disminuye obteniéndose una pdte negativa. Una vez estabilizada la señal del sensor durante la medida (de nuevo pdte=0) se inyecta el gas portador para la limpieza del sensor, el cual va aumentando su frecuencia de oscilación (pdte positiva = desorción) hasta alcanzar el nivel base de frecuencia de oscilación (se recupera pdte=0). El programa de MATLAB busca los cambios de pdte, localizando el punto de inyección de la muestra por el cambio de pdte 0 a pdte negativa, siendo el tiempo de duración de la medida ( $t_d$ ) el tiempo comprendido entre el cambio a pdte negativa y el cambio a pdte positiva consecutivos (ver Figura 7-15 ②). La integral de la curva correspondiente a los picos de las pdtes negativas permite la caracterización completa de la medida conociendo así el momento en el que se realizó, su duración y la cuantía de  $\Delta f$ , mientras que la integración de los picos positivos de la curva nos da información completa sobre la recuperación de la señal.





• Figura 7-15: Esquema explicativo del sistema de trabajo del programa de MATLAB creado para la obtención automática de la variable  $\Delta f$  para la curva correspondiente a un sensor.

### 7.6.2. Preprocesado de datos y corrección de la señal de la NE

Según se ha ido explicando en diversos puntos de esta tesis las derivas que sufre la señal de los sensores debido a la presencia de diversas fuentes de variación tanto externas como propias del equipo exigen la realización de distintos tipos de calibración para su eliminación. Las características de las calibraciones aplicadas se indicarán a lo largo del punto 8, pero básicamente serán de dos tipos: corrección aditiva (entre secuencias) y corrección multiplicativa (dentro de cada secuencia). Las correcciones se basan en el uso de una referencia calculándose el cambio, relativo o absoluto, en la respuesta hacia la referencia para todos los sensores actualizando la matriz de datos (X), sensor a sensor usando el factor de corrección obtenido.

Para obtener la señal del sensor corregida ( $X_{B,c}$ ), se suma (ver Figura 7-16 ❶) o multiplica (ver Figura 7-16 ❷) a la señal original ( $X_B$ ), el incremento o ratio respectivamente, de la señal del sensor B hacia la referencia ( $X_{ref,B}$ ) con respecto a la señal tomada como válida ( $X_{ref,B}^*$ ).

❶

$$X_{B,c} = X_B + (X_{ref,B} - X_{ref,B}^*)$$

❷

$$X_{B,c} = X_B \cdot (X_{ref,B} / X_{ref,B}^*)$$

• Figura 7-16: Corrección aditiva ❶, y corrección multiplicativa ❷ de la deriva de los sensores.

Cuando todas las fuentes de variación son conocidas y controladas resultan innecesarias este tipo de correcciones, tratándose de una situación muy ventajosa y siempre deseable.

### 7.6.3. Análisis previo

Para la realización del estudio de los datos se procedió a un análisis de varianza con el que se pretendía observar la influencia de los distintos factores experimentales en los parámetros estudiados. Para este análisis se utilizó el subprograma “General ANOVA/MANOVA”.

La finalidad de un análisis de varianza es la de evaluar la existencia de diferencias significativas entre lotes (15 frutos/lote), para ello se utiliza la comparación de varianzas haciendo una partición de la varianza total en la componente debida al error y las componentes debidas a los distintos factores e interacciones de los mismos. Sobre la base del ANOVA se realiza un test de significación. Si el resultado es no significativo indica que no existen diferencias entre medias debidas a ese factor o interacción. Si el resultado es significativo el valor de F indica la relación entre la varianza debida al factor y la varianza debida al error. Cuanto mayor es el valor de F de un factor experimental para una variable mayor es la relevancia de dicho factor en relación al error (varianza no acotada en el experimento).

#### **7.6.4. Exploración multidimensional de los datos**

Las principales características de las técnicas de análisis multidimensional, como es el caso del ACP, que recomiendan elegir esta técnica para la búsqueda de relaciones entre ensayos, son:

- ✓ la posibilidad de reducción del número de variables con objeto de separar un elevado volumen de interacciones,
- ✓ la capacidad de detección de la estructura de las relaciones entre variables, es decir, agrupándolas en unidades que proporcionen igual o redundante información sobre las muestras estudiadas.

El ACP se realizó mediante análisis factorial con el submenú "Factor Análisis" del programa estadístico ya citado Statistica, cuyas características fueron ya explicadas en el apartado 4.5.4.

Para observar rápida y fácilmente los resultados se representarán utilizando las gráficas de los círculos de correlación, representándose como una circunferencia de radio igual a uno, centrada en el origen, que representa la máxima correlación entre variables, de esta manera:

- ✓ una variable estará muy correlacionada con otra cuando se sitúe próxima a ella en este plano a la vez que próxima al borde del círculo, y
- ✓ una variable estará muy correlacionada con un componente principal cuando se sitúe cerca de los puntos en los que el eje asociado a dicho componente corta a la circunferencia, y
- ✓ las variables situadas lejos del borde de la circunferencia no muestran tendencias concluyentes en la representación dada.

#### **7.6.5. Procedimiento de identificación de lotes e individuos**

La finalidad era discriminar entre categorías usando las variables no destructivas correspondientes a la señal de los sensores de la NE.

Al estudiar los antecedentes y la bibliografía se observó que muchos grupos de investigación utilizaban las redes neuronales como técnica a aplicar en el análisis de los datos obtenidos a partir de una NE, sin embargo al empezar a utilizar el equipo se observó que los datos que se obtenían al analizar el espacio de cabeza generado por un único fruto, eran datos en general de mala calidad debido:

- ✓ a la falta de reproducibilidad y estabilidad de la señal de los sensores que exige la aplicación de calibraciones tal y como se ha explicado en apartados anteriores, y
- ✓ fundamentalmente a la baja concentración del espacio de cabeza generado por un único fruto en condiciones de temperatura ambiente que hace que la señal detectada por los sensores sea especialmente baja, y por otro lado a la gran variabilidad entre frutos pertenecientes a un mismo lote que genera una desviación típica intra-grupo muy elevada.

Estos dos efectos hace que en este caso concreto en el que se analiza fruta, producto no estandarizado en contra de muestras de vino, café...y otros ejemplos estudiados en la bibliografía, y en el que además los frutos elegidos, manzanas y peras, se caracterizan por ser poco aromáticos, hace que el análisis de los datos sea una tarea complicada y sutil, que no se adapta bien al empleo de redes neuronales.

La red neuronal no es un sistema de análisis estadístico, lo que caracteriza a las redes neuronales es el aprendizaje mediante ejemplos, en el que el modo interno de funcionamiento son modelos matemáticos multivariantes que utilizan procedimientos iterativos.

La mala calidad de nuestros datos hace que los modelos sean muy parecidos de forma que la diferenciación entre lotes que han sido sometidos a distintas condiciones de almacenamiento es muy mala ya que se producen numerosos errores de clasificación.

El análisis estadístico de los datos utilizando técnicas tradicionales de análisis tales como ACP permite un mayor control de los datos, detectar más fácilmente los elementos “out layer” y disminuir los errores de clasificación.

Por estas razones se decidió realizar una primera aproximación al análisis de datos mediante ACP que al igual que en el caso anterior se realizó mediante análisis factorial con el submenú “Factor Analisis”, pero calculándose en este caso los “Factor scores” es decir el valor de cada medida según las nuevas variables definidas que son cada uno de los Componentes Principales. Para observar rápida y fácilmente los resultados se representará en este caso un gráfico en el que los ejes son los dos CP definidos y los valores representados los correspondientes a cada individuo “Proyección de los individuos”, lo que permite observar la diferenciación entre categorías en forma de agrupaciones de los individuos.

# **Resultados y discusión**

---

## 8. Resultados y discusión

En este apartado se va a abordar la presentación y discusión de los resultados obtenidos del análisis de los Experimentos realizados. Se presenta en primer lugar una discusión sobre las fuentes de variación que afectan al funcionamiento de los sensores y a la obtención del espacio de cabeza, así como las medidas correctoras propuestas para su atenuación. En segundo lugar se presenta el estudio metrológico realizado sobre los parámetros que caracterizan el funcionamiento de los sensores de la NE. Y por último se pueden observar los resultados obtenidos del análisis de la fruta con la NE.

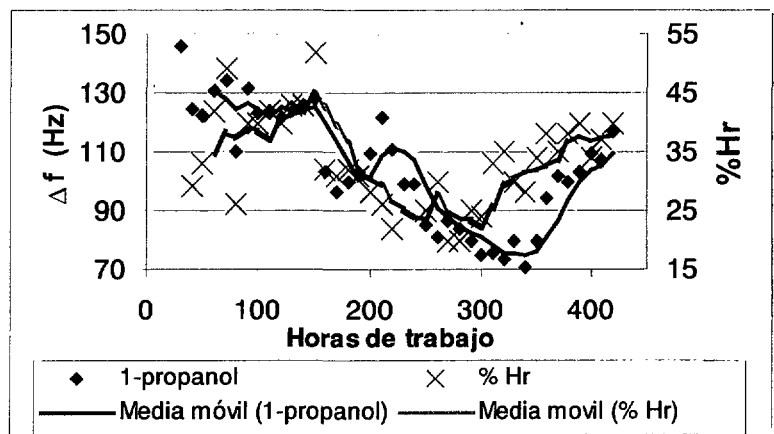
### 8.1. Perturbaciones que afectan a la respuesta de los sensores de la NE

#### 8.1.1. Identificación y eliminación de fuentes de variación no deseadas durante la campaña 99-00

##### 8.1.1.1. Humedad relativa ambiente

La Figura 8-1 en la que se compara la señal de respuesta media de los sensores hacia el 1-propanol con el porcentaje de humedad relativa (Hr) del ambiente de cada día de trabajo, representa los resultados obtenidos en los Experimentos I.A y II.A 1ª campaña.

Se observa que a pesar de utilizar los cartuchos desecadores de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , existe un ciclo de variación en el nivel de respuesta de los sensores que está correlacionado (coeficiente de correlación,  $r = 0.66$ ) con los cambios de la Hr del aire ambiente empleado como gas portador, afectando a la reproducibilidad de las medidas entre días de ensayo.



• Figura 8-1: Respuesta media diaria de todos los sensores hacia el 1-propanol vs. Valor diario de Hr(%)

La sensibilidad de este tipo de sensores al vapor de agua presente en el aire es conocida y ha sido descrita como uno de sus principales inconvenientes por diversos autores como (Sarig 2000), (Mielle 1996) o (Di Natale 1999).

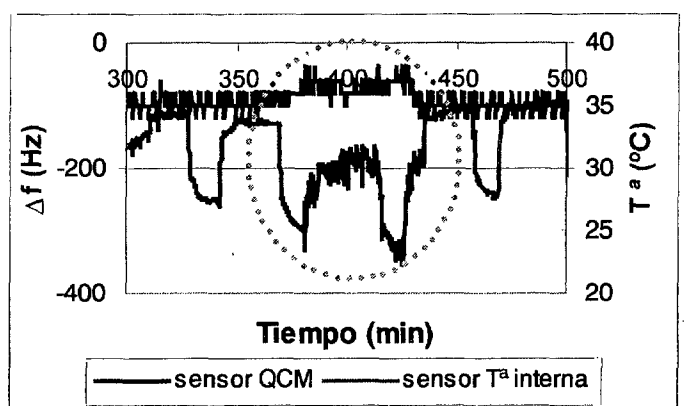
Una vez que se ha demostrado que la Hr del ambiente influye en la respuesta de los sensores se considerará que aquellos valores de Hr ambiental que se encuentren fuera del rango normal de

oscilación de la Hr en Madrid ( $Hr_{julio}=39\%$ ,  $Hr_{diciembre}=74\%$ , datos medios del periodo 1971-2000 obtenidos en la estación meteorológica "Retiro" en Madrid) darán lugar a valores anómalos en la respuesta de los sensores.

### 8.1.1.2. Temperatura ambiente y temperatura interna de la cámara de medida

Realizando la misma comparación que en el apartado anterior, pero con respecto a la temperatura externa, se obtiene que esta no afecta a la respuesta de los sensores ( $r = 0.2$ ), esto se debe a que la temperatura realmente influyente en esa respuesta es la temperatura interna de trabajo (TIT) de los sensores.

Como se observa en la Figura 8-2, cuando la TIT asciende por encima de los  $37^{\circ}\text{C}$  se produce una clara inestabilidad en la señal de los sensores a lo largo de una secuencia de medidas. Siendo por tanto fundamental el adecuado funcionamiento de los sistemas internos de control de  $T^a$  de la NE.



• Figura 8-2: Evolución a lo largo de un día de trabajo de la señal de un sensor QCM vs. las variaciones de temperatura interna de trabajo de la nariz electrónica

### 8.1.2. Eliminación del efecto de la humedad relativa del gas portador en Experimentos I.B y II.B 1ª campaña

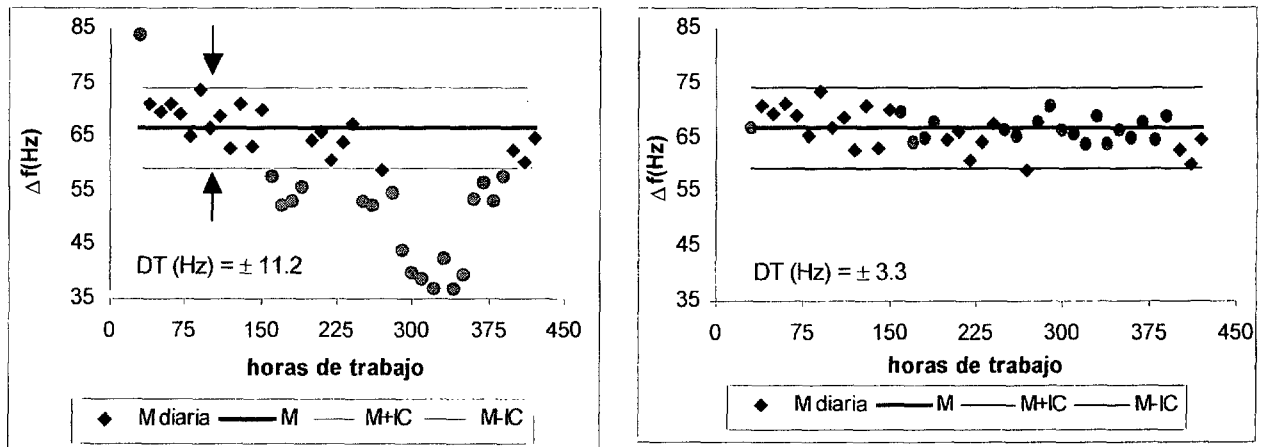
#### 8.1.2.1. Mediante corrección aditiva de los datos respecto del 1-propanol

La existencia de falta de reproducibilidad entre secuencias o días de ensayo ( efecto de la Hr) y dentro de cada secuencia o día de ensayo (efecto de la  $T^a$  interna) obliga a realizar una serie de calibraciones o correcciones de la señal de los sensores.

Al no haber considerado ninguna referencia interna que nos permita seguir la evolución de la señal de los sensores dentro de una secuencia de ensayos no se puede realizar en la campaña 99-00 ningún tipo de corrección en este sentido. Al contrario, el uso de la referencia 1-propanol permite plantear una corrección de la deriva de los sensores entre días de ensayos.

Como se observa en la Figura 8-3, los datos correspondientes a la media (M) de la respuesta diaria de todos los sensores hacia el 1-propanol (Experimento I.A y Experimento II.A 1ª campaña) presentan una baja reproducibilidad, estimada ésta como la desviación típica (DT) de las medidas.

Aplicando una corrección aditiva sobre aquellos valores que se encuentran por encima y por debajo del intervalo de confianza (IC) definido por las medidas tomadas en un rango de Hr superior al 25%, se produce una mejora clara de la reproducibilidad pasando ésta de  $\pm 11.2$  a  $\pm 3.3$  Hz. (Figura 8-4).



• Figura 8-3: Datos no corregidos de la respuesta media diaria de todos los sensores hacia el 1-propanol.

• Figura 8-4: Datos después de aplicar la corrección aditiva.

El mismo nivel de recolección (NC) aplicado sobre los datos correspondientes al 1-propanol se aplicará sobre los datos obtenidos en las determinaciones sobre fruta.

### 8.1.2.2. Mediante el uso de aire sintético seco

Con el objetivo de eliminar en la realización de los experimentos el efecto de la Hr y otras posibles fuentes de variación todavía no identificadas, se decide usar un gas portador absolutamente estandarizado y seco, sustituyendo en la realización de los experimentos posteriores (campaña 00-01) el aire ambiente desecado a través de un cartucho de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , por aire sintético seco contenido en el interior de bolsas inertes de Teflón.

Si se comparan las medidas realizadas con el Lote 2 de sensores sobre el 1-propanol usando los dos gases portadores durante el mismo día de ensayo (a lo largo de 14 días), se observa que (ver Tabla 8-1):

- ✓ la precisión, evaluada a través de la desviación típica (DT) de las medidas, es un 33% mayor al utilizar aire sintético seco que al utilizar aire ambiente.

- ✓ la repetibilidad o estabilidad, evaluada a través de su coeficiente de variación  $CV(\%) = \frac{STD}{x} \cdot 100$ , es un 35% mayor al utilizar aire sintético seco que al utilizar aire ambiente.

		S7	S2	S3	S4	S5A	S5B	S1	S8	Media
<b>DT<sub>n=14</sub></b>	$\text{Cl}_2\text{Ca}$	92,6	149,2	50,7	36,9	81,7	74,9	77,4	35,5	<b>74,8</b>

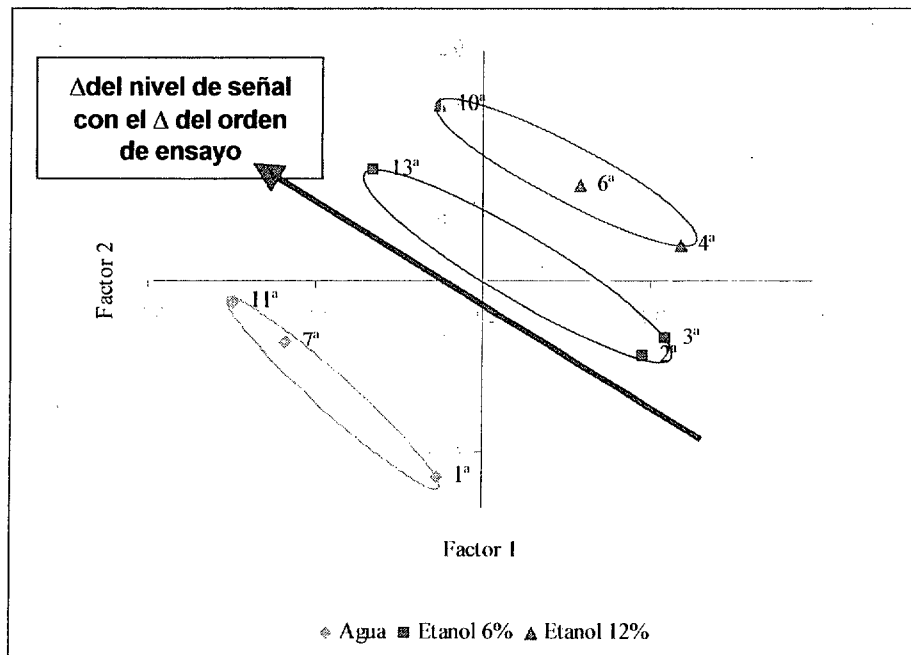
		S7	S2	S3	S4	S5A	S5B	S1	S8	Media
(±Hz)	Aire sintético	73,2	100,9	16,3	17,1	42,9	56,1	71,0	22,0	49,9
CV <sub>n=14</sub>	Cl <sub>2</sub> Ca	22,3	21,8	53,2	30,6	27,5	17,5	28,9	32,1	29,2
(%)	Aire sintético	17,2	14,9	25,6	15,8	17,2	13,4	25,8	23,2	19,1

• Tabla 8-1: Comparación de la respuesta media de los sensores hacia el 1-propanol, mediante la DT y CV, usando aire ambiente desecado con Cl<sub>2</sub>Ca o aire sintético seco.

### 8.1.3. Identificación de fuentes de variación, adicionales, no deseadas, en la campaña 00-01.

#### 8.1.3.1. Efecto del tiempo de funcionamiento del equipo sobre productos químicos puros

Se presenta el resultado del análisis del Experimento III.A, en el que se ensayaron tres muestras, agua destilada, etanol 6% v/v y etanol 12% v/v. Se observa que ha medida que aumenta el tiempo de trabajo del equipo, bien debido a un incremento de la TIT de los sensores o a otro efecto no identificado, la señal registrada para una misma muestra aumentaba para órdenes de ensayo superior (ver Figura 8-5).

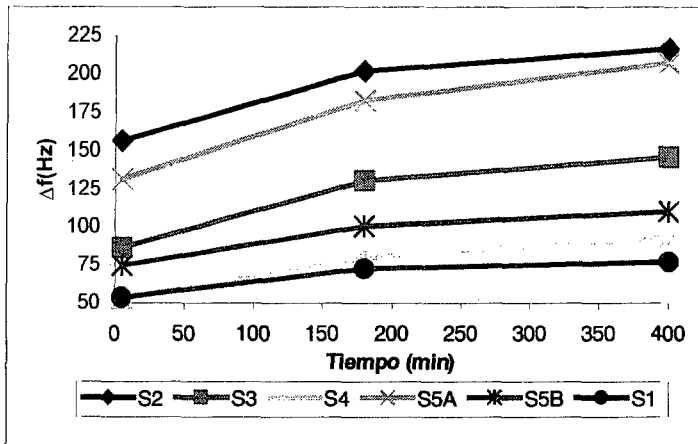


• Figura 8-5: Proyección de los individuos en un ACP para tres muestras puras de agua y etanol con indicación del orden en el que fueron medidas a lo largo del día de ensayo.



### 8.1.3.2. Efecto del tiempo de funcionamiento de equipo sobre fruta, manzanas cv Fuji

La Figura 8-6 muestra el resultado obtenido del Experimento II.C para un TA de 3 meses, indicando que existe un incremento de la respuesta media de todos los sensores desde el comienzo de la secuencia (0 min), a lo largo del tiempo (180 min) hasta alcanzar su máximo valor al final del día de trabajo (400 min). Resultado que se repite a lo largo de los tres tiempos de almacenamiento (3, 5 y 7 meses) considerados en este experimento.



• Figura 8-6: Evolución media (n=6) del  $\Delta f$  para algunos sensores, con respecto al tiempo, para un mismo fruto y día de trabajo, para el TA de 3 meses durante la campaña 00-01.

En la Figura 8-6 cada punto de la gráfica es la media de 6 repeticiones y muestra que el incremento de la respuesta no es homogénea desde 0 a 400 minutos, sino que es posible diferenciar periodos de deriva diferentes. Así la deriva ( $d$ ) se estima según las siguientes ecuaciones:

$$d_{0-400}(\text{Hz}/\text{min}) = \frac{\Delta f_{400} - \Delta f_0}{400}; \quad d_{0-180}(\text{Hz}/\text{min}) = \frac{\Delta f_{180} - \Delta f_0}{180}; \quad d_{180-400}(\text{Hz}/\text{min}) = \frac{\Delta f_{400} - \Delta f_{180}}{220}.$$

• Ecuación 8-1: Expresiones explicativas del cálculo de la deriva según los distintos tramos definidos

### 8.1.4. Eliminación de fuentes de variación no deseadas en Experimento II.B.2ª campaña

Los datos serán sometidos a dos tipos de correcciones consecutivas: en primer lugar una corrección aditiva con respecto del 1-propanol para eliminar la deriva entre días de trabajo, y en segundo lugar una corrección multiplicativa para eliminar la deriva dentro de cada día de trabajo con respecto al fruto utilizado como referencia interna.

#### 8.1.4.1. Corrección aditiva entre secuencias

A pesar del uso de aire sintético seco como gas portador para la realización de este experimento y aunque la correlación que existía cuando se usaba aire desecado con  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , con la Hr del ambiente, ahora ha desaparecido ( $r_{\text{aire sintético vs Hr}} = -0.12$ ), distintas fuentes de variación no

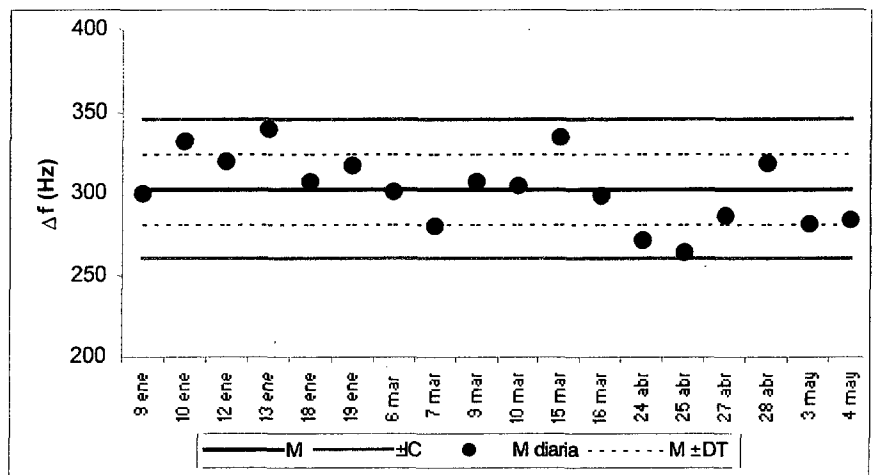
identificadas afectan a la reproducibilidad de las medidas. Así el elevado nivel de variabilidad hace recomendable el uso del 1-propanol como producto de calibración entre días.

La aplicación de esta corrección durante la campaña 00-01 difiere a la que se aplica durante la campaña 99-00, en que mientras esta última utiliza los valores absolutos de las diferencias en la primera se utilizarán valores relativos. Esto se debe al cambio sufrido en la sensibilidad de los sensores al sustituir el Lote 1 de sensores por el Lote 2.

Durante la campaña 99-00 con el Lote 1 de sensores el nivel medio de señal para el 1-propanol (66.4 Hz) era muy similar al nivel medio de señal para la fruta (51.3 Hz para cv Doyenne du Comice, 40.3 Hz para cv Fuji), razón por la que se aplica el valor absoluto del factor de corrección.

Durante la campaña 00-01 con el Lote 2 de sensores el nivel medio de señal para el 1-propanol (302.6 Hz) es muy superior al nivel medio de señal para manzanas cv Fuji (120.5 Hz), de forma que si se aplica la corrección absoluta se elimina en la señal de los sensores, la variabilidad que precisamente es objeto de análisis, de ahí que se aplique una corrección relativa en función del nivel de señal medio de los sensores hacia la fruta.

El mayor control de las condiciones de ejecución del experimento, y medioambientales del laboratorio, junto con el incremento drástico de la sensibilidad de los sensores del Lote 2, conduce a una disminución del 10% en



• Figura 8-7: Datos antes de aplicar una corrección aditiva sobre la respuesta media diaria de todos los sensores hacia el 1-propanol.

la variabilidad de los datos para la referencia en la campaña 00-01 (CV=7%) con respecto a la campaña 99-00 (CV= 17%).

Este hecho hace que la M diaria de la respuesta de los sensores hacia la referencia ( $M_p^{diaria}$ ) se encuentre dentro del IC del 95% para la media muestral que se ha definido (ver Figura 8-7). Sin embargo para disminuir en mayor medida la variabilidad de los datos se propone aplicar una corrección más drástica a la efectuada durante la campaña 99-00, llevando todos los datos a la media ( $M_p$ ) según una diferencia que se corresponde con el factor de corrección absoluto ( $F_{abs}$ ), actuación que se verá diluida por el hecho de que se aplicará sobre los datos correspondientes a la fruta ( $f$ ) un factor de corrección relativo ( $F_{rel}$ ).

$$\begin{array}{cccc}
 \textcircled{1} & & \textcircled{2} & & \textcircled{3} & & \textcircled{4} \\
 F_{abs} = M_p - M_p^{diaria} & & F_{rel} = \frac{M_p - M_p^{diaria}}{M_p^{diaria}} & & NC_{diario} = F_{rel} \cdot M_f^{diaria} & & X_{diaria}^c = X_{diaria} + NC_{diario}
 \end{array}$$

• Ecuación 8-2: Expresiones explicativas de los pasos seguidos para realizar la corrección aditiva sobre los datos correspondientes al cv Fuji durante la campaña 00-01

Según se ha definido el  $F_{rel}$  éste tendrá un valor distinto para cada día de trabajo, así la matriz de datos corregida ( $X_{diaria}^c$ ) para cada día de trabajo se obtendrá sumándole a la matriz de datos original ( $X_{diaria}$ ) el NC correspondiente a un día de ensayos concreto.

	Enero						Marzo						abril				Mayo	
día	9	10	12	13	18	19	6	7	9	10	15	16	24	25	27	28	3	4
$F_{rel}\%$	1,1	-8,8	-5,3	-10,8	-1,5	-4,7	0,5	7,8	-1,5	-0,6	-9,6	1,2	11,5	14,4	5,7	-4,9	7,4	6,8

• Tabla 8-2: Factor de corrección en forma de porcentaje, utilizado para cada día de ensayo

#### 8.1.4.2. Corrección multiplicativa dentro de cada secuencia

Para estar seguros de que las derivas (ver Ecuación 8-1) identificadas dentro de cada tiempo de almacenamiento son estadísticamente significativas es preciso aplicar un análisis en los siguientes pasos:

- ✓ **primer paso:** estimar si la deriva total a lo largo del tiempo es significativamente diferente de la condición de no deriva. Se calcula para ello la expresión  $d_{0-400} - 1.96 ET$ , si esta diferencia es positiva, la deriva total será significativamente diferente de la horizontal (h) y por tanto es necesario aplicar una corrección,
- ✓ **segundo paso:** comparar mediante análisis de varianza la deriva en el primer tramo ( $d_{0-180}$ ) frente a la deriva en el segundo tramo ( $d_{180-400}$ ), de forma que cuando el valor p esté por debajo de 0.05 ambas derivas serán significativamente diferentes entre sí y por tanto habrá que aplicar a cada periodo una corrección distinta, y
- ✓ **tercer paso:** comparar cada una de las derivas parciales ( $d_{0-180}$  y  $d_{180-400}$ ) con respecto a la situación de no deriva como se mencionó en el paso 1.

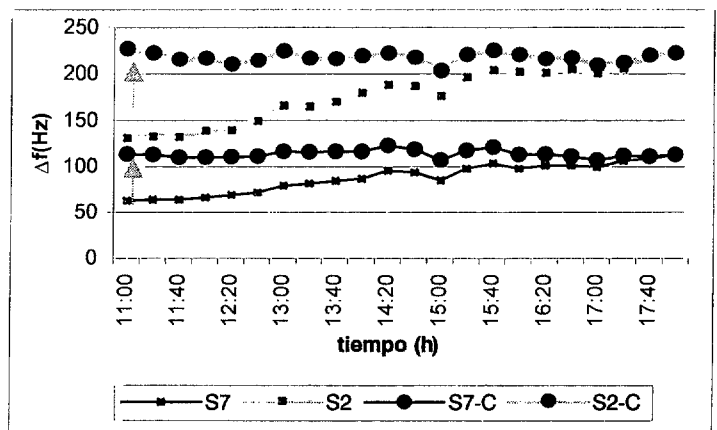
Para cada tiempo de almacenamiento se calcula la deriva media (n=6 días) dentro de una secuencia de ensayos sensor a sensor, estimándose según el análisis anterior que sensores y que tramos deben ser corregidos (ver Tabla 8-3).

		1° paso	2° paso	3° paso	
		Pdte total vs h. De 0 a 400 min	1°pdte vs. 2°pdte	1° pdte vs h. de 0 a 180 min	2° pdte vs. h. de 180 a 400 min
<b>Tres meses de TA</b>					
TEST	M - 1.96 ET	$S_{1-8} > 0$	--	$S_{1-8} > 0$	$S_{1-8} \leq 0$
	ANOVA	--	$S_{1-8}, p < 0.05$	--	--
	Diferencia significativa	<b>SI</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>	<b>NO</b>
<b>Cinco meses de TA</b>					
TEST	M - 1.96 ET	$S_{1-8} > 0$	--	$S_{1-8} > 0$	$S_{1-3} \leq 0$ $S_{4-8} > 0$
	ANOVA	--	$S_{1-8}, p < 0.05$	--	--   --
	Diferencia significativa	<b>SI</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>	<b>NO</b> <b>SI</b>
<b>Siete meses de TA</b>					
TEST	M - 1.96 ET	$S_{1-8} > 0$	--	$S_{2,5A} > 0$	$S_{2,5A} > 0$
	ANOVA	--	$S_{2,5A}$ $S_{1,3-8}$ $p < 0.05$ $p > 0.05$	--	--
	Diferencia significativa	<b>SI</b>	<b>SI</b> <b>NO</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>

• Tabla 8-3: Cuadro explicativo de las características de la corrección multiplicativa aplicada en cada TA

Del estudio de la Tabla 8-3 se extrae que la corrección multiplicativa de la deriva es necesaria en todos los TA y para todos los sensores de la NE, al ser la deriva total significativamente diferente de la horizontal. Se puede distinguir además, en la mayoría de los casos, dos tramos con niveles de deriva significativamente diferentes entre sí y de la horizontal, lo que obliga a aplicar niveles de corrección diferentes en cada tramo.

El resultado de la aplicación de esta corrección en un día concreto de funcionamiento del equipo se puede visualizar en el siguiente gráfico:



• Figura 8-8: Datos antes (S7, S2) y después (S7-C, S2-C) de la aplicación de una corrección multiplicativa correspondientes al día de ensayos de 25 de abril para los sensores 2 y 7.

## 8.2. Perturbaciones que afectan a la generación y composición del espacio de cabeza

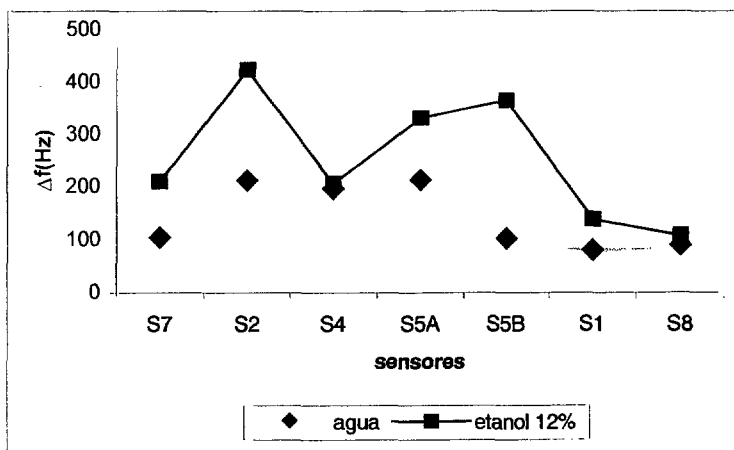
### 8.2.1. Identificación de fuentes de variación no deseadas, debidas a la propia muestra

#### 8.2.1.1. Efecto de la concentración del vapor de agua

Durante la generación del espacio de cabeza no sólo se volatilizan de la muestra moléculas olorosas sino que también se liberan compuestos inodoros, de entre ellos una de los más importantes es el vapor de agua.

##### ➤ Nivel de respuesta de los sensores hacia el agua destilada (Experimento III.A)

Cuando se analiza el nivel medio de respuesta de todos los sensores, respecto una muestra de agua destilada frente a etanol diluido en agua destilada hasta una concentración del 12% en volumen, se observa que el agua destilada representa el 56% de la respuesta correspondiente al etanol.



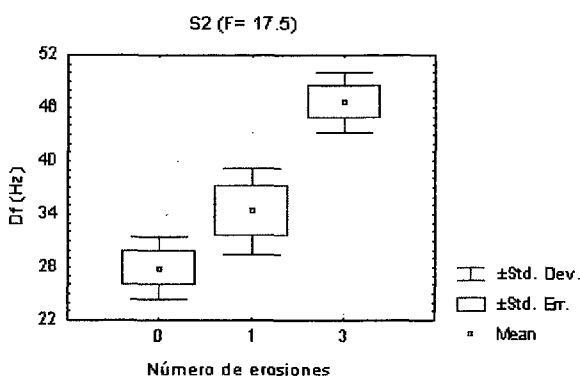
• Figura 8-9: Nivel medio de señal (n=3) por sensores hacia agua destilada y etanol 12%

Esto confirma que los sensores tipo QCM son sensibles a las moléculas inodoras de vapor de agua generadas por los alimentos, que al ser adsorbidas sobre los recubrimientos sensibles generan un nivel de señal muy importante (aproximadamente igual al generado por un fruto), enmascarando la presencia de moléculas olorosas que son las que tienen real interés de análisis en una aplicación para la determinación del aroma. Este mismo efecto ha sido descrito por (Mielle 2000) en sensores del tipo MOS cuya respuesta hacia una muestra de agua pura representaba un 13% de la obtenida para una disolución de 1000 ppm de etanol.

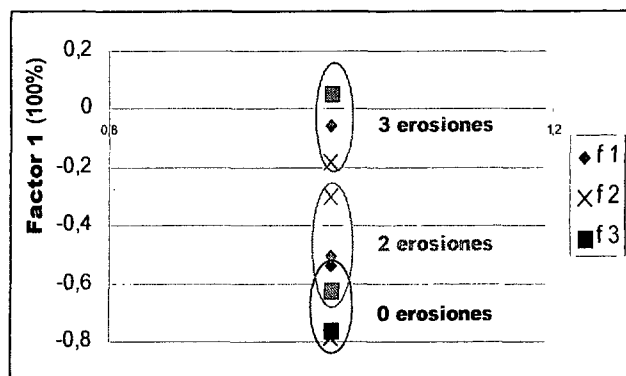
##### ➤ Presencia de daños en la piel de la fruta (Experimento III.D)

El análisis ANOVA (ver Figura 8-10) de los datos del Experimento III.D muestra que hay un incremento lineal y significativo ( $F_{S2}=17.5$ ) de la señal de los sensores con el incremento de la superficie dañada en la manzana.

El ACP (ver Figura 8-11) confirma para todos los sensores el resultado obtenido para el sensor 2, un solo Factor engloba la información correspondiente a los ocho sensores de la NE (var.expl.100%), observándose que es posible distinguir en la proyección de los individuos los tres casos considerados (fruto entero, una y tres erosiones).



• Figura 8-10: Análisis ANOVA de la respuesta del sensor 2 (S2) hacia los espacios de cabeza generados por manzanas con diferente nivel de daño.



• Figura 8-11: Representación de los individuos para un ACP (combinación lineal de ocho sensores) para frutos (f) de manzana cv Cox según el aumento del nivel de daño.

### 8.2.1.2. Efecto de la interacción entre las moléculas químicas presentes en la muestra. Coeficientes de actividad (Experimento IV.A).

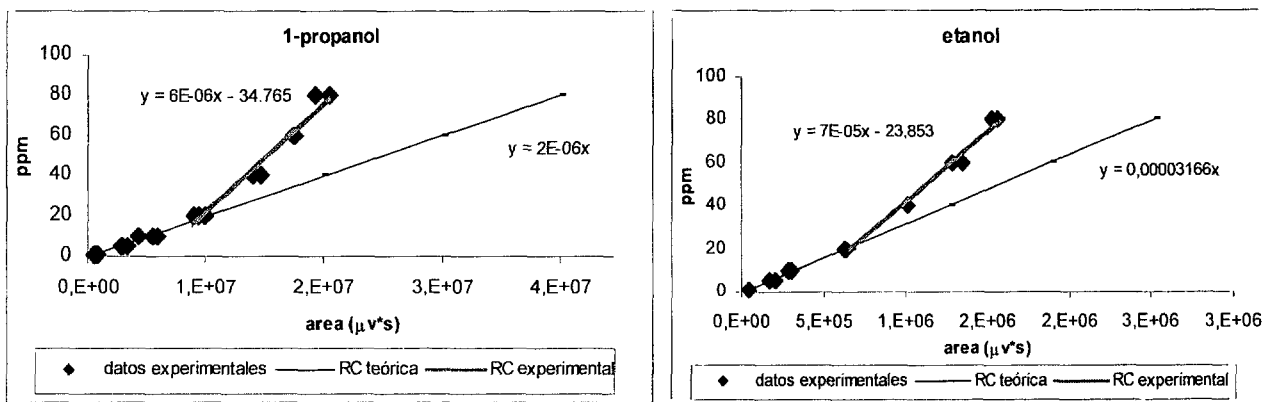
En este Experimento se ha evaluado la generación del espacio de cabeza para 6 concentraciones crecientes de disoluciones en agua destilada de los compuestos químicos 1-propanol y etanol (Experimento IV.A).

El Experimento IV.A, no permite determinar los valores absolutos de concentración del espacio de cabeza debido al procedimiento instrumental utilizado (CG). A pesar de todo, podemos comparar estos resultados en términos relativos con los datos teóricos calculados.

La resultados del cromatógrafo de gases muestran una linealidad a bajas concentraciones. A partir de 20 ppm la respuesta frente a la concentración sigue una línea de tendencia diferente, de pendiente mucho mayor a la anterior.

La mezcla entre agua y alcohol es una mezcla no ideal, lo cual afecta directamente a la probabilidad de evaporación de las moléculas, que podemos considerar ideal hasta 20 ppm. A partir de 20 ppm no se puede aplicar la ley de Raoult (ver apartado 4.4.6) siendo necesario compensar la desviación con respecto la idealidad modificando la ley de Raoult introduciendo una constante llamada coeficiente de actividad ( $\gamma$ ).

$\gamma$  es un coeficiente que no está tabulado y que hay que estimar a partir de datos experimentales (Perry's Chemical Engineers' Handbook) para cada producto y mezcla.



• Figura 8-12: deriva de los datos experimentales de concentración del espacio de cabeza con respecto de la recta de calibración (RC) teórica lineal, para el 1-propanol y el etanol.

La ecuación 4-5 del apartado 4.4.6 permite ajustar los valores del coeficiente de actividad ( $\gamma = C_{\text{experimental}} \text{ vs. } C_{\text{teórica}}$ ) para las distintas concentraciones de etanol y 1-propanol consideradas en este experimento (ver Tabla 8-4).

ppm teóricamente calculadas	ppm estimadas		Coeficiente de actividad $\gamma$	
	1-propanol	Etanol	1-propanol	Etanol
40	31.5	31.9	0.72	0.8
60	38.3	41.6	0.58	0.7
80	43.6	48.9	0.50	0.6
			$\gamma_{\text{medio}} = 0.60$	$\gamma_{\text{medio}} = 0.7$

• Tabla 8-4: Estimación de los coeficientes de actividad de 1-propanol y etanol a partir de la concentración determinada por cromatografía de gases

Los valores de la tabla son coherentes con las restricciones de  $\gamma < 1$  apuntadas por (Nobel 1970). A medida que aumenta la concentración de soluto en la disolución, las moléculas afectadas por las interacciones son termodinámicamente menos activas, observándose que a medida que aumenta la concentración los valores de  $\gamma$  van disminuyendo (ver Tabla 8-4), desde 0.72 a 0.50 para el 1-propanol y desde 0.8 a 0.6 para el etanol.

Se puede concluir así que no es válido calibrar la sensibilidad de las narices electrónicas usando disoluciones crecientes sin introducir un factor de corrección que ha de ser determinado.

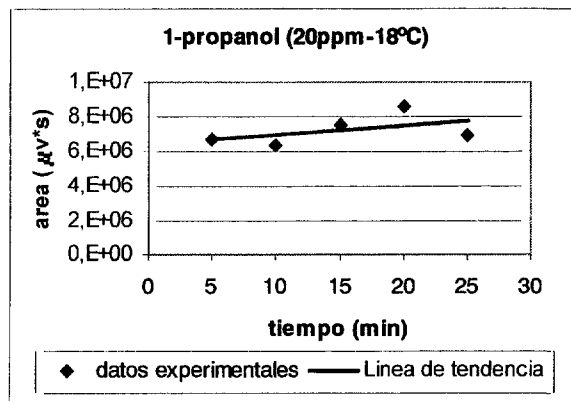
## 8.2.2. Identificación de fuentes de variación no deseadas, en la generación de espacios de cabeza de concentración conocida. Experimento IV.B

### 8.2.2.1. Efecto de la temperatura ambiente sobre el tiempo para alcanzar el equilibrio del espacio de cabeza

Este efecto ha sido establecido al analizar los datos correspondientes al Experimento IV.B, en el que se analiza 1-propanol en una concentración de 20 ppm en aire a una temperatura de generación del espacio de cabeza de 18°C.

Al analizar las concentraciones alcanzadas de espacio de cabeza, registradas por el cromatógrafo de gases, tras 5, 10, 15 y 20 min de tiempo de generación, se observa que la línea de tendencia es prácticamente horizontal (pdte = 0.000019), es decir, ya a los 5 minutos se ha alcanzado el equilibrio entre las fases líquida y gaseosa.

Este resultado significa que si bien el control de la temperatura es crítico por su incidencia directa en la presión de vapor del alcohol y por tanto en la concentración que se va a alcanzar en el espacio de cabeza, también permite afirmar que a la temperatura a la que se trabaja con la NE (22.5°C), en los Experimentos I, II y III, con tiempos de generación del espacio de cabeza entre 20 (exp. productos químicos) y 60 (exp. fruta) minutos, siempre se trabaja en condiciones



• Figura 8-13: Evolución de la concentración del espacio de cabeza a lo largo de distintos tiempos de generación.

de equilibrio, no siendo por tanto la falta de equilibrio una fuente de variación en los resultados obtenidos en la NE.

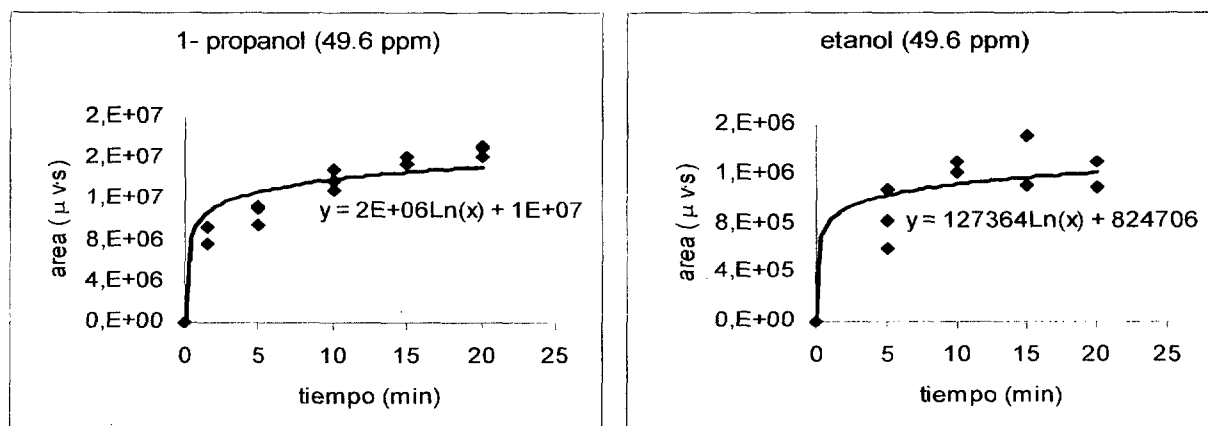
### 8.2.2.2. Efecto del tiempo de generación del espacio de cabeza

Los resultados descritos en el apartado anterior indican que trabajando a una temperatura de 18°C no es posible seguir la evolución de la concentración del espacio de cabeza a lo largo del tiempo. Para poder modelizar la evolución temporal hasta el equilibrio, es necesario trabajar a temperaturas más bajas. El seguimiento de la generación del espacio de cabeza a 1°C a lo largo del tiempo puede ser observado en la Figura 8-14.

El etanol debido a su mayor presión de vapor incluso a 1°C se evapora muy rápidamente, siendo muy difícil controlar la preparación y toma de muestras, de forma que cualquier variación en las mismas afecta a los resultados obtenidos. Esto explicaría la variabilidad entre las distintas



repeticiones realizadas, no siendo por tanto una buena opción como material patrón en la calibración de la NE.



• Figura 8-14: Evolución de la concentración a lo largo del tiempo, del espacio de cabeza hasta 49.6 ppm que corresponden a la situación de equilibrio, para 1-propanol y etanol.

El 1-propanol menos volátil y más fácil de manejar permite obtener mejores resultados. Los datos se ajustan a una ecuación logarítmica (base e) según la cual la concentración correspondiente al equilibrio se alcanzaría a los 21 minutos. Esto significa que si realizamos un muestreo del espacio de cabeza antes de los 21 minutos de tiempo de generación, la concentración será menor a la correspondiente al equilibrio.

Los datos obtenidos con el 1-propanol, teniendo en cuenta que cada repetición se corresponde con una muestra distinta realizada expresamente para cada caso, permiten establecer que la precisión en la generación del espacio de cabeza para una temperatura de 1°C y una concentración de 49.6 ppm de 1- propanol en aire es igual a  $\pm 1.44$  ppm, estimada como la DT entre repeticiones.

### 8.2.3. Conclusiones parciales sobre la identificación de fuentes de variación que afectan a la calidad de los datos que se obtienen de una NE

En relación al Objetivo 1 este trabajo muestra que la estabilidad y reproducibilidad de la respuesta de los sensores es baja, debido a la existencia de distintas perturbaciones externas e internas, algunas de las cuales han sido identificadas:

#### ➤ Perturbaciones que afectan a la respuesta de los sensores de la NE

##### 1) Humedad relativa del ambiente

Se ha encontrado una correlación positiva ( $r=0.66$ ) entre el nivel medio diario de respuesta de los sensores hacia la referencia, 1-propanol, y la humedad relativa del ambiente en cada día de

trabajo. Esto explicaría en parte, las fuertes variaciones encontradas en la respuesta media de los sensores hacia la referencia.

Se demuestra que el sistema de control empleado para eliminar la Hr del gas portador empleado en el transporte y generación del espacio de cabeza, basado en cartuchos desecadores de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , no es eficaz, debiendo ser sustituido por aire sintético seco en sucesivos análisis.

El aire sintético como gas portador elimina el efecto de la Hr ambiental aunque permanece una deriva de la señal media de los sensores hacia el 1-propanol entre días de trabajo que si bien es mucho menor ( $\text{CV}_{\text{aire sintético}}=19.1\%$ ,  $\text{CV}_{\text{aire}+\text{Cl}_2\text{Ca}}=29.2\%$ ) , es debido a otras fuentes de variación que no han sido identificadas.

## **2) Temperatura interna de la cámara de medida de gases**

Temperaturas internas de trabajo superiores a  $37^\circ\text{C}$  en la cámara de gases, provocan inestabilidad en la frecuencia de oscilación de los sensores. Una temperatura de trabajo de  $34 \pm 1^\circ\text{C}$  en la cámara de medida asegura el funcionamiento del equipo por debajo de este límite superior de  $37^\circ\text{C}$ .

## **3) Tiempo de funcionamiento del equipo**

Se ha detectado un incremento en la señal de respuesta de los sensores de la nariz electrónica al medir una misma muestra, ya sea estandarizada o frutos, a lo largo de una jornada de trabajo.

### **➤ Perturbaciones que afectan a la generación y composición del espacio de cabeza**

## **4) Evaporación del agua de composición de la muestra**

Se ha observado que los sensores QCM responden con un nivel medio de señal, similar al detectado hacia un fruto, ante una muestra de agua destilada corroborando la sensibilidad ya conocida que estos sensores tienen hacia las moléculas de vapor de agua al adsorberse sobre su superficie.

## **5) Presencia de daños en la piel del fruto**

Se ha comprobado que cualquier tipo de orificio o rotura de la piel del fruto supone una vía rápida para la evaporación de los compuestos volátiles del fruto, lo que explicaría que se haya detectado un incremento prácticamente lineal de la respuesta de los sensores, con el aumento del nivel de daño infringido artificialmente sobre la piel de un fruto. Como medida preventiva para evitar esta fuente de variación, cualquier fruto que no presente intacta la piel debe ser eliminado de los análisis con nariz electrónica.

## **6) Interacciones entre las moléculas químicas presentes en la muestra**

Tras el estudio bibliográfico se sabe que existen interacciones entre las especies químicas presentes en la muestra que influyen sobre la concentración que de estos se llega a alcanzar en el espacio de cabeza.

Así trabajando con disoluciones de distintos alcoholes (1-propanol y etanol) en agua destilada en distintas proporciones en la fase líquida tal que resultaran en determinadas concentraciones teóricas en la fase gaseosa, se ha observado que para concentraciones estimadas en el espacio de cabeza bajas, menores a 20 ppm, incrementos en la concentración resultan en incrementos lineales en la señal detectada por el detector de un CG. Para concentraciones mayores a 20 ppm las interacciones entre las moléculas de agua y del alcohol en la fase líquida, originan una menor probabilidad de evaporación del alcohol de forma que incrementos de la concentración se traducen en incrementos de la señal de menor cuantía. Esto indica que la concentración estimada teóricamente difiere de la realmente alcanzada en el espacio de cabeza, resultando menor a la esperada como consecuencia de las interacciones que caracterizan a las matrices de mezclas no ideales, diferencia que se expresa a través del coeficiente de actividad que habría que calcular para cada compuesto y dilución experimentalmente y que para el 1-propanol y el etanol tiene un valor medio de 0.6 y 0.7 respectivamente.

Por todo lo anteriormente expuesto, debe emplearse este método con precaución a la hora de evaluar la sensibilidad de la nariz electrónica a distintos compuestos.

## **7) Falta de equilibrio en el espacio de cabeza en el momento del muestreo**

Se ha observado en una disolución de 1-propanol en agua destilada a temperatura de generación del espacio de cabeza de 1°C que la tasa de evaporación disminuye a medida que aumenta el tiempo de generación y por tanto la concentración del espacio de cabeza, llegando a anularse prácticamente en las proximidades del equilibrio (49.6ppm). En estas condiciones la concentración correspondiente al equilibrio se alcanzaría tras 21 minutos de generación y por tanto muestreos en tiempos menores a este conducen a errores puesto que la concentración del espacio de cabeza será menor a la del equilibrio.

Las condiciones en las que se ha trabajado en la generación del espacio de cabeza que para la mayoría de los experimentos presentados en esta tesis son resultado de combinar una temperatura de generación del espacio de cabeza de 22.5°C con un tiempo de generación entre 20 y 60 minutos, aseguran que se ha trabajado en todos los casos en condiciones de equilibrio, no convirtiéndose por tanto este factor en una fuente de variación. Esta afirmación deriva del hecho de que se ha comprobado que una dilución de 1-propanol en agua destilada a una temperatura de generación de

18°C alcanza tras sólo 5 minutos el equilibrio en el espacio de cabeza, correspondiente a una concentración en la fase gaseosa de 20 ppm.

#### **8.2.4. Conclusiones parciales obre el establecimiento de sistemas de corrección que permitan eliminar las fuentes de variación no deseadas.**

En relación al Objetivo 2, la detección de las distintas fuentes de variación que afectan a la señal registrada por los sensores, fuerza a llevar a cabo un preprocesado de la matriz de datos de frecuencias originales obtenidas , basado en la aplicación de distintos tipos de calibraciones:

##### **1) Corrección aditiva entre secuencias o días de trabajo**

Realizada en función de la respuesta media diaria de los sensores con respecto a la respuesta media total hacia la referencia. Corrección que se aplicará en valores absolutos sobre las medidas tomadas durante la campaña 99-00 (nivel medio respuesta hacia la fruta similar al obtenido hacia el 1-propanol) y en valores relativos para la campaña 00-01 (nivel medio respuesta hacia la fruta muy inferior al obtenido hacia el 1-propanol debido al cambio del lote de sensores).

##### **2) Corrección multiplicativa intra secuencia o día de trabajo**

Realizada en función del incremento de respuesta experimentado por cada uno de los sensores para cada día de trabajo al medir el mismo fruto en tres momentos a lo largo de la secuencia de medidas, al principio, a la mitad y al final de la jornada de trabajo.

### 8.3. Metrología de la nariz electrónica (Experimento III.B)

#### 8.3.1. Precisión

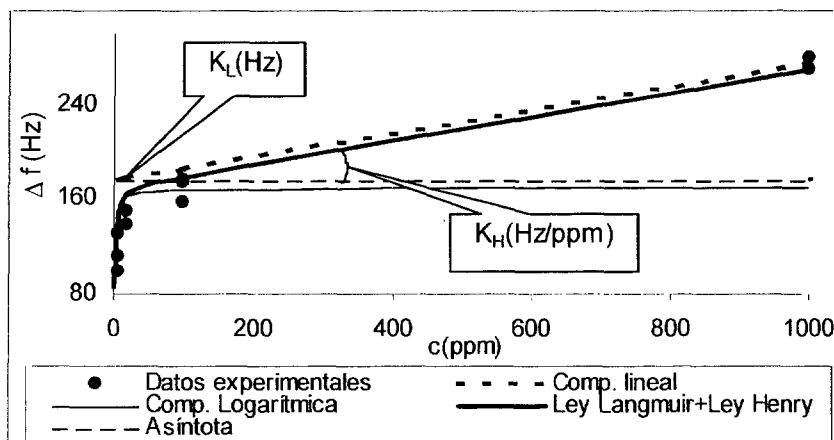
Se calcula la precisión para cada sensor ( $i=1\dots 8$ ) como la DT de las medidas ( $\Delta f$ ) obtenidas dentro de un mismo día (periodo intercalibraciones), para un mismo producto a la misma concentración ( $n=3$ ), promediado para 6 días de trabajo. El nivel de precisión medio para todos los sensores es de 16.44 Hz.

$DT_{n=6}, p(\text{Hz})$	S7	S2	S3	S4	S5A	S5B	S1	S8
DT media	21.04	23.71	15.81	9.46	13.06	22.28	19.26	6.88

• Tabla 8-5: Precisión en Hz de los sensores de QCM

#### 8.3.2. Sensibilidad

Este parámetro se ha calculado para tres compuestos químicos diferentes (acetato de propilo, acetato de etilo, 1-propanol) y para 8 sensores ( $i=1\dots 8$ ). El cambio de frecuencia de oscilación en cada sensor, es explicado por Bodenhöfer y cols., 1997, como una combinación de las leyes de Langmuir y Henry (ver ecuación 4-6).



• Figura 8-15: Datos y curva experimentales para el espacio de cabeza generado con distintas diluciones en agua del 1-propanol. Se presentan las dos componentes de la curva; la componente de Langmuir (logarítmica) muestra saturación de la respuesta a unos 175 Hz

La Tabla 8-6 muestra los valores de sensibilidad ( $S_b$ ) ajustados según la propuesta de (Bodenhöfer et al. 1997) (Ecuación 8-3), para compuestos químicos propios del aroma de manzanas y peras. Para concentraciones inferiores a 20 ppm en el espacio de cabeza, la  $S_b$  media de los sensores de la NE se puede aproximar claramente a una recta. Esta zona se corresponde además con la máxima  $S_b$  (Hz/ppm) de los sensores.

$$Sb(Hz/ppm) = \frac{K_L \cdot k}{(1 + k \cdot c)^2} + K_H$$

• Ecuación 8-3: Para la determinación de la Sb de los sensores siguiendo las leyes de Langmuir y Henry, según la propuestas de Bodenhöfer et al. 1997.

La emisión media de volátiles determinada por CG por el laboratorio del IRTA fue: en peras cv Doyenne du Comice, 11.9 ppm/h, en manzana cv Fuji, (media campañas 99-00 y 00-01), 25.9 ppm/h. Por tanto la no linealidad en la sensibilidad de la NE no es relevante en la evaluación de la calidad de la fruta en los tiempos de generación del espacio de cabeza (1 h) usados en los experimentos con fruta al mantenerse las emisiones por debajo o entorno las 20ppm.

$Sb_{8,3}(Hz/ppm)$	S7	S2	S3	S4	S5A	S5B	S1	S8
Acetato de etilo	2.49	4.30	4.94	0.99	2.87	3.27	2.25	1.70
Acetato de propilo	3.73	9.24	3.64	1.64	2.98	5.30	5.33	1.64
1-propanol	2.54	2.01	0.04	0.45	1.64	2.13	2.21	0.74

• Tabla 8-6: Sensibilidad( Sb) en Hz/ppm de los sensores QCM para cada analito

La máxima sensibilidad se ha detectado para el acetato de propilo en comparación con los otros dos compuesto químicos y para los sensores 2 y 5B con respecto al resto de los sensores, siendo la sensibilidad media para el S2 de 5.18 Hz/ppm. Conocida la precisión media de los sensores de la NE (16.44 Hz), y en función de la sensibilidad del sensor más sensible (5.18 Hz/ppm) en la zona inicial de la curva, el error en términos de concentración del espacio de cabeza será de  $p/Sb$ . Puede incluso definirse como  $2p/Sb$  para un índice de confianza superior con lo que el error o umbral de detección alcanzaría el valor 6.34 ppm.

### 8.3.3. Especificidad

La especificidad (Esp) se define como la capacidad de cada sensor ( $i=1...8$ ) a responder de forma preferente ante una sola especie en presencia de otras ( $j=1...3$ ) (D'Amico 1999). Por ello, se ha empleado la Ecuación 8-4 para evaluar la especificidad de cada sensor, para tres analitos que son algunos de los que esperamos encontrar en mayor proporción en el espacio de cabeza generado por los frutos de pera y manzana.

$$Esp_{i,j} = \frac{\Delta f_{i,j}}{\sum_{j=1}^{j=3} \Delta f_{i,j}}$$

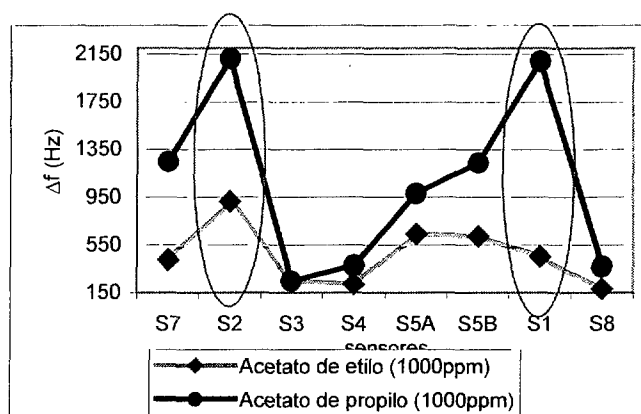
• Ecuación 8-4: para la determinación de la especificidad de los sensores de la NE

Como se esperaba la especificidad encontrada para todos los sensores es baja (difieren sólo ligeramente del valor tipo de inespecificidad,  $1/J_{\max}=0.33$  para tres compuestos) ya que para evitar el problema de no reversibilidad en la respuesta de los sensores, se utilizan dispositivos no o parcialmente selectivos en la construcción de las NE (Mielle 1996). Para el caso analizado todos los sensores muestran una mayor especificidad hacia los ésteres. Los sensores S2, S1 y S5B con valores de hasta 0.45, 0.44 y 0.42 respectivamente (ver Tabla 8-7) son los más específicos, mostrando además una mayor especificidad hacia el acetato de propilo.

$Esp_{8,3}$	c (ppm)	S7	S2	S3	S4	S5A	S5B	S1	S8
Acetato de Etilo	5	0.38	0.39	0.39	0.40	0.40	0.38	0.37	0.39
	20	0.36	0.37	0.42	0.39	0.40	0.36	0.33	0.39
Acetato de Propilo	5	0.40	<b>0.42</b>	0.39	0.40	0.41	<b>0.40</b>	<b>0.40</b>	0.39
	20	0.40	<b>0.45</b>	0.39	0.42	0.41	<b>0.42</b>	<b>0.44</b>	0.40
1-Propanol	5	0.22	0.19	0.23	0.20	0.19	0.22	0.24	0.22
	20	0.24	0.18	0.19	0.19	0.20	0.22	0.23	0.21

• Tabla 8-7: Especificidad de los sensores QCM para tres analitos y dos concentraciones 5 y 20 ppm

Las diferencias en especificidad que presentan los 8 sensores con respecto a los analitos, producen ligeras variaciones en el fingerprint o espectro de la nariz electrónica, lo que da perspectivas moderadas para la realización de análisis cualitativos del espacio de cabeza ya que sólo son muy evidentes a concentraciones que resultan excesivas en relación con los volátiles emitidos por los frutos (Figura 8-16, 1000 ppm).



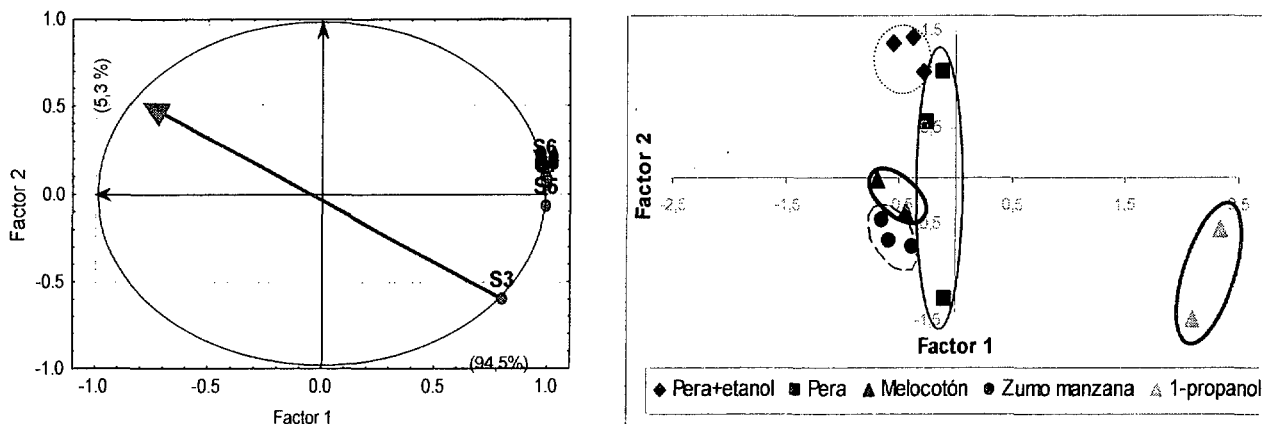
• Figura 8-16: . Fingerprint para dos productos químicos distintos a la misma concentración en el espacio de cabeza (1000 ppm). La especificidad hacia el acetato de propilo es de 0.58, 0.56 y 0.77 para los sensores 2,5B y 1, respectivamente.

Sólo aquellos compuestos hacia los cuales los sensores ofrezcan una respuesta muy específica provocarán cuando estén presentes cambios significativos en el fingerprint de la nariz electrónica siendo especialmente adaptables a análisis cualitativos de las muestras. El resto de los volátiles serán indistinguibles pero los análisis cuantitativos sobre la concentración total de aromas pueden

llevarse a cabo tal y como se muestra en el punto 8.3.5, siempre y cuando los equipos estén suficientemente calibrados respecto a fuentes de variación relevantes.

### 8.3.4. Identificación de muestras artificiales de aromas de fruta

El ACP realizado sobre los datos obtenidos en el Experimento III.B sobre datos de cuatro disoluciones patrón, muestra en primer lugar que todos los sensores están muy correlacionados entre sí (ver Factor 1, var.expl.94.5%) a excepción del sensor 3 que va a definir el segundo Factor del ACP (var.expl.5.3%). La representación de los datos según el gráfico de proyección de los individuos definido por el ACP, indica que para la primera aproximación propuesta en este experimento, es posible usar la NE para diferenciar entre los cuatro estándares analizados (muy diferentes entre sí) y estos de la referencia (1-propanol). Así la mayoría de los sensores muestran su capacidad para responder con señales diferentes cuando las variaciones en concentración entre las muestras son muy elevadas: producto puro (1-propanol) del resto (diluciones). Por ello a lo largo del Factor 1 es posible segregar el 1-propanol (la referencia 150 veces más concentrada que los patrones) del resto de las muestras. Sin embargo el sensor S3 aporta una información más relevante, puesto que a lo largo del Factor 2 es posible distinguir entre los estándares de pera, pera senescente, melocotón y zumo de manzana. Este hecho indica que es posible llevar a cabo análisis de tipo cualitativo para muestras que generan elevadas concentraciones de espacio de cabeza.



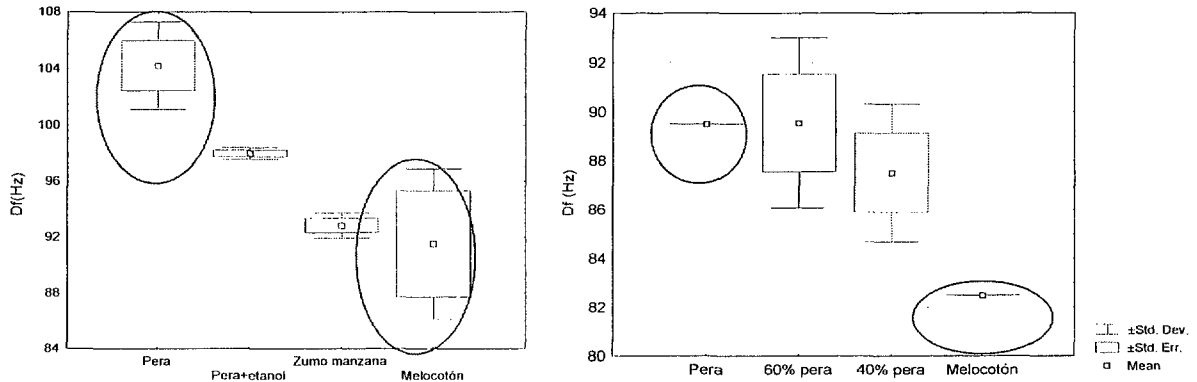
• Figura 8-17: ACP (Factor 1 vs Factor 2) para patrones artificiales de furta en Experimento III.B. Proyección de las variables (izq.) y proyección de los individuos (drecht)

Al realizar un análisis ANOVA sobre estos datos se observa que los patrones de pera y pera senescente provocan en los sensores una respuesta significativamente diferente entre sí y con respecto a los estándares de melocotón y zumo de manzana ( $F_{S6}=12.7$ ). Si aplicamos este mismo análisis a los datos correspondientes a la segunda aproximación del Experimento III.B, se observa que las mezclas de los dos patrones (pera y melocotón) producen una señal intermedia indicando:

- ✓ una tendencia coherente de los resultado, y



- ✓ la dificultad de realizar análisis cuantitativos (no hay diferencias significativas entre niveles de mezcla).



• Figura 8-18: Representación gráfica del resultado del ANOVA análisis para el sensor S6, sobre patrones artificiales de fruta.

### 8.3.5. Especificaciones de una nariz electrónica para la evaluación de volátiles en pera y manzana



El mínimo tiempo ( $t_{\text{umbral}}$ ) de generación del espacio de cabeza para superar el umbral de detección en la nariz deriva de la necesidad de alcanzar una respuesta de los sensores (Hz) igual o mayor a dos veces el nivel de precisión ( $2p$ , Hz) para un sensor en particular o para la media de todos los sensores.

Lógicamente el número de categorías o de estados de madurez de las peras y manzanas que podemos diferenciar, para una emisión determinada, aumenta al aumentar el tiempo de generación del espacio de cabeza así como al aumentar la sensibilidad y la precisión del equipo, variando asimismo con el volumen de aire del recipiente. En la Tabla 8-8 se han calculado los tiempos para poder separar diferente número de categorías aromáticas (ver Ecuación 8-5) en pera y manzana con recipientes de 0.75 l y frutos de 250 g de masa aproximadamente, a partir de los datos de emisión obtenidos por CG y expresados en ppm/h ( $\text{mg}/\text{kg}_{\text{aire}} \cdot \text{h}$ ) según la Ecuación 7-1.

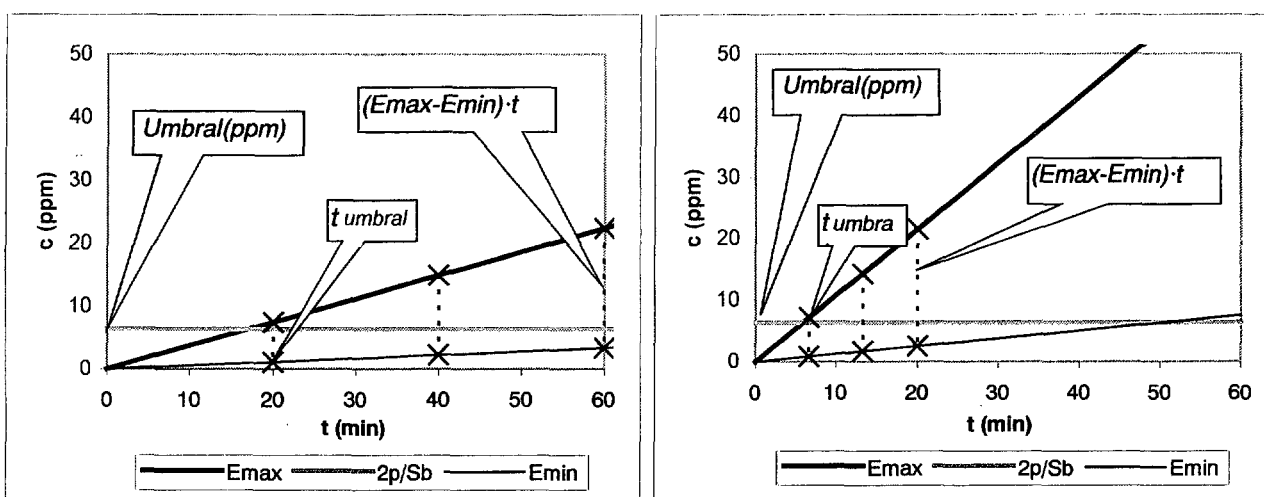
$$n = \frac{(E_{\text{max}}(\text{ppm}/\text{h}) - E_{\text{min}}(\text{ppm}/\text{h})) \cdot t(h) \cdot Sb(\text{Hz} / \text{ppm})}{2p(\text{Hz})}$$

• Ecuación 8-5: Para la estimación del número n de estados de madurez de la fruta

Podemos comprobar que para un umbral de 6.34 ppm, tanto en la variedad de pera como en la de manzana estudiadas y después de un tiempo de generación del espacio de cabeza de 60 min, es posible diferenciar entre tres categorías de calidad aromática, requiriéndose tiempos mucho menores para el cultivar Fuji frente el cultivar Doyenne du Comice debido a la mayor tasa de emisión de volátiles del primero.

Tiempo de generación del espacio de cabeza (min) para:				
Fruto	Umbral detección	nº categorías (n)		
		2	3	4
	20	40	60	80
	6.67	13.3	20	26.7

• Tabla 8-8: Tiempo de generación del espacio de cabeza necesario para diferenciar entre n estados de madurez



• Figura 8-19: Evolución de la concentración del espacio de cabeza, generado por peras cv Doyenne du Comice (izq) y manzanas cv Fuji (drcha.) en su estado de emisión máximo y mínimo, con el tiempo.

Para obtener modelos de predicción cuantitativos el ratio *error* (ppm) / *rango* (máximas diferencias entre emisiones de los frutos, ppm) debería estar por debajo de 0.1 (Barreiro 2000). El error se ha determinado en el apartado 8.3.2. y el rango máximo de diferencias aromáticas se determina como  $(E_{\max} - E_{\min}) \cdot t$ . Por tanto, con el sistema de obtención de espacio de cabeza empleado para la NE, se necesitaría un tiempo de generación del espacio de cabeza de 3.3 h para las peras cv Doyenne du Comice, y de 1.1 h en manzanas cv Fuji. Por ello, las restricciones para una predicción cuantitativa son muy superiores a las necesarias para una clasificación en 4 categorías de calidad aromática (ver Tabla 8-8). Para la realización de estudios cuantitativos fruto a fruto con un tiempo de generación del espacio de cabeza menor habría que utilizar recipientes con menor volumen libre de aire con la consecuente dificultad de manejo del espacio de cabeza.

### **8.3.6. Conclusiones parciales sobre la determinación de las características metroológicas que definen el funcionamiento de los sensores QCM de la nariz electrónica en el análisis de estándares.**

#### **1) Precisión**

Precisión media estimada como la desviación típica media de  $\pm 16.44$  Hz.

#### **2) Sensibilidad**

La máxima sensibilidad la presentan los sensores 2 y 5B por este orden, los cuales muestran al mismo tiempo la menor precisión. La sensibilidad media para el sensor 2 es de 5.18 Hz/ppm.

#### **3) Umbral de detección**

El mínimo nivel de concentración del espacio de cabeza que los sensores pueden reconocer como debido a una muestra, en función de su precisión y sensibilidad, es de 6.34 ppm.

#### **4) Especificidad**

Todos los sensores muestran una mayor especificidad hacia los ésteres. El sensor 2 ( $esp=0.45$ ), el S5B ( $es=0.42$ ) y el S1 ( $esp=0.44$ ) muestran además una mayor especificidad hacia el acetato de propilo.

#### **5) Influencia del error cometido en la estimación teórica de la concentración del espacio de cabeza**

Se ha establecido que para concentraciones superiores a 20 ppm se está cometiendo un error al calcular teóricamente las concentraciones en el espacio de cabeza, debido a la falta de idealidad de las disoluciones. Sin embargo al analizar la función de transferencia por la cual variaciones en la concentración del espacio de cabeza de la muestra se traducen en variaciones en la señal de los sensores QCM, se determina que la región de interés para el análisis de fruta por ser la de máxima sensibilidad de los sensores y por corresponderse con la tasa de emisión media de las manzanas y peras estudiadas es la comprendida entre 0 y 20 ppm. Los valores de sensibilidad, especificidad y demás parámetros metroológicos estudiados se han calculado para este rango de concentraciones, considerándose que no estarán afectados en su cálculo por la desviación de la concentración de la fase gaseosa con respecto a la idealidad estimada a través de los coeficientes de actividad.

### **8.3.7. Conclusiones parciales sobre el establecimiento de cuales deben ser las especificaciones que debe cumplir una NE para poder ser empleada en la evaluación de la calidad aromática de manzanas cv Fuji y peras cv. Doyenne du Comice**

#### **1) Para la realización de análisis cualitativos**

Las diferencias en especificidad que presentan los 8 sensores con respecto a los analitos considerados producen ligeras variaciones en el fingerprint o espectro de la nariz electrónica, lo que da perspectivas moderadas para la realización de análisis cualitativos del espacio de cabeza ya que sólo son muy evidentes a concentraciones que resultan excesivas en relación con los volátiles emitidos por los frutos.

#### **2) Para la realización de análisis cuantitativos**

El conocimiento a partir de los análisis metrológicos de los parámetros que caracterizan a los sensores QCM utilizados en esta nariz electrónica y a partir de la cromatografía de gases de la emisión máxima y mínima ( $\mu\text{g}/\text{kg}_{\text{fruta}} \cdot \text{h}$ ) de volátiles producidos por frutos de manzana cv Fuji y peras cv. Doyenne du Comice, ha permitido calcular el tiempo mínimo de generación del espacio de cabeza para poder distinguir entre 1, 2, 3 y 4 estados de cualidad volátil de los frutos. Así para el tiempo de 60 minutos de generación del espacio de cabeza empleado en esta tesis en el análisis de fruta se podría diferenciar utilizando la nariz electrónica más de cuatro categorías aromáticas en manzanas cv Fuji ( $t= 26.7$  min) y hasta 3 categorías en peras cv Doyenne du Comice ( $t=60$  min).

## 8.4. Aplicación de una nariz electrónica en la determinación de la calidad aromática en manzanas y peras

### 8.4.1. Experimento I.B. Determinación de la calidad aromática en pera cv Doyenne du Comice.

#### 8.4.1.1. Determinación del estado de madurez de la fruta por métodos de referencia

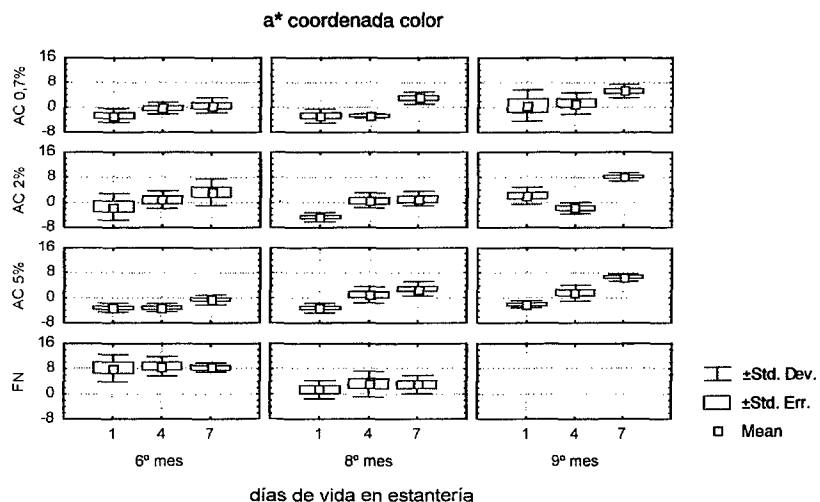
En el Anejo III se incluye una tabla con los resultados del ANOVA para todas las variables.

##### ➤ Peso, color y textura

A lo largo de 7 días de estancia en estantería el peso medio pasa de 254 a 208 g, es decir el fruto experimenta una pérdida aproximada de peso del 18%, esta pérdida de peso es especialmente notable en la fruta almacenada en condiciones de FN, alcanzando en este caso el 25%.

La variación de la coordenada de color  $a^*$ , de verde (-) a rojo (+) indica que la degradación de la clorofila es mucho más intensa para los frutos almacenados en condiciones de FN que en condiciones de AC ( $a^*$  media tras 1 día de VE igual a 4.8 y -1.9 respectivamente).

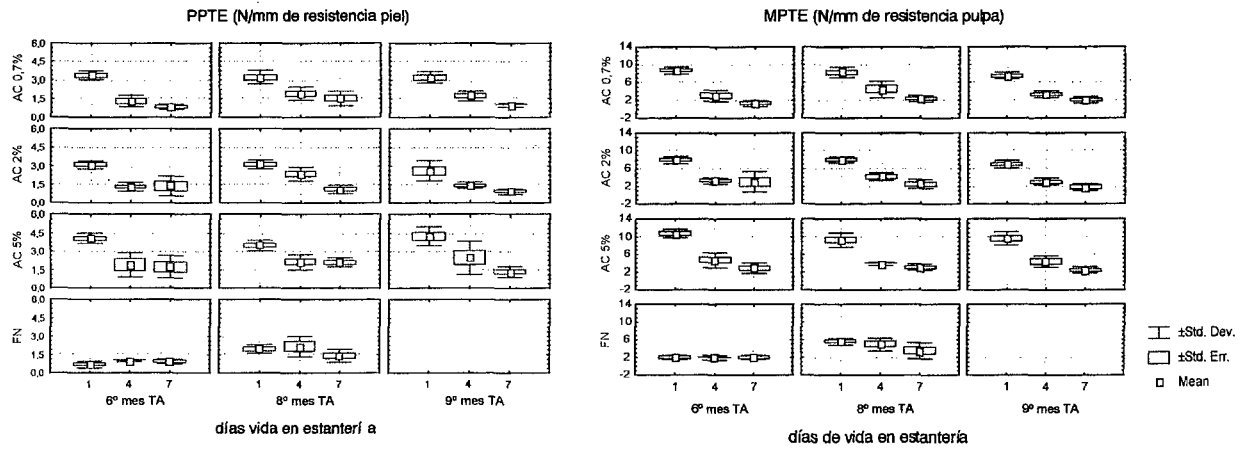
A medida que aumenta el número de días de vida en estantería el color del fruto almacenado bajo cualquiera de las tres condiciones de AC consideradas, evoluciona hacia un color verde menos intenso ( $\uparrow a^*$ ), manteniéndose constante para la cámara de FN.



• Figura 8-20: Evolución de la coordenada de color  $a^*$ , a lo largo de tres días de VE, tres TA y cuatro CA.

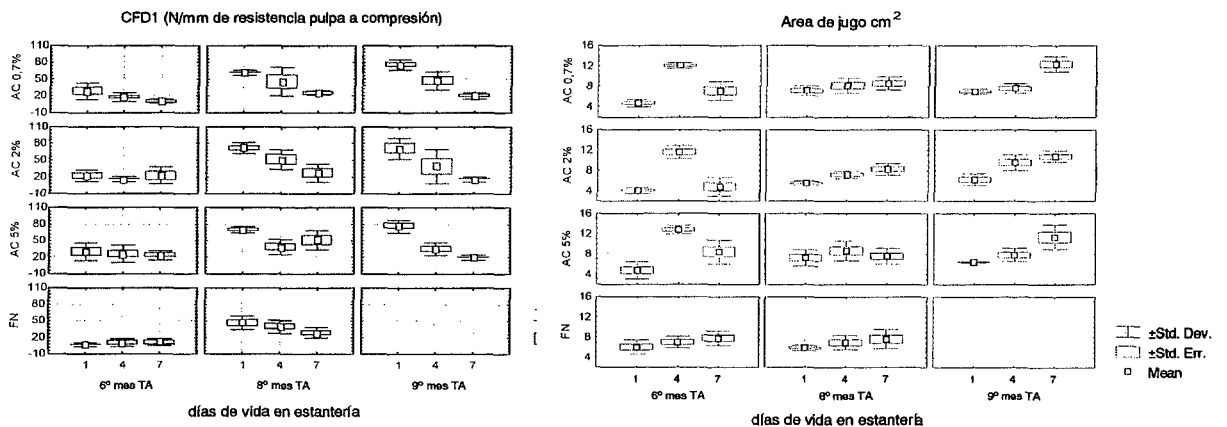
Por otro lado la resistencia de la piel y firmeza de la pulpa disminuyen a medida que aumenta el número de días de vida en estantería, este efecto se cumple para los frutos almacenados en condiciones de AC pero no en condiciones de FN, los cuales presentan inmediatamente tras la salida de cámara la menor resistencia de la piel y menor firmeza (MPTE) que se mantienen más o menos constantes a lo largo de los 7 días de estancia en estantería, y a la que tienden el resto de

cámaras de almacenamiento. La AC de condiciones más restrictivas (5% CO<sub>2</sub>) es la que mantiene una cierta tendencia de mayor resistencia de la piel y firmeza del fruto.



• Figura 8-21: Evolución de las variables PPTe (estimación resistencia piel, izq) y MPTE (estimación de la firmeza pulpa, derecha), a lo largo de tres días de VE, tres TA y cuatro CA.

La dureza del fruto expresada como la pendiente fuerza vs deformación en el ensayo de compresión confinada (CFD1) disminuye según van pasando los días de almacenamiento en estantería, especialmente tras 8 meses de almacenamiento. La dureza estimada a través de la variable CFD1, está afectada fundamentalmente por el tiempo de almacenamiento, observándose que la fruta que sufre mayores periodos de almacenamiento se mantiene tras un día de vida en estantería con mayor dureza (comportamiento extraño, contrario a la esperable disminución de la dureza al aumentar el tiempo de almacenamiento), sin embargo una vez fuera de cámara se ablanda mucho más rápidamente, hasta alcanzar al final de los 7 días de vida en estantería niveles similares en los tres TA considerados. Por otro lado la jugosidad del fruto aumenta al incrementar el tiempo de almacenamiento ya sea en cámara o de estancia en estantería.



• Figura 8-22: Evolución de las variables obtenidas en el ensayo textural de compresión confinada CFD1 (estimación dureza pulpa, izq) y área de jugo, a lo largo de tres días de VE, tres TA y cuatro CA.

En general, el factor que introduce mayor fuente de variación en las variables consideradas es el tiempo de vida en estantería (superior al tipo y tiempo de almacenamiento frigorífico) destacando su influencia en la pérdida de firmeza del fruto estimada mediante el ensayo textural de Magness Taylor a través de la variable MPTE ( $F=380$ ). La segunda fuente de variación importante es el tiempo de almacenamiento en cámara, su aumento hace que el fruto se mantenga más duro (CFD1,  $F=151$ ) tras la finalización del periodo de almacenamiento en cámara. El tipo de almacenamiento es de los tres factores el que introduce menor variabilidad, existiendo diferencias significativas, en cuanto a la resistencia de la piel (PPTE,  $F=27$ ) y firmeza del fruto (MPTE,  $F=23$ ), entre los frutos mantenidos en FN (más blandos) y aquellos almacenados en AC.

#### ➤ **Calidad organoléptica (sólidos solubles y acidez titulable)**

El contenido en sólidos solubles se mantiene invariable ( $^{\circ}\text{Brix}$ ;  $M= 12.8$ ,  $DT= \pm 0.8$ ) de forma que no evoluciona ni con el tiempo ni con el tipo de almacenamiento, el único factor que introduce cierta variabilidad es de nuevo el tiempo de vida en estantería ( $F=12.6$ ), detectándose un menor contenido de sólidos solubles al finalizar la estancia en estantería tras seis y ocho meses de almacenamiento frigorífico, a pesar de la pérdida de agua que experimenta el fruto durante su maduración en estantería.

La acidez disminuye ligeramente a lo largo de la vida en estantería y al aumentar el tiempo de almacenamiento en cámara.

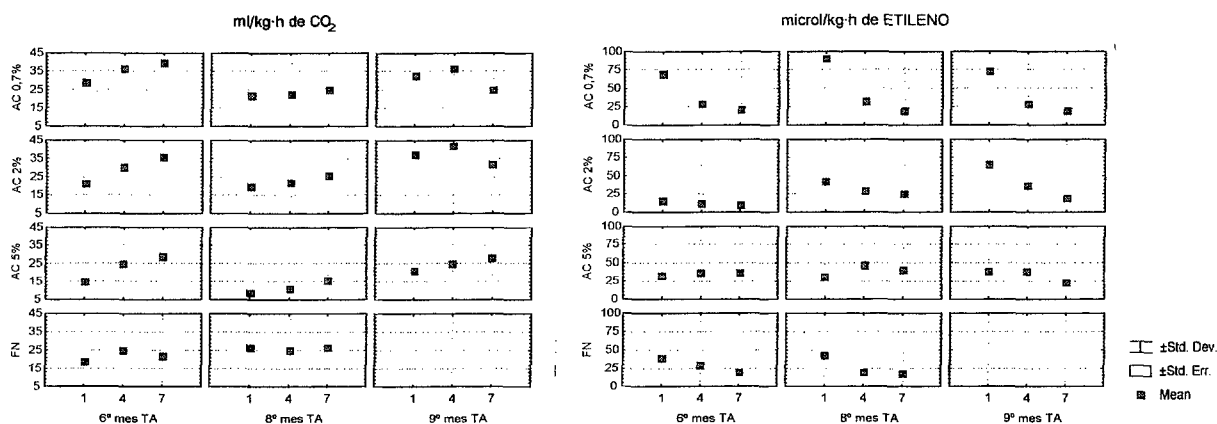
#### ➤ **Respiración y emisión de etileno**

En este punto se muestran los resultados obtenidos mediante CG en el Laboratorio de Postcosecha del IRTA.

La tasa de respiración del fruto aumenta con el tiempo de vida en estantería pero especialmente con el incremento del tiempo de almacenamiento en cámara ( $F=14.6$ ), que se convierte con el factor con más influencia sobre esta variable.

Para almacenamientos en cámara de AC superiores a 8 meses la eficiencia en el control de la tasa de respiración disminuye observándose en estos frutos inmediatamente tras la salida de cámara una mayor emisión de  $\text{CO}_2$  que la correspondiente a almacenamientos inferiores a 8 meses. Sin embargo a medida que se prolonga el tiempo de almacenamiento se puede apreciar que los frutos van perdiendo su capacidad de evolucionar y madurar a lo largo del periodo de vida en estantería. Así los frutos sometidos a un almacenamiento no superior a 6 meses muestran una clara evolución a lo largo de la vida en estantería, aumentando su tasa de respiración de 1 a 7 días. Los frutos mantenidos en cámara entre 6 y 8 meses, se comportan con la misma tendencia, pero su

evolución con el tiempo de vida en estantería es mucho menor, alcanzando al final de la misma una tasa de respiración mucho menor que en el caso anterior. Por último los frutos almacenados durante más de 8 meses no muestran prácticamente evolución en la tasa de respiración a lo largo de la vida en estantería.



• Figura 8-23: Evolución de las variables obtenidas por CG de emisión de CO<sub>2</sub> (izq.) y etileno (dcha.), a lo largo de tres días de VE, tres TA y cuatro CA

Por otro lado la influencia del tipo de almacenamiento es clara (es la segunda fuente de variabilidad en nivel de significancia,  $F=12.1$ ), observándose un mayor control sobre la tasa de respiración del fruto a medida que se usan atmósferas más restrictivas, es decir, al incrementar la concentración de CO<sub>2</sub>. El almacenamiento denominado AC 5%, mantiene a lo largo de toda la duración del almacenamiento la menor tasa de respiración en el fruto.

La emisión de etileno por el fruto es máxima inmediatamente tras la salida del fruto de cámara. De forma que al aumentar el tiempo de vida en estantería la emisión de etileno va disminuyendo, hasta alcanzar a los 7 días un valor mínimo al que tienden todos los frutos independientemente del tiempo de almacenamiento al que hayan sido sometidos (senescencia del fruto).

La influencia del tipo de almacenamiento sobre la emisión de etileno se observa especialmente para periodos de almacenamiento inferiores a 6 meses, inmediatamente después de la salida del fruto de cámara. El comportamiento en esta situación es el mismo que en la emisión de CO<sub>2</sub> es decir, a mayor concentración de CO<sub>2</sub> en la cámara, más se limita la producción de etileno por el fruto. La tendencia es que la tasa de emisión de etileno tienda a igualarse para todas las cámaras al aumentar el tiempo de almacenamiento en cámara y de maduración en estantería, siendo únicamente la AC 5%, la que mantiene prácticamente invariable su tasa de emisión de etileno comportándose de forma independiente con respecto los tiempos considerados. El principal factor que influye sobre la emisión de etileno es el tiempo de vida en estantería ( $F=14.2$ ) seguido del factor tipo de almacenamiento con un nivel de significancia de  $F=6.9$ .



### ➤ **Cromatografía de gases**

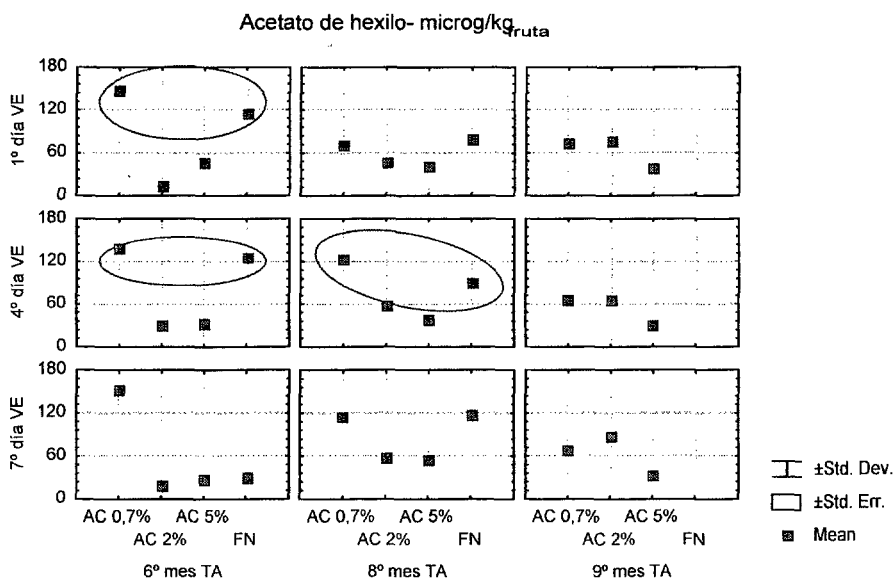
El análisis por cromatografía de gases de las emisiones aromáticas de la fruta realizado por el grupo de investigación del IRTA, permite la identificación y cuantificación de 15 compuestos presentes en el espacio de cabeza, de entre ellos una media del 86% son ésteres (acetato de etilo, acetato de propilo, acetato de 2-metilpropilo, acetato de butilo, acetato de 2-metilbutilo, acetato de pentilo, acetato de hexilo, butirato de butilo y hexanoato de etilo), un 12% alcoholes (etanol, 1-propanol, 2-metilpropanol, 1-butanol, 2-metilbutanol y 1-hexanol), correspondiendo el resto al terpeno limoneno.

Los ésteres son por tanto los compuestos predominantes en el cv. Doyenne du Comice correspondiendo las máximas emisiones a los acetatos de butilo, hexilo, propilo y etilo, que en conjunto suponen el 81% de los volátiles registrados. El mismo comportamiento en cuanto a los volátiles predominantes, fue referenciado en la bibliografía para las dos variedades de pera consideradas cv. Bartlett y cv. France.

De especial interés es la presencia del éster acetato de hexilo no sólo por ser uno de los compuestos predominantes en el espacio de cabeza (el sólo representa el 28% de los ésteres emitidos), si no porque de acuerdo con los datos bibliográficos ((Shiota Haruyasu 1990)) se identifica como uno de los compuestos impacto del aroma, al presentar un olor reconocido típicamente como "a pera", especialmente presente cuando el fruto alcanza la madurez gustativa. El acetato de hexilo parece convertirse así en uno de los compuestos aromáticos más importantes cuantitativa y cualitativamente hablando en el aroma de la pera Doyenne du Comice, efecto que se puede corroborar con los resultados obtenidos en el análisis de varianza de los datos, que indican que la variable que introduce mayores diferencias significativas es precisamente el acetato de hexilo.

A diferencia con lo ocurrido con las variables estudiadas en los apartados anteriores en las que el factor que introduce mayor fuente de variación es el tiempo de vida en estantería, la emisión de volátiles responde preferentemente a los cambios en las condiciones de almacenamiento ( $F_{\text{acetato de hexilo}}=87$ ), en función de la duración del tiempo de almacenamiento ( $F_{\text{acetato de hexilo}}=25$ ).

Así la fruta almacenada en condiciones de FN mantiene a lo largo del tiempo de almacenamiento su capacidad de producir una emisión elevada de volátiles, siendo el único tipo de almacenamiento que permite una evolución en la emisión aromática de la fruta durante el tiempo de vida en estantería, aumentando a medida que pasan los días de estancia en estantería. Sin embargo, el factor tiempo de vida en estantería no tiene ningún efecto significativo sobre la emisión de volátiles por los frutos almacenados en condiciones de AC, pareciendo así que tras un almacenamiento prolongado en cámara (superior a 6 meses), la fruta pierde su capacidad de recuperar la tasa de emisión aromática a lo largo de la maduración en estantería, efecto ya descrito por (Mattheis, Buchanan, and Fellman J.K. 1995) como se indicó en la revisión bibliográfica.

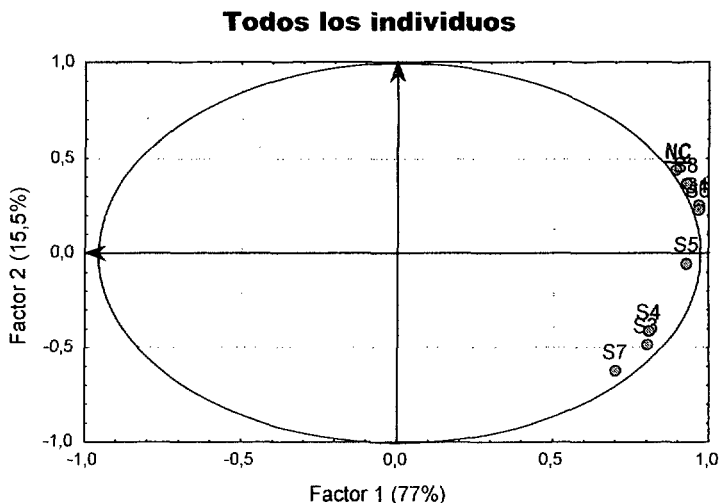


• Figura 8-24: Evolución de la variable de emisión de acetato de hexilo, obtenida por CG, a lo largo de tres días de VE, tres TA y cuatro CA

#### 8.4.1.2. Nariz electrónica

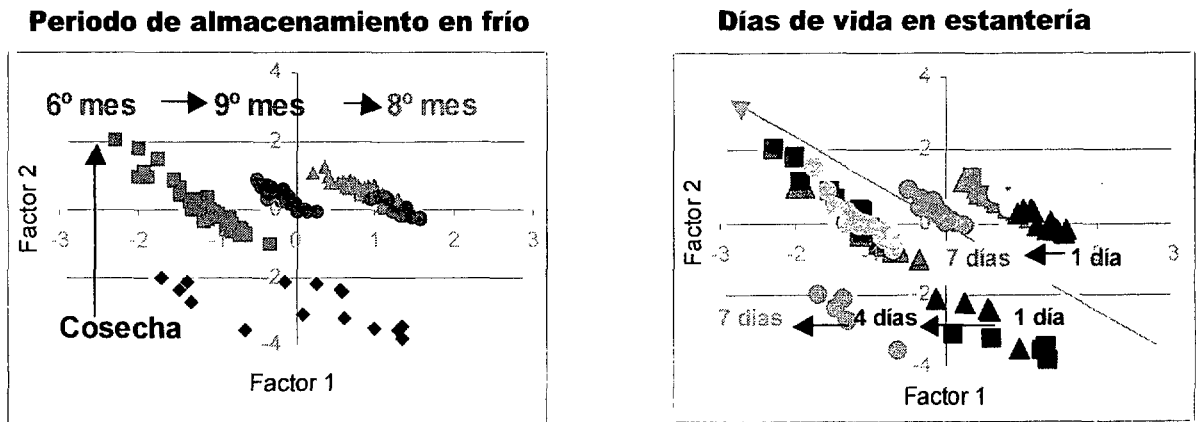
Sobre los datos de pera Doyenne du Comice (Experimento I.B) corregidos de forma aditiva se ha realizado el ACP representado en la Figura 8-25.

El Factor 1 con un porcentaje de varianza explicada (var.expl) del 77%, está claramente correlacionado con el sensor 5 mientras que el Factor 2 (var.expl 15.5%) está definido principalmente por el sensor 7. Estudios previos (Correa et al. 2000) indican que son los sensores 1, 6 y 8 los que presentan menor nivel de respuesta, siendo precisamente estos los que están más influidos por la corrección aplicada (NC) en relación con los sensores 3, 4 y 7.



• Figura 8-25: Proyección de las variables en un ACP sobre Experimento I.B, con peras Doyenne du Comice (n=180). Se ha aplicado corrección aditiva.

La Figura 8-26 muestra la proyección de los individuos en el primer plano del ACP. A lo largo del almacenamiento frigorífico se produce un aumento de la respuesta del sensor 5 para disminuir tras un almacenamiento prolongado de 8 meses que permite la diferenciación entre los tres tiempos de almacenamiento considerados.



• Figura 8-26: Proyección de los individuos en una ACP sobre Experimento I.B, con peras Doyenne du Comice (n=180) en el que se evalúan tiempo de almacenamiento en cámara y días de vida en estantería. Se ha aplicado corrección aditiva.

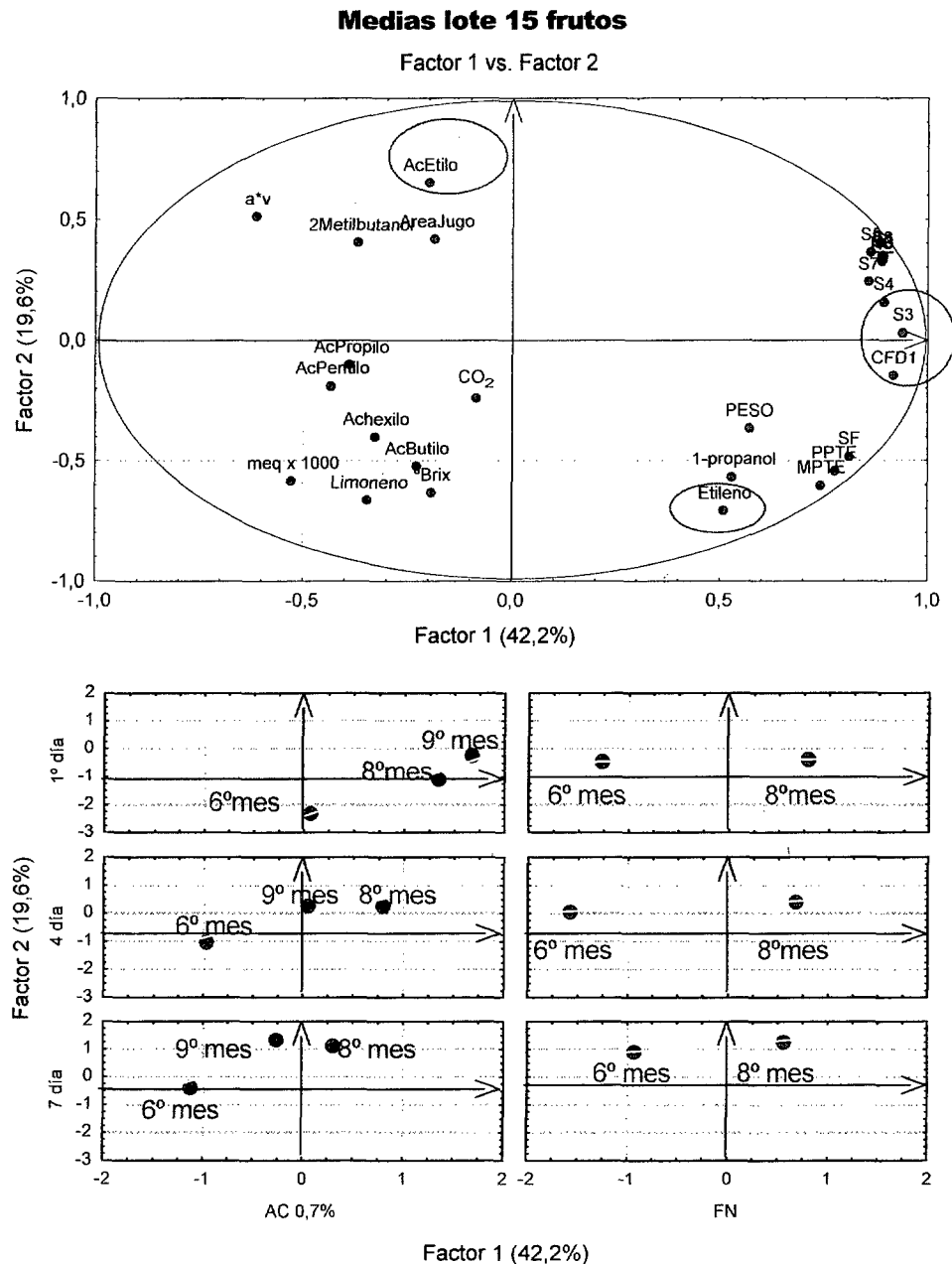
El Factor 2 permite segregar los lotes que han sufrido almacenamiento en frío de los frutos recién cosechados lo que significa que el sensor 7 está reaccionando con algún volátil o volátiles que desaparecen durante el almacenamiento en frío. La Figura 5 (derecha) muestra de nuevo la representación de los individuos agrupados en este caso por periodos de vida en estantería. Sólo para la fruta recién cosechada se puede observar una clara evolución de los volátiles a lo largo de la vida en estantería, como indica el sensor 5, sin embargo, este factor no explica la dispersión de los datos a lo largo del eje secundario definido por los sensores 3 y 4, en este caso estos sensores están reaccionando ante algún efecto desconocido y por tanto no controlado.

#### 8.4.1.3. Comparación de los métodos de referencia con la nariz electrónica

Del análisis de los datos obtenidos por CG tanto de la emisión de compuestos volátiles del aroma como de respiración y emisión de etileno del fruto se observa que los frutos almacenados en las condiciones de AC más estrictas pierden en gran medida la capacidad de emisión aromática, esto implica que conseguir correlaciones entre su emisión de volátiles y la señal de la NE sea muy difícil. Se realiza por ello un ACP considerando exclusivamente los datos correspondientes a los frutos más aromáticos, los almacenados en condiciones de FN y AC 0,7%.

El Factor 1 (var. Expl. 42,28%) está definido por la información aportada por las variables de textura consideradas especialmente por la variable CFD1, por los ocho sensores de la NE sobre todo por S3 y el nivel de corrección aplicado a estos. El gráfico de proyección de los individuos (ver Figura 8-27) muestra como a lo largo de este Factor 1 es posible para los dos tipos de cámaras consideradas diferenciar entre duraciones de almacenamiento menores de 6 meses y mayores (8 y 9 meses), al detectarse para estos últimos mayor respuesta de los sensores. La disminución de la señal de los sensores al aumentar la vida en estantería especialmente entre 1 y 4 días indica que

existe algún volátil que desaparece a lo largo de la maduración en estantería y que permite utilizando la señal de los sensores diferenciar entre ambos tiempos para la fruta almacenada en condiciones de AC 0.7%, siendo prácticamente nula la evolución con la vida en estantería detectada por los sensores para los frutos almacenados en FN.

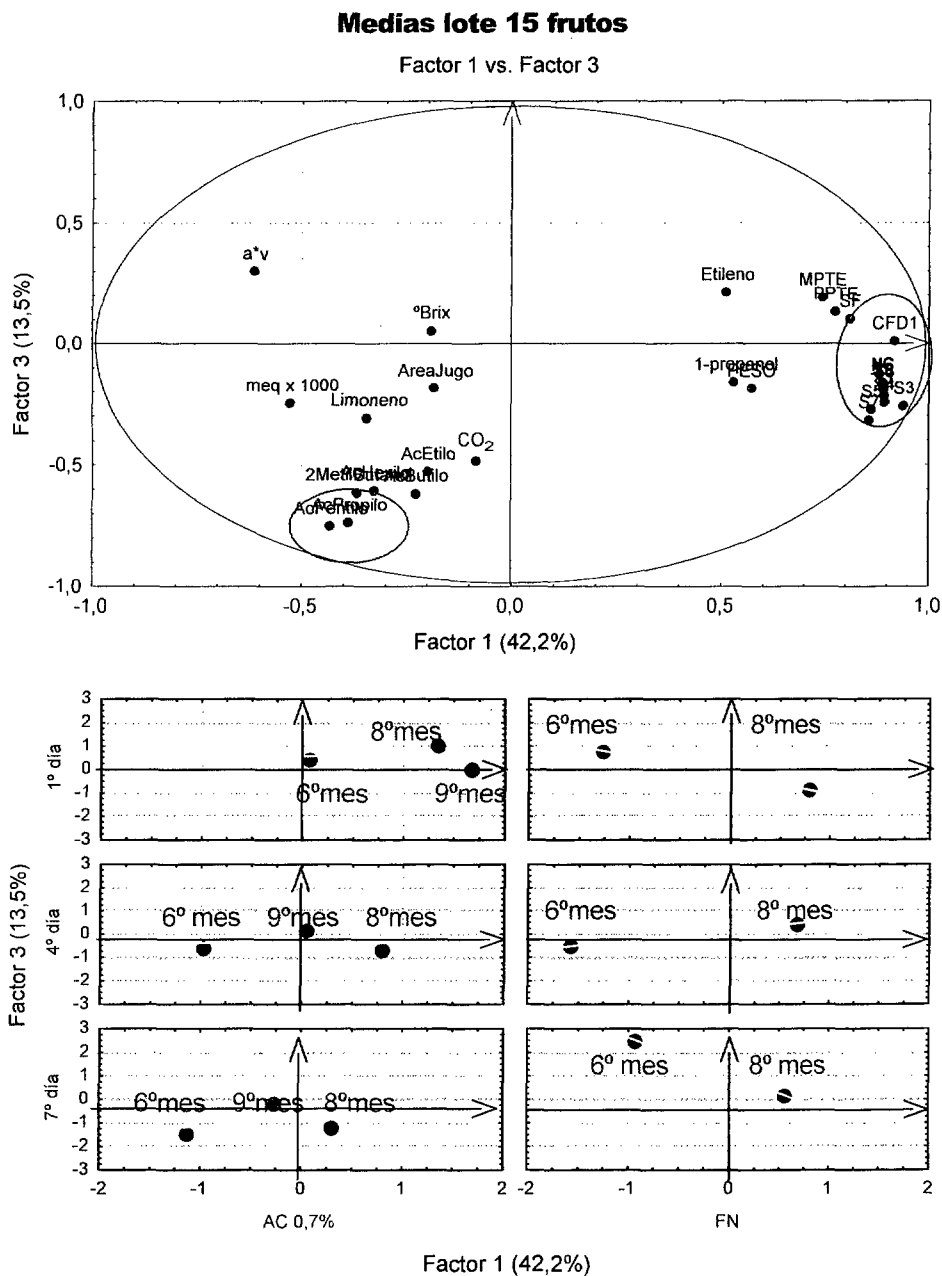


• Figura 8-27: Proyección de las variables (arriba) y proyección de los individuos (abajo), según Factor 1 y Factor 2, en un ACP conjunto de las referencias con los sensores de la NE, sólo para los datos correspondientes a la condición de almacenamiento FN y AC 0.7% donde n=15.

La relevancia de estos resultados queda dañada por la influencia que el NC aplicado tiene sobre la construcción del Factor 1, no hay que olvidar que para poder comparar los datos de la NE con los

de la CG es necesario hacer medias por lote y día de trabajo de ahí la influencia del NC en todas aquellos análisis realizados según día de trabajo.

El Factor 2 (var.expl. 19,6%) está definido positivamente por la emisión del éster acetato de etilo que se correlaciona negativamente con la emisión de etileno ( $r = -0,6$ ). El análisis de este Factor indica que al aumentar el tiempo de almacenamiento en cámara de 6 a 8 meses se detecta un incremento en la emisión de acetato de etilo para los frutos almacenados en AC0,7% que permite la segregación de los grupos.



• Figura 8-28: Proyección de las variables (arriba) y proyección de los individuos (abajo), según Factor 1 y Factor 3, en un ACP conjunto de las referencias con los sensores de la NE, sólo para los datos correspondientes a la condición de almacenamiento FN y AC 0,7% con  $n=15$ .

Los ésteres acetato de propilo y pentilo definen negativamente (ver Figura 8-28) el Factor 3 (var.expl.13.5%) y teniendo en cuenta que el Factor 2 se caracteriza con el acetato de etilo y el etileno, se puede decir que en general la información aportada por los sensores de la NE (Factor 1) es independiente de aquella obtenida por análisis del espacio de cabeza por cromatografía de gases, llamando la atención especialmente la no contribución del acetato de hexilo en la construcción de ninguno de los tres ejes puesto que es uno de los volátiles más abundantes en el espacio de cabeza así como su falta de correlación con las variables de la NE.

#### **8.4.2. Experimento II.B (1ª campaña). Determinación de la calidad aromática en manzana cv Fuji.**

##### **8.4.2.1. Determinación del estado de madurez de la fruta por métodos de referencia**

###### **➤ Peso, color y textura**

El peso medio del fruto pasa de 288.8 g a 230 g después de 10 días de maduración en estantería lo que supone una pérdida media de peso del 20%, pérdida de peso que se hace notable para tiempos de vida en estantería superiores a 5 días.

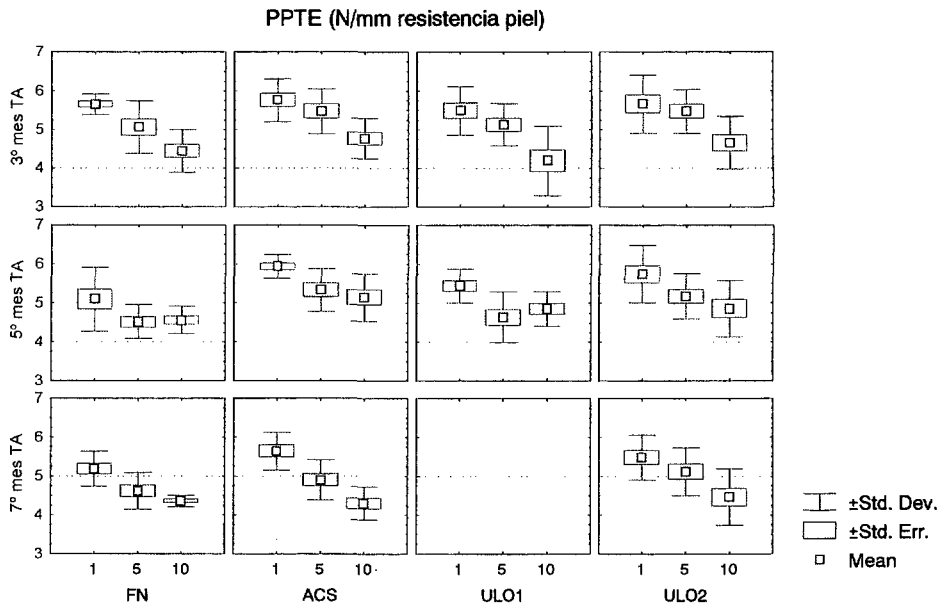
La variedad Fuji se comporta de forma muy estable en cuanto a la evolución del color no existiendo cambios significativos en el mismo que indiquen degradación de la clorofila (variación de la coordenada  $a^*$ ), con el tiempo o tipo de almacenamiento o a lo largo de la vida en estantería. Si existe sin embargo una cierta evolución hacia una pigmentación más amarilla, cuantificada a través de la evolución de la coordenada  $b^*$  desde valores negativos (azul) a positivos (amarillo), especialmente a lo largo de la vida en estantería ( $F=15$ ), pero también para periodos de almacenamiento superiores a los 5 meses ( $F=7$ ).

El ensayo de punción de la piel (ver Figura 8-29) indica que la resistencia de la piel del fruto (estimada a través de la variable PPTE) disminuye significativamente ( $F=50$ ) al aumentar el tiempo de vida en estantería, factor este que interacciona con el tipo de almacenamiento, de forma que son los frutos almacenados en condiciones de FN los que presentan menor resistencia de la piel, y aquellos mantenidos en ACS los que mantienen mayor resistencia a lo largo de la vida en estantería.

La firmeza del fruto determinada a través de la medida de resistencia a la penetración (variable MF, ensayo Magness Taylor), indica que esta evoluciona fundamentalmente en función del tipo de almacenamiento ( $F=20$ ) pero también a lo largo del tiempo de maduración en estantería ( $F=13$ ).

La fruta almacenada en condiciones de FN presenta valores similares de firmeza para los distintos tiempos de estancia en cámara o en estantería, mostrando los frutos una tendencia a

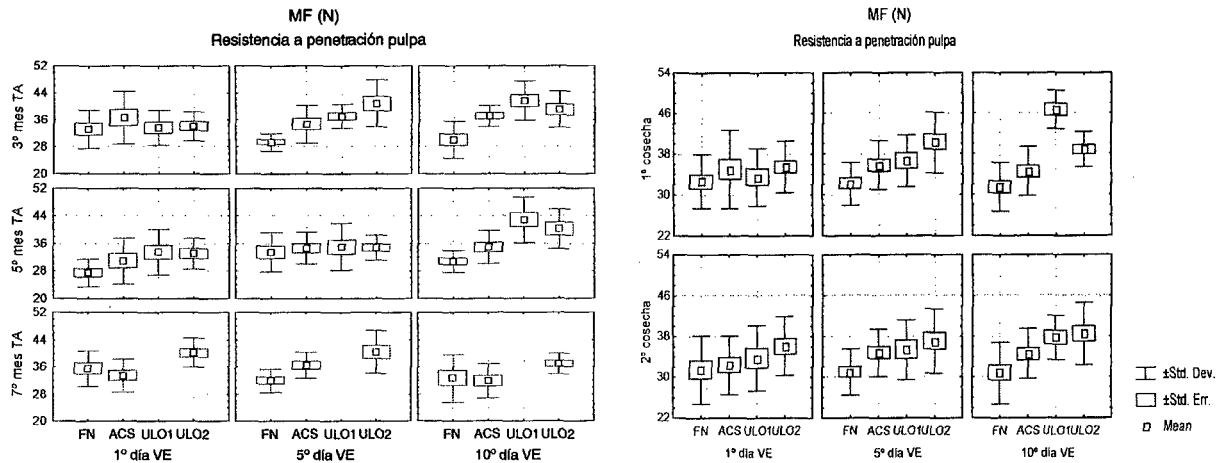
aumentar su firmeza para periodos de almacenamiento superiores a 5 meses. Esta tendencia es más significativa en el caso de las AC.



• Figura 8-29: Representación gráfica del resultado del análisis ANOVA para la variable de textura PPTE. Se ha considerado la media de las dos cosechas por resultar este factor no significativo en el análisis de varianza.

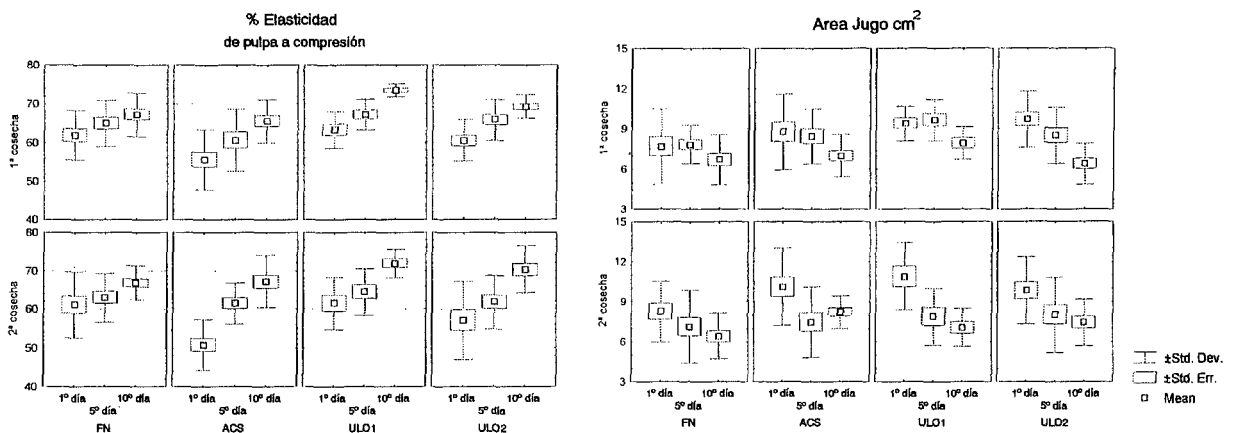
La influencia que el tipo de almacenamiento produce sobre la evolución de la firmeza del fruto es significativa para tiempos de maduración en estantería superiores a 5 días. En general la fruta conservada en condiciones de AC mantiene valores de firmeza más altos que la fruta almacenada en cámaras a FN. Se observa (ver Figura 8-30) sin embargo, que mientras que los frutos que se han mantenido bajo los tipos de almacenamientos menos efectivos (correspondientes a FN y ACS) no evolucionan a lo largo de la estancia en estantería, los frutos almacenados en condiciones de bajo oxígeno (las más restrictivas) responden aumentando claramente su firmeza al aumentar el tiempo de maduración en estantería.

Este efecto se puede explicar a través de la medida de la jugosidad del fruto estimada como la variable área de jugo determinada en el ensayo de compresión confinada. Los frutos almacenados en condiciones de FN y ACS son los que a la salida de cámara presentan menor jugosidad, esto hace que la pérdida de jugosidad a lo largo de la vida en estantería, en estos dos tipos de almacenamiento, sea menos acentuada que la correspondiente a las cámaras de ULO, así mientras que las primeras mantienen valores de firmeza similares a lo largo de la vida en estantería, las segundas manifiestan al aumentar la VE una mayor firmeza como consecuencia de una mayor ritmo de pérdida de jugosidad.



• Figura 8-30: Evolución de la variable de textura MF a lo largo de tres días de VE, tres TA, cuatro CA y dos cosechas.

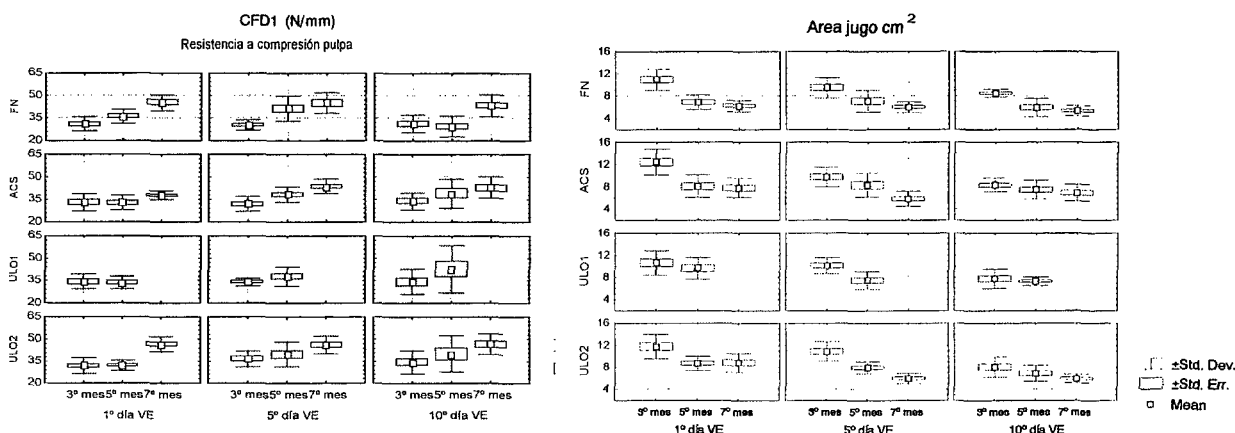
En general la disminución de la jugosidad y el aumento de la firmeza a lo largo de la vida en estantería se puede observar también a través de la variación del grado de elasticidad (% elasticidad) de la pulpa (ver Figura 8-31). Al finalizar la maduración en estantería el grado de elasticidad de la pulpa alcanza su valor máximo, el mayor aumento se corresponde a los frutos almacenados en condiciones de ULO y el menor para aquellos almacenados en condiciones de FN. Estos resultados no son muy coherentes con lo esperado.



• Figura 8-31: Representación gráfica del resultado del análisis ANOVA para las variables % elasticidad (izq.) y área de jugo (drcha). Se ha considerado la media de los tres TA por resultar no relevantes.

El tiempo de almacenamiento tiene un efecto significativo sobre la variación de la dureza de la pulpa a la compresión (CFD1,  $F=32$ ) y especialmente sobre la jugosidad del fruto (área de jugo,  $F=124$ ). Esto implica que tras la salida de cámara los frutos se mantienen más duros (más compactos) cuanto mayor sea el tiempo de almacenamiento, lo que parece deberse a la pérdida de jugosidad que experimentan los frutos al aumentar el tiempo de almacenamiento (ver Figura 8-32).





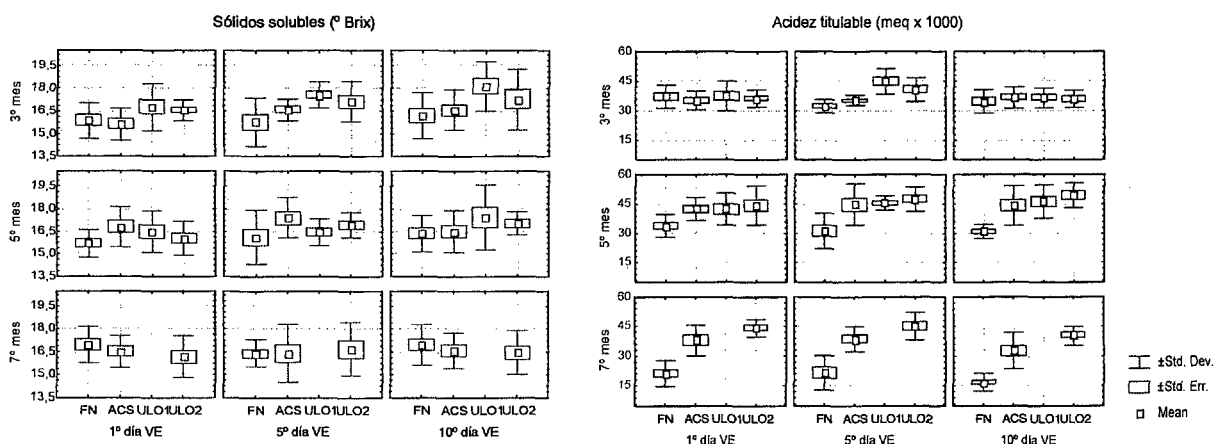
• Figura 8-32: Representación gráfica del resultado del análisis ANOVA para la variable de textura CFD1 y la variable área de jugo. Se ha considerado la media de las dos cosechas por resultar este factor no significativo en el análisis de varianza para la variable área de jugo y poco relevante para la variable CFD1..

En general de los cuatro factores considerados en el análisis son la vida en estantería y el tiempo de almacenamiento en cámara los que introducen mayor variabilidad sobre el conjunto de los datos, el tipo de almacenamiento se convierte en uno de los factores que menos variabilidad introduce sobre los parámetros para la estimación de la textura y el de menor importancia de todos es la fecha de recolección, pareciendo que una separación entre cosechas de 9 días no es suficiente para introducir elevada variabilidad entre lotes.

➤ **Calidad organoléptica (sólidos solubles y acidez titulable)**

Se observa que a lo largo de la vida en estantería los sólidos en disolución aumentan a pesar de la pérdida de peso de peso que experimenta el fruto al mismo tiempo, variando así mismo significativamente con el tipo de almacenamiento para períodos de maduración en estantería superiores a 5 días, siendo los frutos mantenidos en condiciones de ULO1 los que presentan al finalizar los 10 días de estancia en estantería mayor contenido en sólidos solubles y los correspondientes a FN los de menor °Brix.

A lo largo del tiempo de almacenamiento el contenido en sólidos solubles en el fruto tiende a disminuir en las cámaras de AC, lo que indicaría la capacidad de estas para mantener en el fruto tasas elevadas de respiración aún tras largos períodos de almacenamiento, la excepción la constituyen los frutos mantenidos en condiciones de FN en los que se registra a partir de los 5 meses de almacenamiento un aumento en °Brix, que no se ve compensado con la pérdida de agua del fruto. El efecto del tipo de almacenamiento se diluye para almacenamientos prolongados, almacenamientos menores a tres meses mantienen un nivel máximo de sólidos solubles para las cámaras correspondientes a ULO y un nivel mínimo en los frutos almacenados en condiciones de FN (ver Figura 8-33).



• Figura 8-33: Representación gráfica del resultado del análisis ANOVA para las variables sólidos solubles (izq) y acidez titulable(drcha). Se ha considerado la media de las dos cosechas por resultar este factor no significativo en el análisis de varianza.

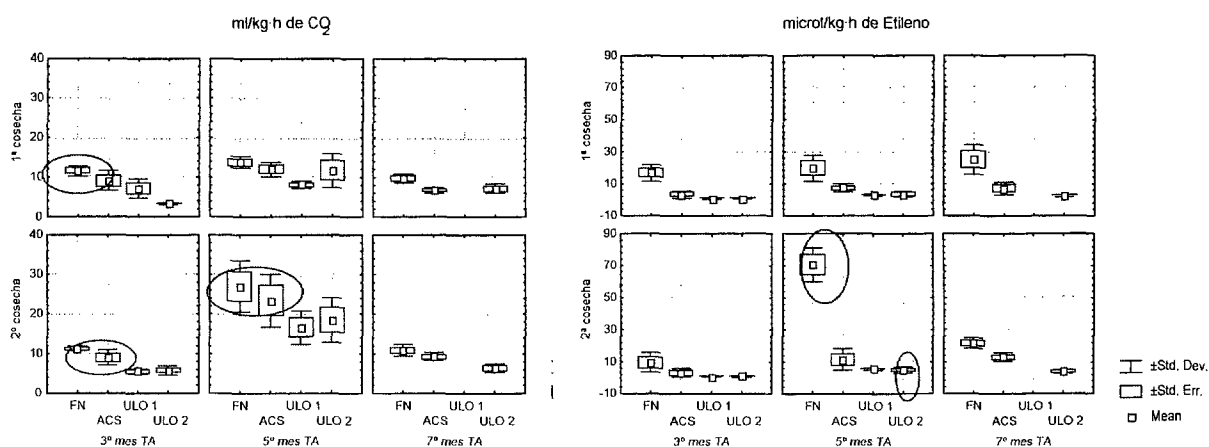
La acidez del fruto almacenado en condiciones de FN disminuye claramente al aumentar el tiempo de almacenamiento en cámara, efecto este que no se detecta en los frutos conservados en condiciones de ACS. Esto hace que al aumentar el tiempo de almacenamiento aumenten las diferencias debidas al almacenamiento bajo distintas condiciones, siendo los almacenamientos en condiciones de ULO los que mantienen niveles más altos de acidez y lo correspondientes a FN los niveles más bajos (ver Figura 8-33).

En general la combinación de un elevado contenido en sólidos solubles ( $M=16.6$  °Brix) con una elevada acidez titulable ( $M=37.5$  meq x 1000) convierten a esta variedad en un cultivar muy apreciado por presentar una elevada calidad organoléptica, calidad que se mantiene especialmente para frutos almacenados en condiciones de ULO cuando se emplean tiempos de almacenamiento prolongados.

### ➤ Respiración y emisión de etileno

La tasa de respiración de la fruta varía fundamentalmente ( $F=77.8$ ) con el tiempo de almacenamiento, el segundo factor en importancia es la fecha de recolección ( $F=27.3$ ) seguido del tipo de almacenamiento ( $F=10.3$ ), siendo mínimo y no significativo el efecto del tiempo de maduración en estantería.

La efectividad del almacenamiento para limitar la respiración y por tanto maduración del fruto va disminuyendo a medida que aumenta el tiempo de almacenamiento hasta alcanzar un valor máximo de tasa de respiración tras la salida de cámara a los 5 meses de almacenamiento. Sin embargo parece que almacenamiento superiores a 5 meses impiden la recuperación de las tasas de respiración y por tanto la normal maduración del fruto tras la salida de cámara (ver Figura 8-34).



• Figura 8-34: Evolución de la respiración del fruto(izq.) y emisión de etileno (drcha) a largo de tres TA para cuatro CA y dos cosechas. Se ha considerado la media de los tres tiempos de VE por resultar este factor no significativo en el análisis de varianza.

En cuanto a la emisión de etileno se encuentra que aunque el efecto del tiempo de almacenamiento sigue siendo significativo ( $F=77.6$ ) es especialmente el tipo de almacenamiento el factor que introduce mayor variabilidad en el conjunto de los datos ( $F=99.9$ ). Así para tiempos de almacenamientos superiores a 3 meses se detecta un incremento en la tasa de emisión de etileno, manteniéndose valores de emisión más o menos constantes a lo largo de 5 y 7 meses de almacenamiento, para la fruta mantenida en condiciones de AC. La excepción se corresponde con la cámara de FN que tras alcanzar un máximo de emisión de etileno a los 5 meses de almacenamiento, vuelve a valores bajos para almacenamientos más prolongados.

Se observa también que son los frutos correspondientes a la segunda cosecha los que presentan mayores tasas de respiración y emisión de etileno, especialmente para los frutos almacenados en condiciones de FN y para tiempos de almacenamiento entre 3 y 5 meses.

Ya sea en relación a la emisión de etileno como a la tasa de respiración, son las cámaras más restrictivas las correspondientes a ULO1 y ULO2, las que mantienen los valores mínimos certificándose así su máxima eficacia en el control o limitación de la evolución del fruto a lo largo del tiempo de almacenamiento, siendo por el contrario la cámara de FN la más ineficaz en esta tarea de control de la maduración

### ➤ Cromatografía de gases

El análisis cromatográfico de las emisiones aromáticas, realizado por el equipo de investigación del IRTA, permite la identificación y cuantificación de 32 compuestos volátiles, de los cuales una media del 87% son ésteres (2-metilbutanoato de butilo, 2-metilbutanoato de etilo, 2-metilbutanoato de hexilo, acetato de 2-metilbutilo, acetato de 2-metilpropilo, acetato de butilo, acetato de etilo, acetato de hexilo, acetato de metilo, acetato de pentilo, acetato de propilo, butanoato de butilo,

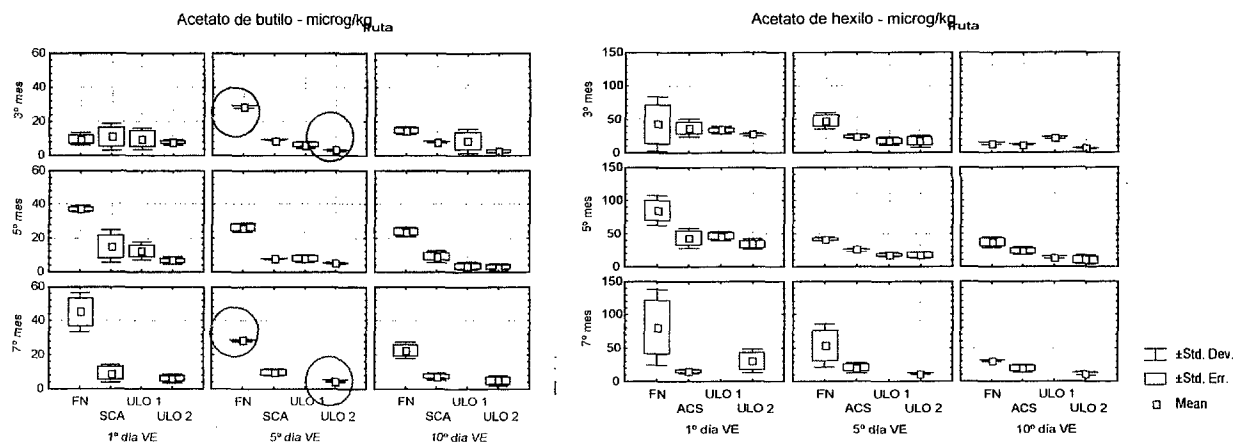
butanoato de etilo, butanoato de hexilo, hexanoato de butilo, hexanoato de etilo, propanoato de butilo, propanoato de hexilo y propanoato de tert-butilo), el 10% alcoholes (E-2-hexenol, 1-butanol, 1-hexanol, 1-propanol, 2-metil-1-butanol, 2-metil-1-propanol, 4-metil-2-pentanol, etanol y pentanol) y el 3% restante se debe a la presencia de algunos aldehídos (acetaldehído y hexanal), al terpeno D-limoneno y a la cetona heptanona.

Los ésteres se convierten así en los componentes mayoritarios del espacio de cabeza generado por la variedad de manzana Fuji, lo que permite clasificar a este cultivar según la clasificación propuesta por (López et al. 1998a) como "Tipo Ester". Los volátiles predominantes son los acetatos de butilo, hexilo y 2-metilbutilo, el butanoato de etilo y el 2-metilbutanoato de etilo que en conjunto suponen el 70% del total de volátiles emitidos. El acetato de 2-metilbutilo, al que corresponden el 23% del total de ésteres emitidos, se convierte en el compuesto mayoritario del aroma de esta variedad, predominancia que no sólo se manifiesta en el cultivar Fuji si no que es característica en manzanas Bisbee Delicious y Starking Delicious, apareciendo en el resto de variedades mencionadas en la bibliografía aunque en menores proporciones (ver Tabla 4-4)

El efecto combinado de la elevada concentración media (en relación al resto de volátiles) que alcanzan el acetato de 2-metilbutilo (54.87  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) y el acetato de hexilo (32.84  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) en el espacio de cabeza, unido al bajo umbral de olor de ambos compuestos, 0.005 y 0.002  $\text{mg}/\text{kg}$  respectivamente (Flath et al. 1967), convierte a estos dos volátiles, en compuestos impacto del aroma de las manzanas Fuji.

El acetato de hexilo, con una valor aromático de 16.4 (adimensional, ppm/ppm) y un olor que se describe como "a manzana" según (Rizzolo and Polesello 1989), es el compuesto con mayor incidencia en la caracterización del aroma de la variedad Fuji. Mientras el acetato de 2-metilbutilo, con un valor aromático de 11 y un olor que (Young et al. 1996) describen como "a manzana roja" se convertiría en el segundo compuesto impacto de la variedad.

El tipo de almacenamiento es el factor que introduce mayor variación en la emisión aromática de los frutos. El efecto del tipo de almacenamiento se observa fundamentalmente en la evolución de la emisión de uno de los ésteres predominantes, el acetato de butilo ( $F=144$ ). A partir de los 5 días de maduración en estantería para almacenamientos cortos e inmediatamente tras la salida de cámara en almacenamientos prolongados, la máxima emisión corresponde a los frutos almacenados en condiciones de FN mientras que los valores mínimos se corresponden con las cámaras de ULO (ver Figura 8-35), efecto encontrado en otras variedades de manzana como Golen Delicious por (Mattheis, Buchanan, and Fellman J.K. 1995). Para almacenamientos cortos es la fruta almacenada en FN la que presenta una evolución a lo largo de la vida en estantería, alcanzando su valor máximo de emisión de volátiles a los 5 días de maduración en estantería, evolución prácticamente inexistente para las AC.

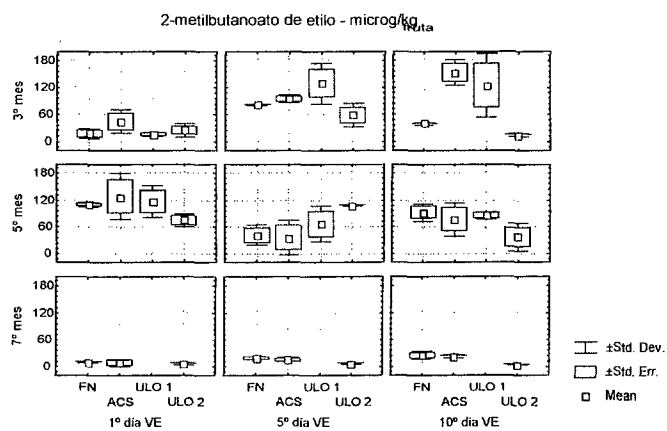


• Figura 8-35: Evolución de la emisión de acetato de butilo(izq.) y acetato de hexilo (drcha) a lo largo de tres TA para cuatro CA y tres tiempos de VE. Se ha considerado la media de las dos cosechas por resultar este factor no significativo en el análisis de varianza.

Esto indica que las condiciones de almacenamiento en AC limitan la capacidad de maduración típica en cuanto a la emisión aromática del fruto durante la vida en estantería, no observándose para ninguno de los tiempos de almacenamiento considerados una clara evolución a lo largo de la vida en estantería, lo que podría deberse a que este tipo de condiciones de almacenamiento no favorece la producción de ésteres de cadena ramificada durante la vida en estantería ((Lavilla et al. 1999).

Para almacenamientos de 5 o más meses en cámaras de FN, la fruta de madurez más avanzada alcanza sus niveles de emisión más altos inmediatamente tras la salida de cámara, emisión que va disminuyendo a lo largo de la vida en estantería.

El 2-metilbutanoato de etilo, uno de los compuestos predominantes en el aroma de la variedad Fuji y a diferencia de los compuestos anteriormente citados, está afectado fundamentalmente por el tiempo de almacenamiento ( $F=51.3$ ). Se observa así que para almacenamientos cortos (3 meses), el fruto es capaz de evolucionar y madurar adecuadamente a lo largo de la vida en estantería, alcanzando al final de la misma la máxima emisión de este compuesto (ver Figura 8-36).



• Figura 8-36: Evolución de la emisión de 2-metilbutanoato de etilo a lo largo de tres TA para cuatro CA y tres tiempos de VE. Se ha considerado la media de las dos cosechas por resultar este factor no significativo en el análisis de varianza.

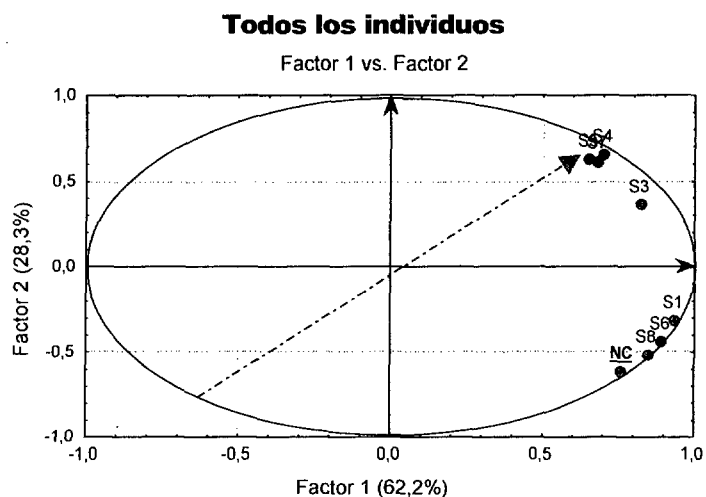
Para almacenamientos prolongados, pero no superiores a 5 meses, el fruto alcanza inmediatamente tras la salida de cámara la máxima emisión, comportamiento indicativo de que el fruto ha sufrido una evolución a lo largo del tiempo de almacenamiento de forma que su estado de

maduración es más avanzado. Para almacenamientos superiores a 5 meses, el fruto parece perder la capacidad de evolucionar a lo largo de la vida en estantería, registrándose tras 7 meses de almacenamiento la mínima emisión de 2-metilbutanoato de etilo, emisión que permanece prácticamente invariable durante el tiempo de maduración en estantería. En las variedades Starking y Golden Delicious el límite está también a 5 meses de almacenamiento, de forma que periodos de almacenamiento más prolongados se traducen en un descenso de la emisión aromática (López et al. 1998b) y (López et al. 1998a).

#### 8.4.2.2. Nariz electrónica

El análisis ACP realizado sobre los datos obtenidos mediante la nariz electrónica a los que se ha aplicado previamente una corrección aditiva entre secuencias o días de ensayo, permite la determinación de los dos factores que definen este ACP.

El Factor 1 (var.expl. 62,2%) está definido principalmente por la información aportada por los sensores S3, S1, S6, S8 junto con la variable correspondiente al NC aplicado que afecta fundamentalmente, al igual que ocurría al analizar los datos correspondientes a la Doyenne du Comice, a los sensores S1, S6 y S8 (ver Figura 8-37).



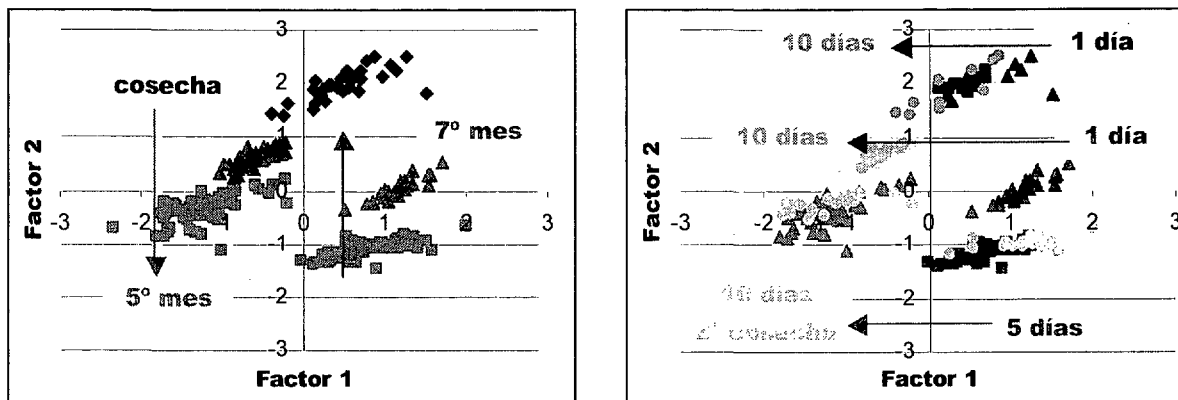
• Figura 8-37: Proyección de las variables en un ACP sobre Experimento II.B (1ª campaña), con manzanas Fuji (n=240). Se ha aplicado corrección aditiva

El segundo Factor (var.expl. 28,3%) está correlacionado con los sensores S4, S5 y S7 que aportan por tanto una información diferente a aquella correspondiente al grupo de sensores anterior y por tanto del NC.

A lo largo del eje definido por el Factor 2 se puede diferenciar entre tres periodos, la cosecha y los dos tiempos de almacenamiento considerados correspondientes a 5 y 7 meses de forma que al igual que en la pera cv Doyenne du Comice la NE está detectando algún volátil que desaparece con el almacenamiento frigorífico. Se observa además una variación intralote según el eje secundario determinado por estos sensores cuyo origen no se ha determinado.

Los sensores S3, S1, S6 y S8 aportan una información complementaria a aquella correspondiente a los sensores S4, S5 y S7, de forma que a lo largo del Factor 1 se observa la evolución de las condiciones del fruto a lo largo del tiempo de maduración en estantería desde 1 día

hasta los 10 días de estancia máxima considerados en el análisis. Diferenciación esta última, que si bien es de mayor interés que la obtenida a lo largo del Factor 2, está influida por el nivel de corrección aplicado.



• Figura 8-38: Proyección de los individuos en una ACP sobre Experimento II.B (1ª campaña), con manzanas Fuji (n=240) en el que se evalúan tiempo de almacenamiento en cámara y días de vida en estantería. Se ha aplicado corrección aditiva.

Resaltar así mismo que la fragmentación observada en el lote correspondiente a los frutos almacenados durante 5 meses tras 10 días de VE se debe al efecto de la fecha de recolección, de forma que los frutos cosechados más tardíamente tras 10 días de VE provocan una menor respuesta de los sensores que los correspondientes a la 1ª cosecha.

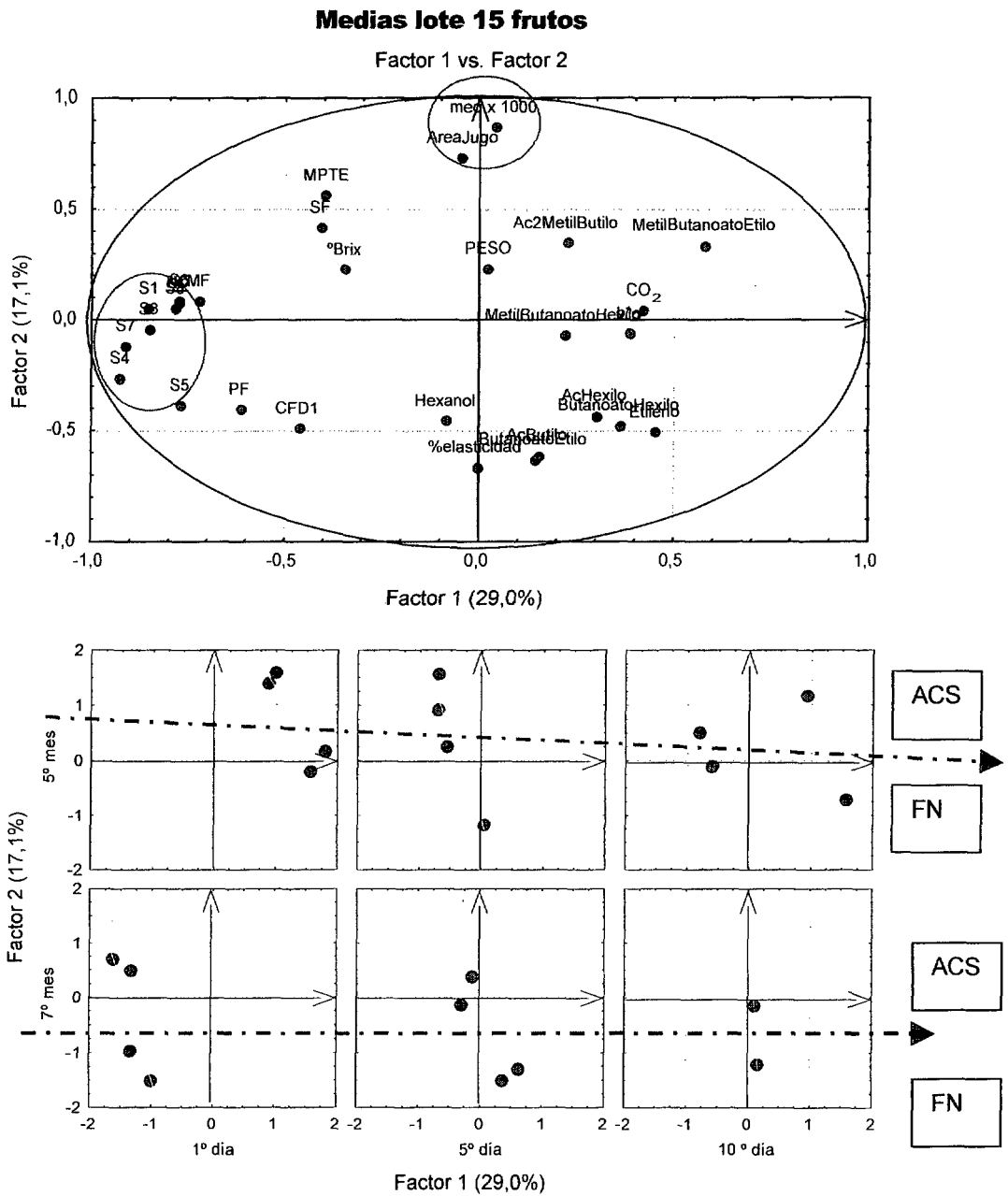
#### 8.4.2.3. Comparación de los métodos de referencia con la nariz electrónica

Las bajas tasas de respiración y emisión de volátiles que se han detectado y explicado en apartados anteriores en los frutos almacenados bajo los distintos tipos de AC estudiadas hace interesante buscar correlaciones entre las variables de referencia y aquellas de la NE pero sólo para los frutos almacenados en condiciones de FN y ACS, siguiendo el mismo razonamiento para los análisis que el que ya se ha aplicado para la pera Doyenne du Comice.

El ACP realizado permite definir tres Factores o componentes principales. El Factor 1 (var.expl. 29,0%) está caracterizado por las variables de textura MF y PF, por la información de los sensores de la NE fundamentalmente S4 y S7 y por el NC (ver Figura 8-39). Se observa que la señal de los sensores aumenta al aumentar el tiempo de vida en estantería especialmente tras 7 meses de almacenamiento en cámara que permite diferenciar claramente entre 1, 4 y 7 días de vida en estantería. La influencia del NC aplicado día a día sobre los sensores implica que esta capacidad de diferenciación de los sensores quede en entredicho.

El Factor 2 con una varianza explicada del 17.1% está caracterizado positivamente por las variables área de jugo y acidez titulable que al presentar valores más elevados para los frutos

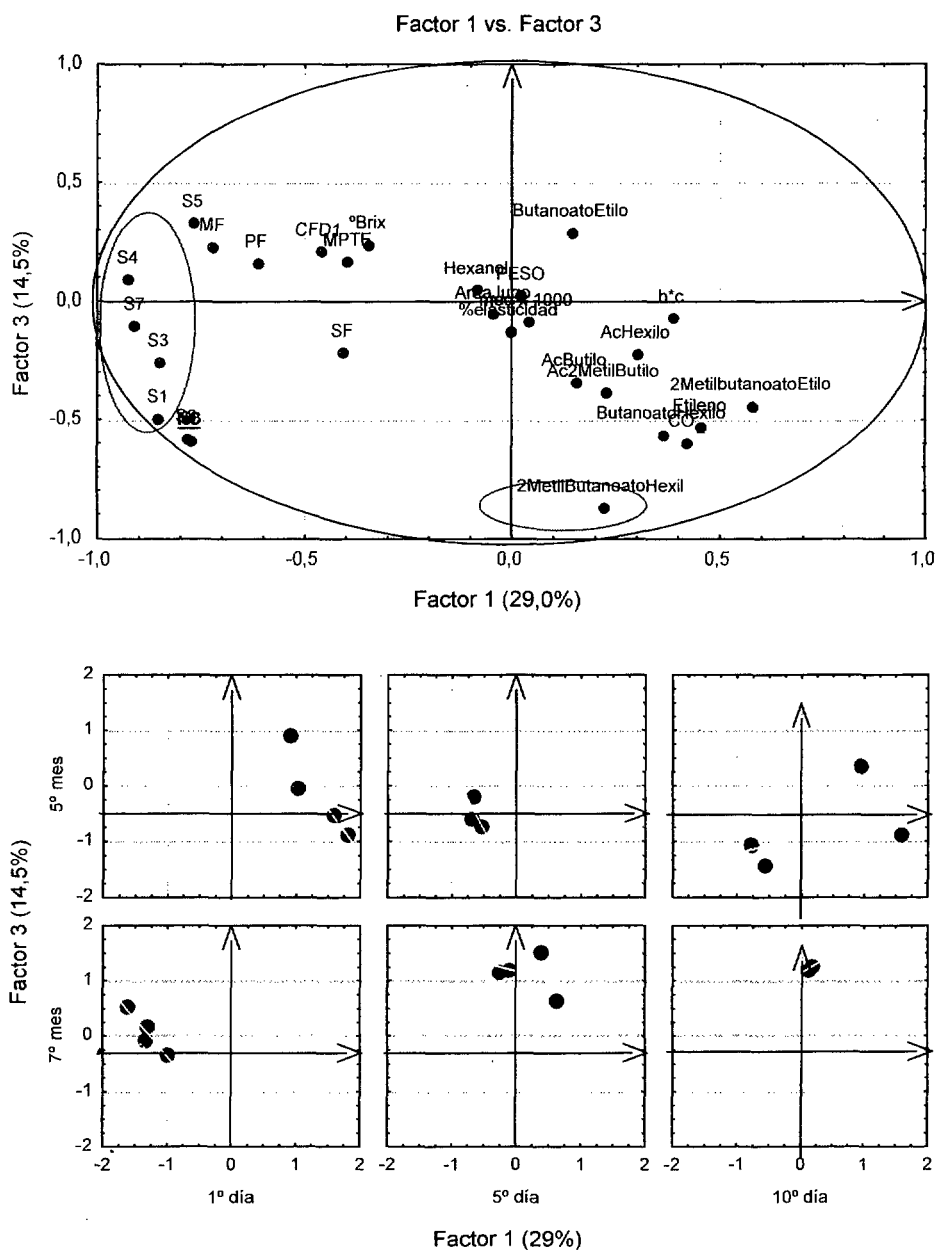
conservados en ACS permite diferenciarlos claramente de los conservados en condiciones de FN, a lo largo de este eje (ver Figura 8-39).



• Figura 8-39: Proyección de las variables (arriba) y proyección de los individuos (abajo), según Factor 1 y Factor 2, en un ACP conjunto de las referencias con los sensores de la NE, sólo para los datos correspondientes a las condiciones de almacenamiento FN y ACS, con  $n=22$ .

El tercer Factor (var.expl. 14.5%) está determinado por la emisión de 2-metil butanoato de hexilo (ver Figura 8-40), un éster poco abundante en el aroma de la variedad Fuji.





• Figura 8-40: Proyección de las variables, según Factor 1 y Factor 3, en un ACP conjunto de las referencias con los sensores de la NE, sólo para los datos correspondientes a la condición de almacenamiento FN

Al igual que lo encontrado en la pera Doyenne du Comice la señal de los sensores de la NE se mantiene independiente de la información correspondiente a la CG, siendo importante resaltar que ninguno de los volátiles importantes en el aroma de la variedad define alguno de los tres factores del ACP, especialmente en lo que se refiere al acetato de hexilo y el acetato de 2-metilbutilo los más importantes cuantitativa y cualitativamente hablando que sin embargo se mantiene en posiciones centrales del círculo de correlación.

### 8.4.3. Experimento II.B (2ª campaña). Determinación de la calidad aromática en manzana cv Fuji.

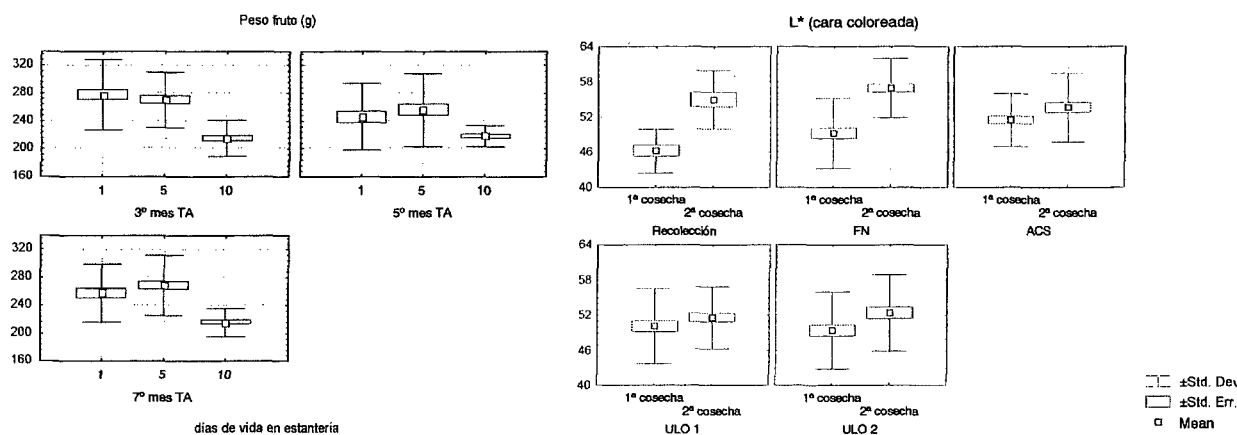
El cambio en las condiciones de generación y medida del espacio de cabeza con la nariz electrónica durante esta segunda campaña obliga a analizar por separado las matrices de datos correspondientes a una y otra. En el Anejo III se presenta una tabla comparativa de las variables más significativas en ambas campañas (99-00 y 00-01).

#### 8.4.3.1. Determinación del estado de madurez de la fruta por métodos de referencia

##### ➤ Peso, color y textura

En esta segunda campaña el peso medio del fruto disminuye significativamente a lo largo de la vida en estantería ( $F=55$ ) desde 263 g a 216 g tras 10 días de estancia en estantería, esto supone una pérdida de peso del 18%, que se experimenta para períodos de maduración en estantería superiores a 5 días (ver Figura 8-41).

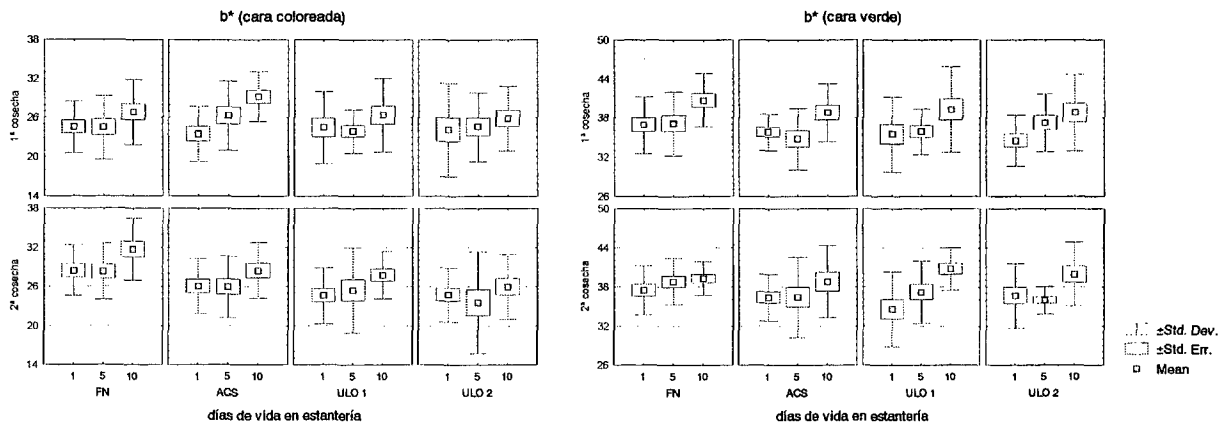
En el momento de la recolección la cosecha más temprana se diferencia significativamente de la cosecha más tardía fundamentalmente en el color de la piel. Esa diferencia se manifiesta en una menor contenido en clorofila ( $\downarrow a^*$ ), una mayor proporción de pigmentos amarillos ( $\uparrow b^*$ ) y fundamentalmente en la evolución de la coordenada de color  $L^*$  medida sobre la cara coloreada del fruto, que es mayor para la fruta recolectada más tardíamente (frutos más brillantes).



- Figura 8-41: Evolución del peso del fruto a lo largo de tres TA, tres tiempos de VE y dos FR. El factor CA no se incluye por resultar no significativo.
- Figura 8-42: Evolución de la coordenada de color  $L^*$  en función de la fecha de recolección y CA. Los factores VE y TA no se consideran por resultar no significativos.

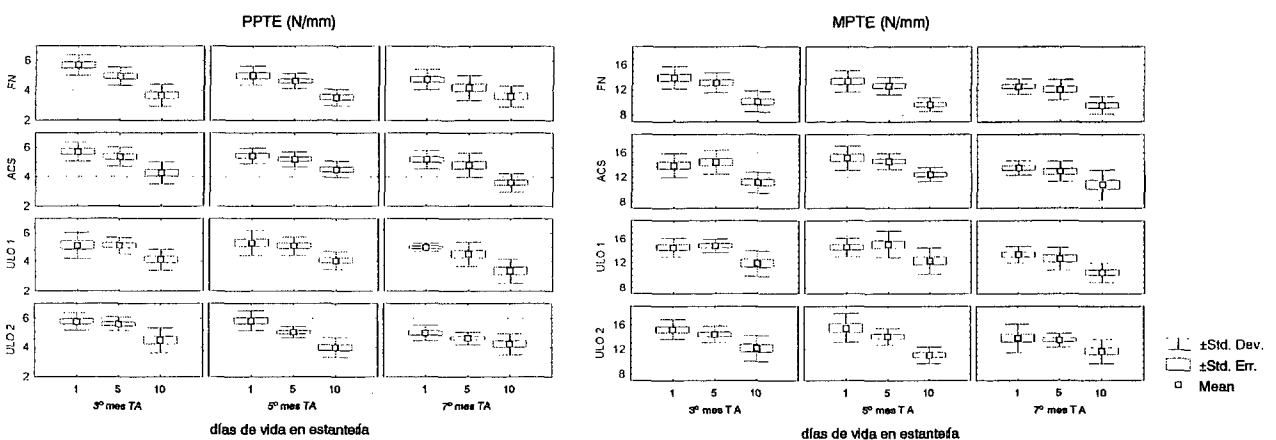
El nivel de clorofila en la piel del fruto prácticamente no se ve afectada por los factores de análisis considerados, si que existe sin embargo una evolución del color en cuanto a la pigmentación amarilla que presenta el fruto. Esta evolución es especialmente significativa a lo largo de la vida en estantería alcanzándose los valores más elevados de la coordenada  $b^*$  tras 10 días de estancia en

estantería, especialmente para los frutos conservados en condiciones de FN. La evolución del color con el tiempo de vida en estantería es mínima para los frutos conservados en condiciones de ULO.



• Figura 8-43: Evolución de la coordenada de color  $b^*$  medida sobre la chapa coloreada y sobre el color de fondo del fruto a lo largo de tres tiempos de VE para las dos FR y cuatro CA considerados. El factor TA no se ha considerado por resultar poco relevante en el análisis de varianza.

El factor que introduce mayor variabilidad en cuanto a la textura de los frutos es el tiempo de vida en estantería. Así tanto la resistencia de la piel ( $F_{PTE} = 143$ ) como la firmeza de la pulpa ( $F_{MPTE} = 112$ ) disminuyen a lo largo de la vida en estantería, para alcanzar los valores mínimos tras 10 días de maduración ablandamiento general que se hace apreciable especialmente para tiempos de estancia en estantería superiores a 5 días. Este ablandamiento de la pulpa y disminución de la resistencia de la piel no solo se da al aumentar el número de días de vida en estantería sino que también es consecuencia del aumento del tiempo de almacenamiento, que se convierte en el segundo factor en importancia en cuanto a su influencia sobre la evolución de la textura del fruto.



• Figura 8-44: Evolución de las variables de textura PPTE (resistencia de la piel) y MPTE (firmeza de la pulpa) a lo largo de tres TA, tres tiempo de VE y cuatro CA. El factor FR no se considera por resultar no relevante

El tipo de almacenamiento es el factor con menor influencia a pesar de lo cual si es posible apreciar ciertas diferencias en función de las características del almacenamiento al que ha sido sometido el fruto. Se observa así que la cámara menos eficaz en el control de la maduración es la

correspondiente a FN cuyos frutos presentan los valores de firmeza, estimados a través de la variable MPTE, más bajos tanto a lo largo de la vida en estantería como a lo largo de los distintos tiempos de almacenamiento considerados. Son así las condiciones de AC las más eficaces en el mantenimiento de la firmeza del fruto destacando especialmente la cámara ULO2 cuyos frutos son los que presentan valores de firmeza más elevados tras periodos de almacenamiento muy largos (7 meses) y tiempos de maduración en estantería de 10 días.

Hay que resaltar que durante esta campaña desaparece la extraña tendencia de evolución de la firmeza de la pulpa del fruto encontrada en la campaña 99-00 a lo largo del tiempo de almacenamiento de forma que en la presente campaña y como en principio era lo esperable, el fruto se ablanda al aumentar los meses de almacenamiento en cámara (ver Tabla 8-9), aunque también es necesario reseñar que el rango de los valores de la variable CFD1 es muy distinta en la campaña 99-00 ( $M_{CFD1} = 37.5$  N/mm) en relación con la campaña 00-01 ( $M_{CFD1} = 45.7$  N/mm) de frutos más duros.

TA (meses)	CA	CFD1 (N/mm)	
		99-00	00-01
3	FN	30,9	45,1
	ACS	32,8	45,5
	ULO 1	34,1	50,5
	ULO 2	34,3	47,1
5	FN	35,6	46,5
	ACS	36,8	43,5
	ULO 1	37,9	49,2
	ULO 2	37,3	45,6
7	FN	44,5	45,1
	ACS	41,6	40,8
	ULO 1		45,8
	ULO 2	46,5	43,3

• Tabla 8-9: comparativa de la evolución de la variable de textura CFD1 a lo largo de los tres TA considerados para las cuatro CA y las dos campañas.

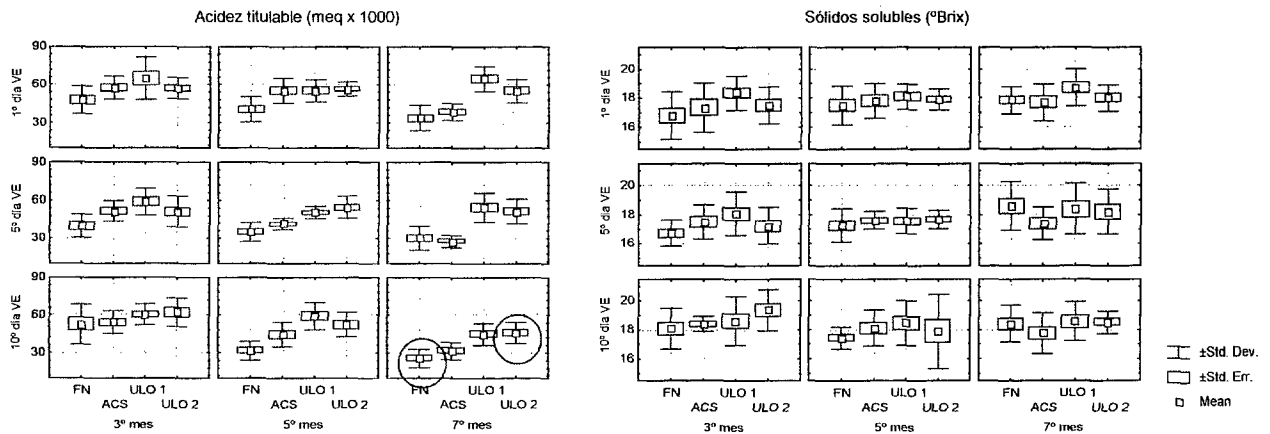
### ➤ Calidad organoléptica (sólidos solubles y acidez titulable)

A medida que se prolonga a más de 5 meses el tiempo de almacenamiento en cámara de los frutos el contenido en sólidos solubles tiende a estabilizarse ( $M=17.9$  °Brix,  $DT=\pm 0.27$  °Brix), no viéndose afectado ni por el tiempo de vida en estantería ni por el tipo de almacenamiento al que se haya sometido al fruto. El hecho de que a pesar de la pérdida de peso que experimenta el fruto fundamentalmente a lo largo de la vida en estantería, no aumente el contenido en sólidos solubles

implica que a partir de 5 meses de almacenamiento las tasas de respiración tras la conservación se han mantenido elevadas.

Sólo en el caso de periodos cortos de almacenamiento y especialmente para frutos conservados en condiciones de FN se observan diferencias significativas en cuanto a la vida en estantería, detectándose un incremento en el contenido en sólidos solubles a medida que aumenta a más de 5 días el tiempo de vida en estantería y por tanto a medida que el fruto va perdiendo peso.

Al mismo tiempo y siempre para almacenamientos no superiores a 3 meses se detectan diferencias entre los distintos tipos de almacenamiento siendo los frutos correspondientes a FN los que presentan menor contenido en sólidos solubles y los correspondientes a ULO2 los que mantienen mayores concentraciones de sólidos solubles al finalizar la vida en estantería (ver Figura 8-45).



• Figura 8-45: Evolución de las variables acidez titulable (izq.) y contenido en sólidos solubles(drecha.) a lo largo de tres TA y tres tiempos de VE y para las cuatro CA. El factor FR no se presenta por resultar no significativo en el ANOVA

En cuanto a la acidez el efecto del tiempo de maduración en estantería ( $F=59.6$ ) y del tipo de almacenamiento ( $F=85.4$ ) se hace notable para almacenamientos prolongados, especialmente superiores a 5 meses. Se observa así en este caso una disminución de la acidez a medida que aumenta el tiempo de estancia en estantería alcanzándose el nivel de acidez mínimo tras 10 días de vida en estantería y tras 7 meses de almacenamiento. Son los frutos conservados en condiciones de FN los que presentan al final del almacenamiento los valores de acidez más bajos y los frutos de ULO1 los valores más elevados.

### ➤ Respiración y emisión de etileno

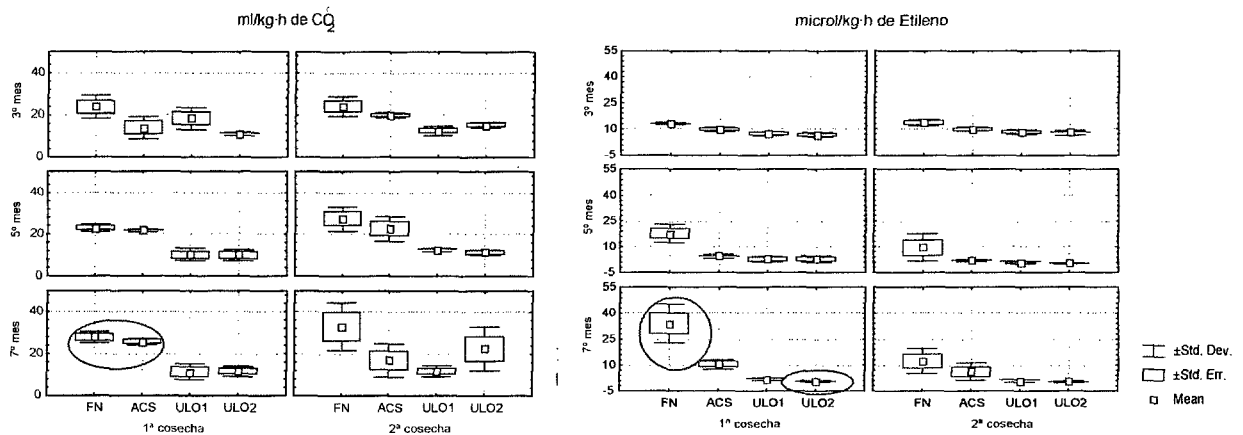
Al contrario de lo que ocurre con los parámetros que se utilizan para estimar la textura del fruto en los que los factores tiempo de almacenamiento en cámara y tiempo de vida en estantería son los

de mayor influencia, sobre las variables tasa de respiración y de emisión de etileno es el tipo de almacenamiento en cámara frigorífica el factor con mayor influencia significativa.

Las emisiones tanto de CO<sub>2</sub> como de etileno, evolucionan significativamente y en el mismo sentido con el tipo de almacenamiento ( $F_{CO_2}=32$ ,  $F_{etileno}=53$ ) y con el tiempo de almacenamiento.

Los valores máximos de emisión se corresponden con los frutos almacenados en condiciones de FN, le siguen los correspondientes a las cámaras de ACS, siendo las atmósferas más restrictivas (ULO) las que mantienen las tasas de emisión más bajas.

A medida que aumenta el tiempo de almacenamiento se experimenta un incremento en la tasa de respiración y emisión de etileno en las cámaras de FN y ACS. Por el contrario estas emisiones tienden a mantenerse o a disminuir ligeramente en el caso de las cámaras de ULO1 y ULO2.



• Figura 8-46: Evolución de las variables tasa de respiración (izq.) y emisión de etileno (drcha.) a lo largo de tres TA, para las cuatro CA y dos FR. El factor VE no se considera por resultar no significativo

### ➤ Cromatografía de gases

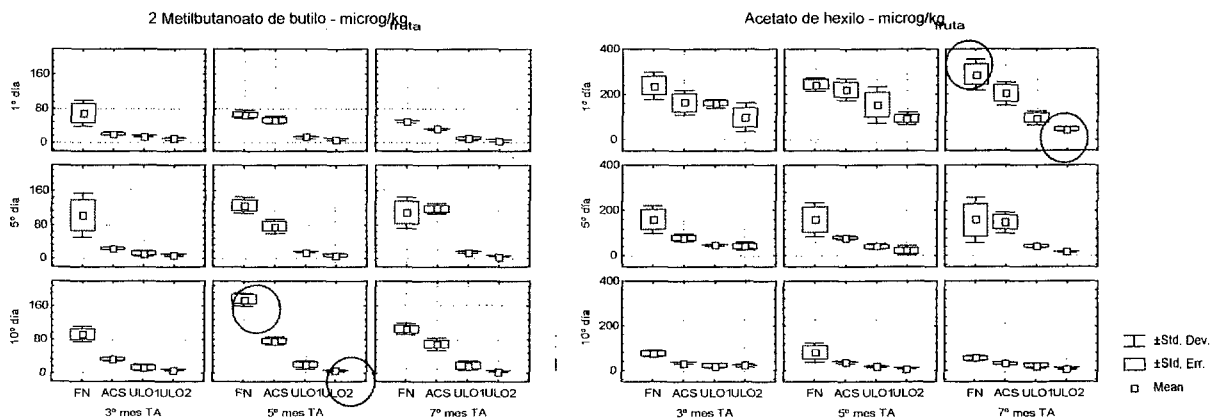
La fruta correspondiente a la segunda campaña con una producción media de volátiles un 74.4 % mayor a la registrada en la campaña 1999-2000 es mucho más aromática, apareciendo en el espacio de cabeza que generan no sólo una mayor concentración de los volátiles sino nuevos compuestos no detectados en los análisis cromatográficos realizados durante la primera campaña.

En este caso el cromatógrafo permitió la identificación y cuantificación de 41 compuestos que se distribuyen de la siguiente manera: 76% de ésteres entre los que se identificaron además de los indicados para la primera campaña el propanoato de 2-metilbutilo, el butirato de butilo, el 2-metilbutanoato de 2-metilbutilo, el butanoato de pentilo y el hexanoato de hexilo; 19% de alcoholes detectándose además para esta campaña 2-heptanol, linalool y octanol; 5% restante corresponde al terpeno limoneno, al aldehído hexanal y al farnaseno.

Los volátiles predominantes en el aroma de esta variedad siguen siendo los 5 ésteres citados en la campaña 99-00 que representan el 50% del total de volátiles emitidos (frente al 70% de la primera campaña), a los que hay que añadir en este caso por un lado el farnaseno que se convierte en esta

campania en el quinto compuesto con mayor presencia en el espacio de cabeza generado por las manzanas de la variedad Fuji y por otro el alcohol 2-metil 1-butanol.

El acetato de 2- metilbutilo sigue siendo el compuesto mayoritario del aroma manteniendo su importancia cuantitativa pero incrementando claramente su importancia cualitativa ya que al aumentar su emisión media a 277,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$  el valor aromático que le corresponde es de 55.5 (5 veces mayor al correspondiente a la campania 99-00). El mismo comportamiento se detecta para el éster acetato de hexilo que con una emisión 91.8  $\mu\text{g}/\text{kg}$  le corresponde un valor aromático de 45.9, lo que le convierte junto con el acetato de 2-metilbutilo en el compuesto impacto de la variedad como ya se indicó. El farneseno aporta un olor como “a verde” o “recién pelado” (Shiota Haruyasu 1990) que matiza el aroma convirtiéndose en un compuesto contributivo del aroma de esta variedad.



• Figura 8-47: Evolución de las emisiones de 2-metilbutanoato de butilo (izq.) y de acetato de hexilo (drecht.) a lo largo de tres TA, tres tiempos de VE para las cuatro CA. No se considera el factor FR por resultar no significativo

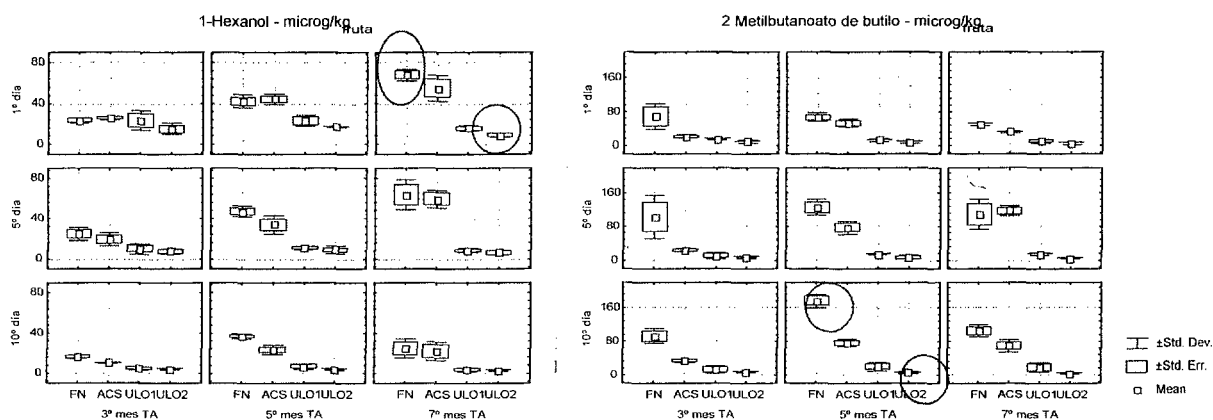
En general la emisión aromática de esta variedad está influida fundamentalmente por el tipo de almacenamiento que es el factor que en el análisis de varianza alcanza valores de significación más elevados. Se observa así que para todas los tiempos de almacenamiento y vida en estantería considerados son las cámaras correspondientes a ULO las que mantienen a los frutos con los niveles de emisión más bajos. El almacenamiento en condiciones de ACS debido a su carácter menos restrictivo, permite que los frutos desarrollen tasas de emisión más elevadas correspondiendo la máxima emisión a los frutos almacenados en condiciones de FN.

Los resultados indican a su vez que la evolución de la emisión de aromas en las cámaras ULO es mínima o a lo sumo tiende a descender a medida que aumentan tiempo de almacenamiento y tiempo de vida en estantería, lo que supondría que el fruto pierde su capacidad de recuperar su tasa de emisión aromática normal incluso tras un periodo de maduración en estantería de 10 días.

Son por tanto los frutos almacenados en FN y ACS los únicos tipos de almacenamiento que interaccionan con los factores tiempo de almacenamiento y tiempo de vida en estantería. En general se puede decir que la máxima emisión para la mayoría de los volátiles analizados se registra tras 5

días de maduración en estantería después de un almacenamiento prolongado en cámara superior a cinco meses.

Es interesante señalar que los dos compuestos que hemos definido como impacto del aroma en esta variedad, el acetato de hexilo y el acetato de 2-metilbutilo, muestran valores muy constantes a lo largo del tiempo de almacenamiento y ligeras variaciones en relación al tipo de almacenamiento y el tiempo de vida en estantería. Esto indicaría que las variaciones en la percepción aromática de los frutos no se debe exclusivamente a estos dos compuestos predominantes e impacto sino que es su interacción con el resto de compuestos lo que resulta en una diferenciación aromática. Así por ejemplo el alcohol 1-hexanol muestra una evolución clara no solo con la vida en estantería sino también a lo largo del tiempo de almacenamiento ( $F=53.7$ ) aumentando su emisión para los frutos mantenidos en condiciones de FN y ACS tras 7 meses de almacenamiento, mientras que el éster 2-metilbutanoato de butilo, un compuesto cuantitativamente importante en el aroma de esta variedad, varía significativamente además de con el tipo de almacenamiento ( $F=161$ ) y tiempo de almacenamiento ( $F=11.6$ ), también con el tiempo de vida en estantería ( $F=19.4$ ) observándose un incremento de su emisión para las cámaras de FN y ACS al aumentar el tiempo de maduración en estantería (ver Figura 8-48).



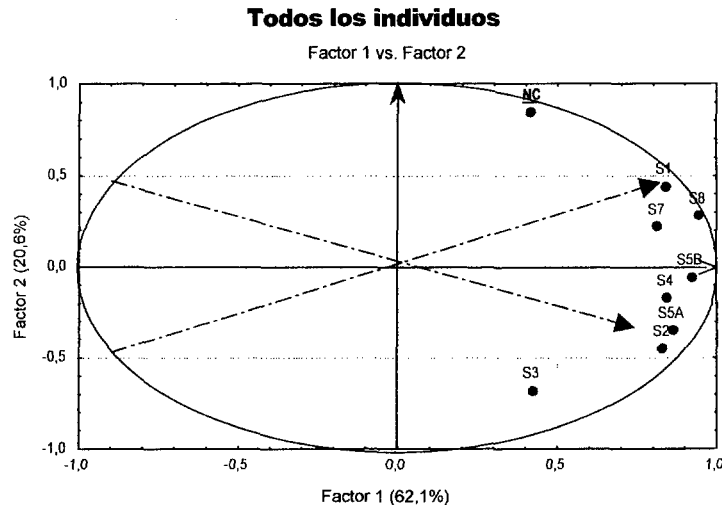
• Figura 8-48: Evolución de las emisiones de 1-hexanol (izq.) y 2-metilbutanoato de butilo (dcha.) a lo largo de los tres TA y tres tiempos de VE para las cuatro CA. El factor FR no se considera por resultar no significativo

#### 8.4.3.2. Nariz electrónica

La sustitución en esta campaña de los sensores de una sola capa por sensores de doble recubrimiento se traduce en un incremento de la señal registrada por estos aumentando también las diferencias entre la información aportada por unos y otros sensores, de forma que aunque estos siguen estando muy correlacionados entre sí el nivel de correlación disminuye con respecto a campañas anteriores. Además no hay que olvidar que la matriz original de datos ha sufrido una doble corrección, aditiva entre secuencias y multiplicativa intra secuencias.



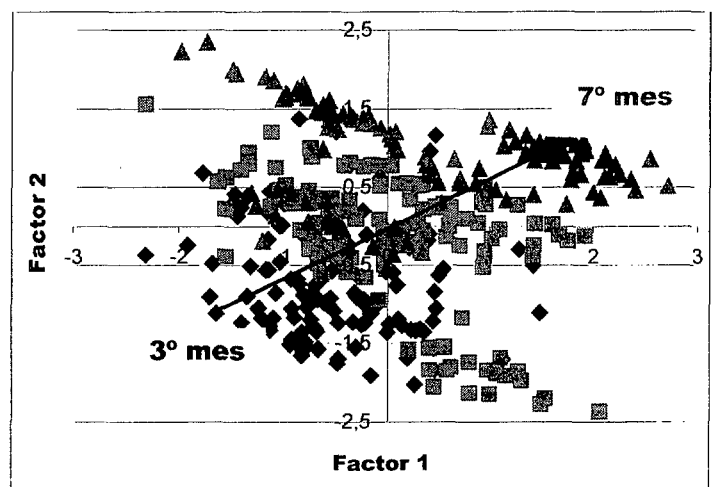
El ACP define así dos factores el Factor 1 (var.expl. 62.1%) que está correlacionado con todos los sensores de la NE a excepción del sensor S3 y el NC, que con una información independiente al resto definen el segundo Factor (var.expl. 20.6%) del ACP (ver Figura 8-49).



• Figura 8-49: Proyección de las variables, según Factor 1 y Factor 2, en un ACP con los sensores de la NE

La información correspondiente al grupo de sensores que definen el Factor 1 responde significativamente primero a los tiempos de almacenamiento en cámara y en segundo lugar a los tiempos de estancia en estantería.

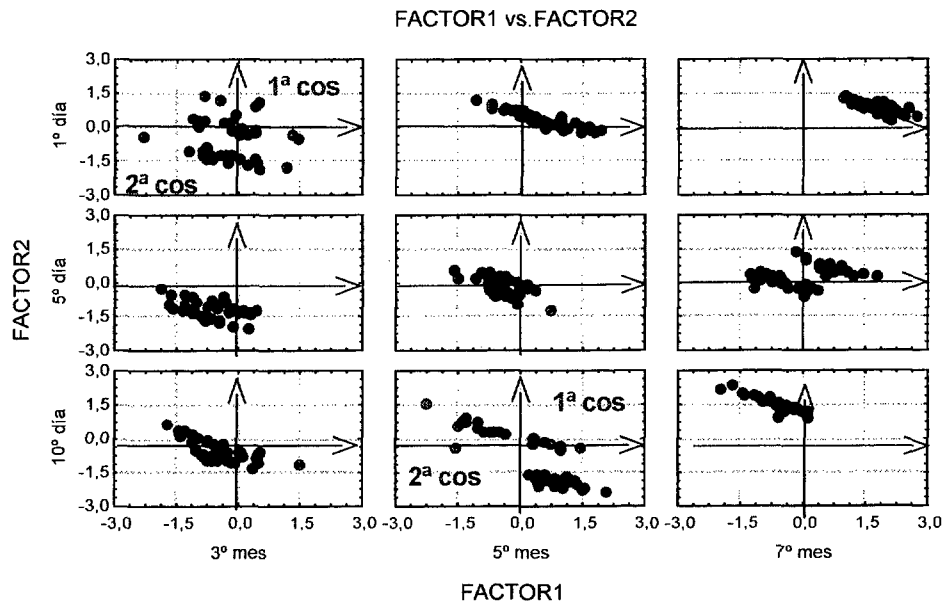
Estos sensores están respondiendo hacia algún volátil que evoluciona según estos dos factores permitiendo así la información aportada por la nariz electrónica la diferenciación entre los tres tiempos de almacenamiento considerados (ver Figura 8-50) principalmente cuando se busca la interacción de esta factor con el tiempo de vida en estantería (ver Figura 8-51).



• Figura 8-50: Proyección de los individuos en una ACP sobre Experimento II.B (2ª campaña), con manzanas Fuji (n=360) según el TA en cámara. Se ha aplicado corrección aditiva y multiplicativa.

De esta manera a lo largo del Factor 1 y especialmente inmediatamente tras la salida de la fruta de cámara (1º día) momento en el que se detectan las máximas diferencias, el incremento de la señal de los sensores de 3 a 7 meses de almacenamiento permite su clara diferenciación. Se observa también que a lo largo del eje secundario definido por el grupo de sensores S2, S4 y S5A se produce una dispersión de los datos intralote cuyas causas no se han podido determinar.

El sensor 3 recoge la ligera variabilidad introducida en el conjunto de datos como consecuencia de la distinta fecha de recolección de los lotes, aunque se observa que la respuesta es ligeramente mayor hacia los frutos cosechados más tardíamente es tras 5 meses de almacenamiento cuando se alcanzan los valores máximos para la segunda cosecha y por tanto la máxima diferencia entre los dos grupos, que se refleja en el gráfico de proyección de los individuos correspondientes a 5 meses de almacenamiento, en los que los frutos correspondientes a la primera cosecha presentan valores positivos para el Factor 2, mientras que la segunda cosecha presenta valores negativos para ese Factor (ver Figura 8-51).



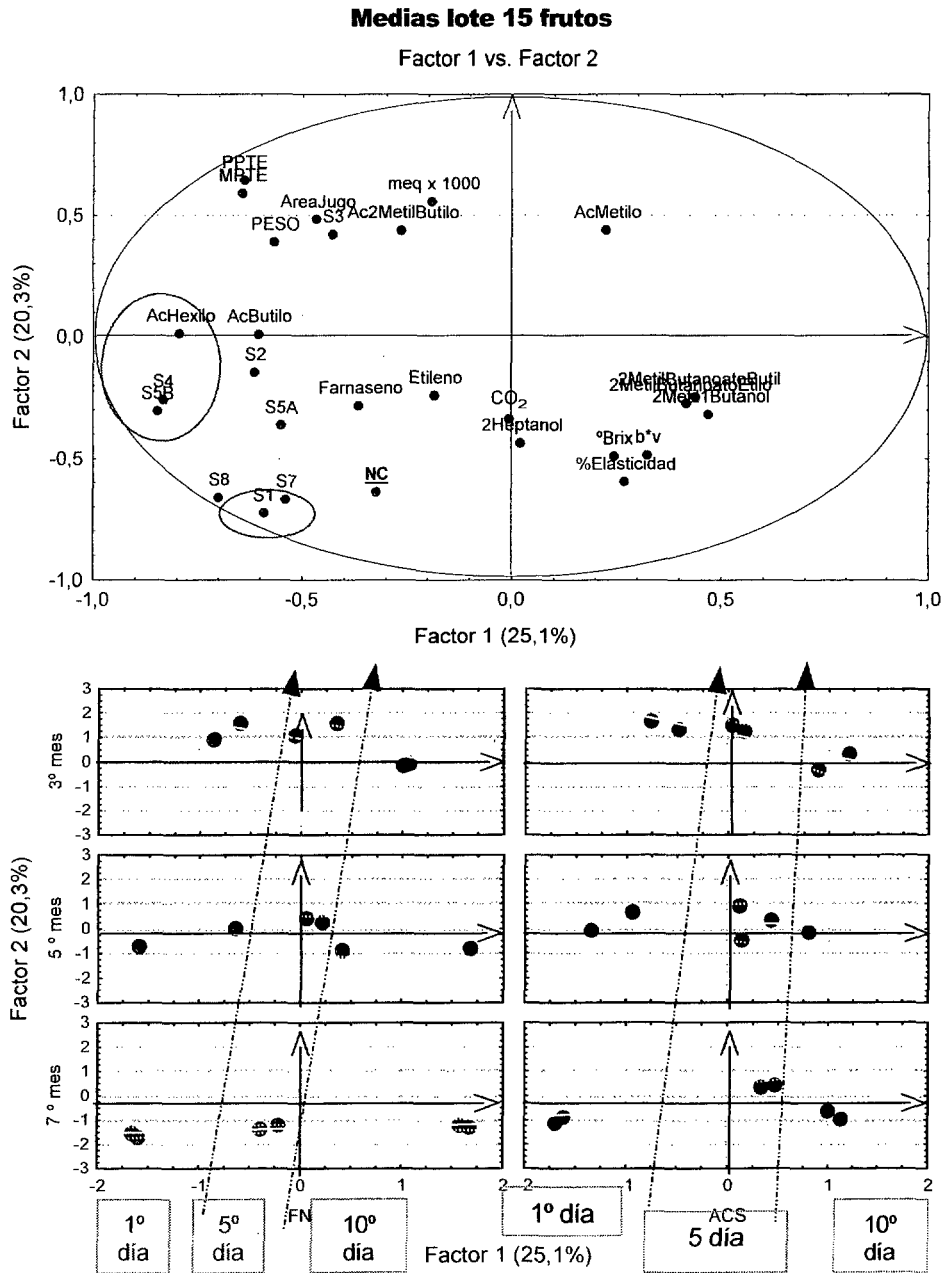
• Figura 8-51: Proyección de los individuos en una ACP sobre Experimento II.B (2ª campaña), con manzanas Fuji (n=360) según el TA en cámara y el tiempo de VE. Se ha aplicado corrección aditiva y multiplicativa.

El NC influye significativamente sobre la información aportada por el S3 con lo que los comentarios realizados sobre éste deben considerarse con cuidado. Por otra parte el NC se mantiene independiente de 7 de los 8 sensores de la NE lo que implica que las conclusiones realizadas sobre la información que estos aportan y su capacidad de segregación entre lotes son realistas.

El factor que introduce menor variabilidad en el conjunto de los datos es el tipo de almacenamiento cuyo efecto resulta no significativo. (Saevens, di Natale, and Nicolai 2002) con el mismo equipo de nariz electrónica son capaces de diferenciar entre distintos tiempos de vida en estantería como hemos podido comprobar y al igual que en nuestro caso no han podido detectar diferencias significativas en lotes de manzana Jona Gold correspondientes a almacenamientos en distintas atmósferas.

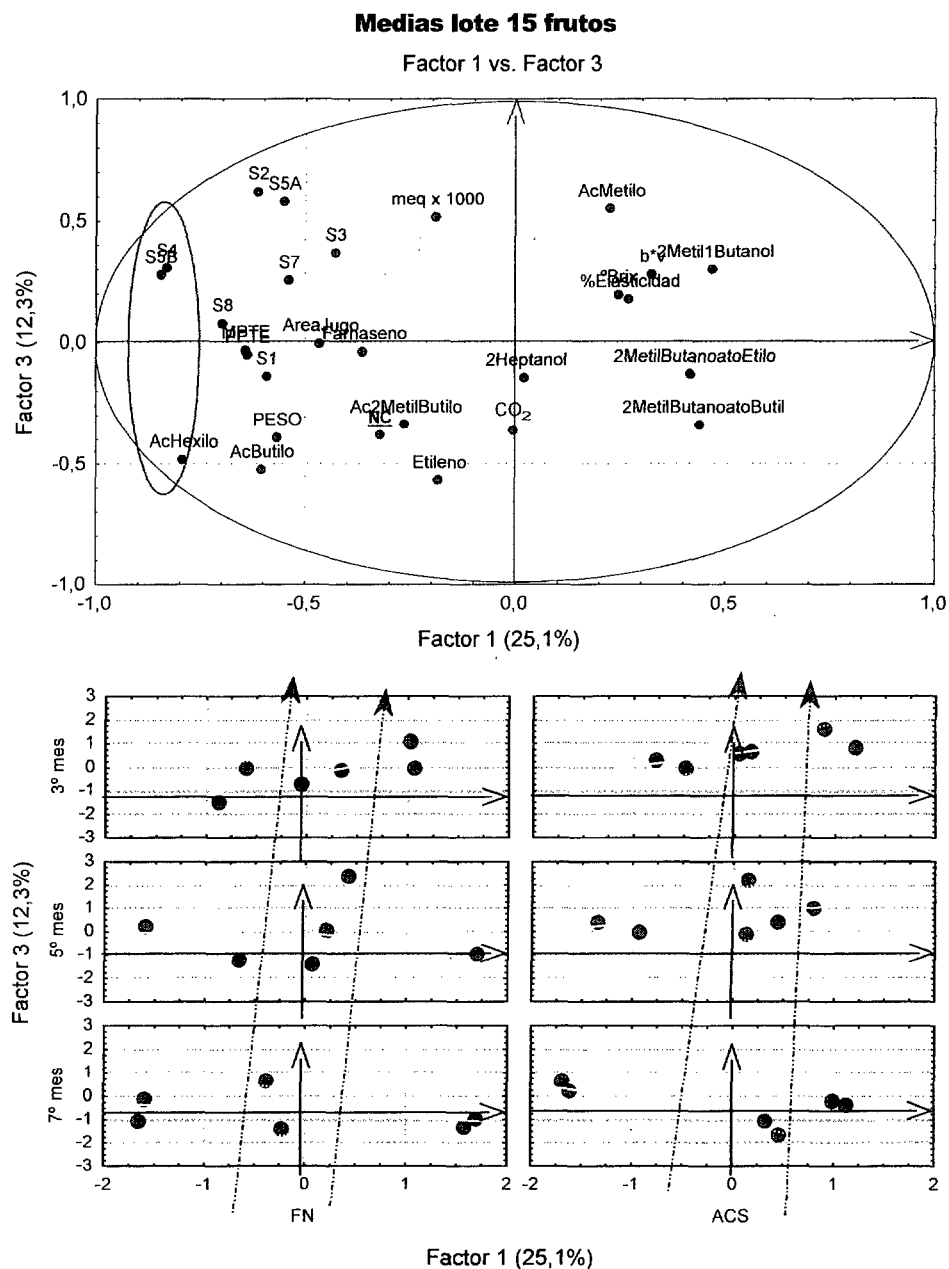
### 8.4.3.3. Comparación de los métodos de referencia con la nariz electrónica

Por ello y al igual que se ha realizado para la pera Doyenne du Comice y la campaña 99-00 de manzana Fuji se va a realizar un ACP considerando exclusivamente los frutos almacenados en condiciones de FN y ACS que son los que presentan tasas elevadas de respiración y de emisión de volátiles.



• Figura 8-52: Proyección de las variables, según Factor 1 y Factor 2, en un ACP conjunto de las referencias con los sensores de la NE, considerando sólo los datos correspondientes a FN y ACS con n=36.

En este nuevo ACP se define un nuevo Factor 1 (var.expl 25.1%), caracterizado por los sensores de la NE, S4 y S5B y por la emisión de acetato de hexilo con la que están positivamente correlacionados ( $r = 0.6$ ). Es decir al aumentar la tasa de emisión de acetato de hexilo, compuesto impacto de la variedad, aumenta la señal de los sensores citados lo que permite realizar un seguimiento de la evolución de lo frutos conservados en condiciones de FN y ACS a lo largo del tiempo de vida en estantería, detectándose los niveles máximos de emisión y por tanto de señal de los sensores a medida que aumenta el tiempo de maduración en estantería de 1 a 10 días (ver Figura 8-52 y Figura 8-53).



• Figura 8-53: Proyección de las variables, según Factor 1 y Factor 3, en un ACP conjunto de las referencias con los sensores de la NE, considerando sólo los datos correspondientes a FN y ACS con  $n=36$ .

El Factor 2 (var.expl. 20.23%) está caracterizado por la información de otros dos sensores de la nariz electrónica el S1 y S7, donde la disminución de la respuesta de los sensores al aumentar el tiempo de almacenamiento de 3 a 7 meses, permite diferenciar a lo largo del segundo factor los tres tiempos de almacenamiento considerados tanto en ACS como en FN, esto implicaría la desaparición a lo largo del almacenamiento en cámara de algún o algunos volátiles que no han sido identificados. Mientras el tercer Factor (var.expl. 12.3%) no está caracterizado por ninguna variable concreta.

Según este análisis ACP la información más relevante es la extraída de los sensores de la NE y de la emisión de uno de los compuestos impacto del aroma de la variedad Fuji el acetato de hexilo. La no correlación existente entre los sensores de la NE y el factor tipo de almacenamiento y la escasa diferencia en la emisión de acetato de hexilo entre las dos cámaras consideradas implica que no sea posible segregar los frutos según el tipo de almacenamiento al que han sido sometidos.

#### **8.4.4. Conclusiones parciales sobre la segregación en distintos estados de calidad aromática (madurez) empleando la NE, las variedades de manzanas y peras seleccionadas sometidas a diferentes condiciones y tiempos de almacenamiento.**

##### **1) Peras cv Doyenne du Comice**

La nariz electrónica muestra que no sólo es capaz de segregar los frutos recién cosechados de los que han sufrido almacenamiento frigorífico, sino que permite diferenciar los distintos tiempos de almacenamiento considerados. Sólo para la fruta recién cosechada se puede observar una clara evolución y por tanto diferenciación de los volátiles, a lo largo de la vida en estantería.

En la comparación de los datos de la nariz electrónica con aquellos obtenidos por cromatografía de gases se observa que no existe correlación entre aquellos y los volátiles de mayor interés en el aroma de la variedad como son el acetato de hexilo o los acetatos de etilo y propilo. Así que mientras estos responden fundamentalmente a cambios en las condiciones de almacenamiento, los sensores de la NE responden significativamente a variaciones en el tiempo de almacenamiento.

##### **2) Manzanas cv Fuji – campaña 99-00**

La información aportada por la nariz electrónica permite al igual que en el caso anterior hacer una diferenciación entre la fruta recién recolectada y aquella conservada en cámaras siendo posible así mismo segregar los distintos tiempos de almacenamiento frigorífico considerados.

En esta variedad se observa con la nariz electrónica la evolución que con los días en estantería sufre el fruto, para cada uno de los tiempos de almacenamiento, si bien los sensores que

determinan esta segregación están preocupantemente correlacionados con el nivel de corrección aplicado lo que resta significancia a este resultado.

De nuevo los frutos almacenados en las distintas condiciones de ULO pierden en gran medida su capacidad de emitir volátiles no encontrándose correlaciones de interés entre la información aportada por los sensores de la nariz electrónica y la correspondiente a la cromatografía de gases. Por otro lado incluso para los frutos correspondientes a FN y ACS existe una independencia entre el los sensores de la nariz electrónica y la emisión de los volátiles de mayor importancia en el aroma de la manzana Fuji el acetato de hexilo y el acetato de 2-metilbutilo.

### **3) Manzanas cv Fuji – campaña 00-01**

La mayor emisión de volátiles por la fruta durante esta campaña, junto con la mayor sensibilidad de los nuevos sensores de la NE y el mayor control de las condiciones de generación y transferencias del espacio de cabeza, hace que la información aportada por todos los sensores (exceptuando el S3) sea significativa para permitir la diferenciación entre los tres tiempos de almacenamiento considerados, fundamentalmente cuando se busca la interacción de este factor con el tiempo de vida en estantería, efecto que se observa principalmente inmediatamente tras la salida del fruto de la cámara de almacenamiento. El sensor S3 junto con el NC aplicado se comportan independientemente al resto de sensores.

La escasa emisión de volátiles por los frutos almacenados en condiciones de ULO implica que sólo para los frutos conservados en FN y ACS se haya encontrado una correlación entre la información sensorial de la NE y la aportada por la cromatografía de gases. Los sensores S4 y S5B están positivamente correlacionados con la emisión de acetato de hexilo, es decir al aumentar la tasa de emisión de acetato de hexilo compuesto impacto de la variedad, aumenta la señal de los sensores citados, lo que permite realizar un seguimiento de la evolución de lo frutos conservados en condiciones de FN y ACS a lo largo del tiempo de almacenamiento en cámara y el tiempo de vida en estantería.

# Conclusiones

---

---

## 9. Conclusiones

### 9.1. Sobre la identificación de fuentes de variación que afectan a la calidad de los datos que se obtienen de una NE

En relación al Objetivo 1, este trabajo muestra que la estabilidad y reproducibilidad de la respuesta de los sensores es baja, debido a la existencia de distintas perturbaciones externas e internas, algunas de las cuales han sido identificadas.

En cuanto a las perturbaciones que afectan a la respuesta de los sensores de la nariz electrónica se ha encontrado una correlación positiva ( $r=0.66$ ) entre el nivel medio diario de respuesta de los sensores hacia la referencia, 1-propanol, y la **humedad relativa del ambiente** en cada día de trabajo. La elección de el aire sintético como gas portador elimina el efecto de la humedad relativa ambiental. Por otro lado se ha determinado que **temperaturas internas de trabajo** superiores a  $37^{\circ}\text{C}$  en la cámara de gases provocan inestabilidad en la frecuencia de oscilación de los sensores. Una temperatura de trabajo de  $34 \pm 1^{\circ}\text{C}$  en la cámara de medida asegura el funcionamiento del equipo por debajo de este límite superior de  $37^{\circ}\text{C}$ . Y además se ha detectado un incremento en la señal de respuesta de los sensores de la nariz electrónica al medir una misma muestra, ya sea estandarizada o frutos, a lo largo de una jornada de trabajo al aumentar el **tiempo de funcionamiento del equipo**.

En cuanto a las perturbaciones que afectan a la generación y composición del espacio de cabeza se ha observado que los sensores QCM responden con un nivel medio de señal, similar al detectado hacia un fruto, ante una muestra de agua destilada corroborando la sensibilidad ya conocida que estos sensores tienen hacia las moléculas de **vapor de agua procedente de la muestra** al adsorberse sobre su superficie. Se ha comprobado que cualquier tipo de **orificio o rotura de la piel del fruto** supone un incremento de la respuesta de los sensores. Como medida preventiva para evitar esta fuente de variación, cualquier fruto que no presente intacta la piel debe ser eliminado de los análisis con nariz electrónica. Se sabe que existen **interacciones entre las especies químicas presentes en la muestra** que influyen sobre la concentración que de estos se llega a alcanzar en el espacio de cabeza. Para concentraciones mayores a 20 ppm se han encontrado interacciones entre las moléculas de agua y del alcohol en la fase líquida que originan una menor probabilidad de evaporación del alcohol de forma que incrementos de la concentración se traducen en incrementos de la señal de menor cuantía. Esto indica que la concentración estimada teóricamente difiere de la realmente alcanzada en el espacio de cabeza en el coeficiente



de actividad que para el 1-propanol y el etanol tiene un valor medio de 0.6 y 0.7 respectivamente. Finalmente se ha determinado que bajo las condiciones de temperatura y tiempo en las que se ha trabajado en la **generación del espacio de cabeza** se puede asegurar que se ha trabajado en todos los casos **en condiciones de equilibrio**, no convirtiéndose por tanto este factor en una fuente de variación.

### **9.2. Sobre el establecimiento de sistemas de corrección que permitan eliminar las fuentes de variación no deseadas.**

En relación al Objetivo 2, la detección de las distintas fuentes de variación que afectan a la señal registrada por los sensores, fuerza a llevar a cabo un preprocesado de la matriz de datos de frecuencias originales obtenidas, basado en la aplicación de distintos tipos de calibraciones. Primero una corrección aditiva entre secuencias o días de trabajo y segundo una corrección multiplicativa intra secuencia o día de trabajo.

### **9.3. Sobre la determinación de las características metroológicas que definen el funcionamiento de los sensores QCM de la NE, en el análisis de estándares.**

Se ha determinado la **precisión en  $\pm 16.44$  Hz**. Se ha establecido que la máxima sensibilidad de los sensores se alcanza para concentraciones entre 0 y 20 ppm del espacio de cabeza, de forma que la sensibilidad media para el sensor de mayor **sensibilidad** (sensor 2) es **de 5.18 Hz/ppm** para este intervalo de concentraciones. El mínimo nivel de concentración del espacio de cabeza que los sensores pueden reconocer como debido a una muestra o **umbral de detección es de 6.34 ppm**. Todos los sensores muestran una mayor especificidad hacia los ésteres especialmente hacia el acetato de propilo, el **sensor 2** con una **especificidad de 0.45** es el más específico de los ocho.

### **9.4. Sobre el establecimiento de cuales deben ser las especificaciones que debe cumplir una nariz electrónica para poder ser empleada en la evaluación de la calidad aromática de manzanas cv Fuji y peras cv. Doyenne du Comice**

Las diferencias en especificidad que presentan los 8 sensores con respecto a los analitos considerados producen ligeras variaciones en el fingerprint, lo que da **perspectivas moderadas para la realización de análisis cualitativos** del espacio de cabeza ya que sólo son muy evidentes a concentraciones que resultan excesivas en relación con los volátiles emitidos por los frutos. Sin embargo los **análisis cuantitativos son posibles** ya que el conocimiento a partir de los análisis metroológicos de los parámetros que caracterizan a los sensores QCM y a partir de la cromatografía de gases de la emisión máxima y mínima de volátiles producidos por frutos de manzana cv Fuji y

peras cv. Doyenne du Comice, ha permitido calcular un tiempo mínimo de generación del espacio de cabeza de 20 min para las primeras y 60 min para las segundas para diferenciar utilizando la nariz electrónica más de tres categorías de calidad aromática.

### **9.5. Sobre la segregación, en distintos estados de calidad aromática (madurez), empleando la NE, las variedades de manzanas y peras seleccionadas, sometidas a diferentes condiciones y tiempos de almacenamiento.**

Los análisis realizados para la pera cv **Doyenne du Comice** y la manzana cv **Fuji (99-00)** muestran que la **nariz electrónica** no sólo es capaz de segregar los frutos recién cosechados de los que han sufrido almacenamiento frigorífico, gracias a la información aportada por los sensores 4 y 7 los menos influenciados por el nivel de corrección aplicado y que responden ante algún volátil que desaparece con el almacenamiento frigorífico. En ambos casos la **comparación de los datos de la nariz electrónica con aquellos obtenidos por cromatografía de gases indica que no existe correlación** entre aquellos y los volátiles de mayor interés en el aroma de cada variedad. Así que mientras la información del cromatógrafo responde fundamentalmente a cambios en las condiciones de almacenamiento, los sensores de la NE responden significativamente a variaciones en el tiempo de almacenamiento en cámara y estantería.

La mayor emisión de volátiles por la fruta cv **Fuji durante la campaña 00-01** junto con la mayor sensibilidad de los nuevos sensores de la NE y el mayor control de las condiciones de generación y transferencia del espacio de cabeza, hace que la información aportada por todos los sensores (exceptuando el S3) sea significativa e independiente del nivel de corrección y **permite la diferenciación entre los tres tiempos de almacenamiento considerados, fundamentalmente cuando se busca la interacción de este factor con el tiempo de vida en estantería**, efecto que se observa principalmente inmediatamente tras la salida del fruto de la cámara de almacenamiento. Además para los frutos conservados en frío normal y atmósfera controlada estándar se ha encontrado **una correlación entre la información sensorial de la nariz electrónica a través de los sensores 4 y 5B y la aportada por la cromatografía de gases a través del acetato de hexilo** compuesto impacto de la variedad, lo que explicaría la capacidad de los sensores para realizar un seguimiento de la evolución de lo frutos conservados en condiciones de FN y ACS a lo largo del tiempo de almacenamiento en cámara y el tiempo de vida en estantería.

## **9.6. Sobre las restricciones del uso de una NE**

Al analizar las especificaciones que debería de cumplir una NE para poder emplearla en el análisis de fruto se obtuvo como resultado que con un tiempo de generación de 60 minutos sería posible segregar entre 3 estados de madurez tanto en peras como en manzanas, incluso dentro de un mismo día de trabajo. Sin embargo la NE no ha sido capaz de apreciaciones tan sutiles, diferenciando eso sí cambios más notables como los originados como consecuencia de distintos tiempos de almacenamiento, a veces como consecuencia de distintos tiempos de vida en estantería pero nunca en función del tipo de almacenamiento. El no cumplimiento de las expectativas se explicaría debido a la existencia de distintos tipos de errores que influyen en la respuesta de los sensores (enumerados en el apartado 9.1) y que no son completamente corregidos mediante los métodos de calibración propuestos, éstos eliminan una cierta variabilidad de la señal, que si bien debido a los umbrales de detección de la NE, no podría ser achacada a cambios de la muestra, si encierran una información potencialmente útil que no se ha podido utilizar.

Por otro lado la falta de correlación encontrada en general entre las respuestas de la NE y la CG, se debe fundamentalmente primero a que los métodos de generación de la muestra empleada por ambos equipos difiere notablemente. Si bien la obtención de la muestra gaseosa es similar, realizándose por liberación de los volátiles en el gas portador, la forma en la que esta llega al detector es muy distinta, directa y por tanto en fase gaseosa en el caso de la NE y por retención de los aromas y posterior extracción con éter, por tanto en fase líquida, en el caso de la CG, y segundo a la respuesta de los sensores de la nariz electrónica hacia compuestos como el vapor de agua que ocupan posiciones en el espacio de cabeza que impiden la expresión de otros de menor volatilidad y de mayor importancia en la calidad aromática del fruto.

# **Propuesta para trabajos posteriores**

---

## 10. Propuesta para trabajos posteriores

A la vista de las conclusiones, se ha establecido como líneas de investigación prioritarias:

- ✓ La modificación de las características de los sensores para mejorar, por un lado sus propiedades de estabilidad y reproducibilidad y disminuir así la influencia sobre su respuesta de los diversos factores externos e internos que afectan a su funcionamiento, y por otro lado adaptando las propiedades metrológicas de los sensores a las medidas con fruta fundamentalmente disminuyendo la falta de precisión e incrementando la sensibilidad de los sensores.

Sobre este aspecto sólo el fabricante del equipo y de los sensores puede actuar, pero siempre conociendo los requerimientos del usuario, por tanto el mantenimiento de un contacto activo usuario-fabricante y viceversa es crítico.

- ✓ El control del muestreo, incluyendo bajo este aspecto tanto la generación del espacio de cabeza como su transferencia hasta la cámara de sensores. En este punto el saber hacer, el conocimiento y cuidado del usuario es fundamental: para controlar la temperatura de generación del espacio de cabeza, seleccionar el tipo de gas portador, el flujo, los materiales etc...factores todos ellos que pueden mejorar enormemente la estabilidad y reproducibilidad de las medidas.

Se sabe por ejemplo que el acero inoxidable no es inerte del todo, y este es un material ampliamente utilizado en la fabricación de elementos tanto en las NE (por ejemplo cámara de gases) como en los sistemas de transferencia, o que materiales como el Teflón si bien son inertes son microporosos, desconociéndose hasta el momento que efectos sobre la señal de los sensores pueden tener estos factores.

La mejora debería estar dirigida primeramente a utilizar cámaras de sensores lo más pequeñas posibles, así como a restringir al mínimo operativo la longitud de los tubos de transferencia y en general todo el camino recorrido, así como a controlar no sólo la temperatura de generación del espacio de cabeza sino también la temperatura del gas portador que debería ser igual a la de generación del espacio de cabeza y mantenida a lo largo de los tubos de transferencia.

- ✓ La eliminación selectiva de gases inodoros (etileno, CO<sub>2</sub>, vapor de agua) que si bien no influyen en la calidad aromática del fruto, sí interaccionan con los sensores provocando una respuesta a veces muy importante que enmascara la señal debida a compuestos volátiles de interés en el aroma. A pesar de las dificultades que entrañan este tipo de actuaciones, existe un antecedente que merece atención y que abre nuevas posibilidades como es el

caso de la patente solicitada por el Laboratoire de Génie Biologique et Sciences des Aliments de la Universidad de Montpellier (Francia) por el desarrollo de un sistema acoplado en línea con el sistema de transferencia del espacio de cabeza desde un cromatógrafo de gases a una nariz electrónica y que permite la deshidratación y desalcoholización de la muestra gaseosa generada por distintos tipos de vinos o muestras alcoholizadas (Ragazzo et al. )

- ✓ La selección del tipo de aplicación, estudiando el producto a analizar en cuanto a generación del espacio de cabeza, concentraciones, compuestos volátiles y variables que se pretenden evaluar para realizar una evaluación previa de las posibilidades reales del uso de una NE.

---

---

# Bibliografía

---

---

## 11. Bibliografía

- Álvarez-Benedí, J., J. Souto, J. A. de Saja, and S. Bolado. 2000. Evaluation of an Organic Semiconductor as a Sensor of Volatilised Herbicides. *Journal of Environmental Quality* 29, no. 5: 1470-1475.
- Barreiro, P. 2000. Chemometrics ASTEQ meeting. Assisi (Italy). Not published
- Bartlett, P. N., J. M. Elliot, and J. W. Gardner. 1997. Electronic Noses and Their Application in the Food Industry. *Food Technology* 51, no. 12: 44-48.
- Bauer, D. R., A. G. Santi, and V. Utermohlen. 2000. How Individual Differences in taste Input Impact Smell and Flavor Perception - An Example of a Complex Process. *International Conference on Complex Systems (ICCS)*.
- Bodenhöfer, K., A. Hierlemann, M. Juza, V. Schurig, and W. Göpel. 1997. Chiral Discrimination of Inhalation Anesthetics and Methyl propionates by Thickness Shear Mode Resonators: New Insights into the Mechanisms of Enantioselectivity by Cyclodextrins. *Anal. Chem.* 69: 4017-31.
- Brezmes, J., E. Llobet, X. Vilanova, G. Saiz, and X. Correig. 2000. Fruit Ripeness Monitoring Using an Electronic Nose. *Sensors and Actuators B*, no. 69: 223-29.
- ———. 2001. Evaluation of the Electronic Nose as a Novel Instrument to Assess Fruit Ripeness. *EURODEUR-AIRODEUR. La Metrologie des Odeurs et les Nez Electroniques*.
- Brezmes, J., G. Sáiz, E. Llobet, X. Vilanova, and X. Correig. 1999. Diseño de una Nariz Electrónica para la Determinación no Destructiva del Grado de Maduración de la Fruta Dulce. *Fruticultura Profesional*, no. 105: 6-16.
- Briand, D., H. Sundgren, B. van der Schoot, I. Lundström, and N. F. de Rooij. 2001. Thermally Isolated MOSFET for Gas Sensing Application. *IEEE Electron Device Letters* 22, no. 1: 11-13.
- Büking, M. 2000. Sensory Evaluation. *Second School of the European Network of Excellence on Artificial Olfactory Sensing*.
- Capone, S., M. Epifani, R. Rella, P. Siciliano, and C. Distanto. 2001. Discrimination of Air Contaminants by Using an Array of Sol-Gel Microsensors Devices. *EURODEUR-AIRODEUR. La Metrologie des Odeurs et les Nez Electroniques*.
- Correa, E. C., P. Barreiro, M. Ruiz-Altisent, M. L. López, R. Miró, and B. Diezma. 2000. A Procedure for optimal Calibration for a QCM Electronic Nose. Relation with Specifications for pear Quality. *AgEng* 2000, 00-PH-041.
- Covington, J. A., J. W. Gardner, D. Briand, and N. F. Rooij de. 2001. A Polymer Gate FET Sensor Array for Detecting Organic Vapours. *Sensors and Actuators B*, no. 77: 155-62.
- Crouzet, J., P. Etievent, and C. Bayonove. 1990. Stoned fruit: Apricot, Plum, Peach, Cherry. *Developments in Food Science*. 3C: 43-91.



- D'Amico, A. 1999. Fundamentals on Sensors and Electronic Interfaces. *Summer School "Sensors for Food Applications"*.
- Di Natale, C. 1999. Electronic Nose. *Summer School "Sensors for Food Applications"*.
- Di Natale, C., A. Macagnano, F. Davide, A. D'Amico, R. Paolesse, T. Boschi, M. Faccio, and G. Ferri. 1997. An Electronic Nose for Food Analysis. *Sensors and Actuators B* 44: 521-26.
- Di Natale, C., A. Macagnano, R. Paolesse, A. Mantini, A. Finazzi-Agró, and A. D'Amico. 1999. Examples of Applications of an Electronic Nose to the Analysis of Volatile Compounds Secreted Outside the Human Body. *5<sup>th</sup> International Symposium on Olfaction and the Electronic Nose*.
- Di Natale, C., R. Paolesse, A. Macagnano, A. Mantini, A. D'Amico, M. Ubigli, A. Legin, L. Lvova, A. Rudnitskaya, and Y. Vlasov. 2000. Application of a Combined Artificial Olfaction and Taste System to de Quantification of Relevant Compounds in Red Wine. *Sensors and Actuators B*, no. 69: 342-47.
- Di Natale, C., D. Salimbeni, A. Macagnano, R. Paolesse, and A. D'Amico. 1999. Discrimination of Spirits with an Opto-Electronic Nose. *5<sup>th</sup> International Symposium on Olfaction and the Electronic Nose*.
- Doleman, B. J., and N. S. Lewis. 2000. Comparison of Odor Detection Thresholds and odor Discriminabilities of a Conducting Polymer Composite Electronic Nose vs. Mammalian Olfaction. *Sensors and Actuators B*.
- Dubreuil, B, T. Talou, and A. Gaset. 2001. State of the Art for Electronic Nose Applications in Environmental Monitoring. *EURODEUR-AIRODEUR. La Metrologie des Odeurs et les Nez Electroniques*.
- Fallik, E., Archbold D.D., T. R. Hamilton-Kemp, J. H. Loughrin, and R. W. Collins. 1997. Heat Treatment Temporarily Inhibits Aroma Volatile Compound Emission from Golden Delicious Apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45: 4038-41.
- Fernández, R., and P. Saá. 2001. Realidad Económica de la Fruta en el Mercado Español. Un Análisis desde la Perspectiva de la oferta y la Demanda. *Distribución y Consumo*, no. Abril-Mayo: 57-77.
- Ferroni, M., V. Guidi, G. Martinelli, M. Sacerdoti, P. Nelli, and G. Sberveglieri. 1998. MoO<sub>3</sub>-based Sputtered Thin-Films for Fast NO<sub>2</sub> Detection. *Sensors and Actuators B* 48: 285-88.
- Flath, R. A., D. R. Black, D. G. Guadagni, W. H. McFadden, and T. H. Schultz. 1967. Identification and Organoleptic Evaluation of Compounds in Delicious Apple Essence. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 15, no. 1: 29-35.
- Franck, M. 1999. Solid State Chemical Sensors. *Summer School "Sensors for Food Applications"*.
- Frank, M. 2000. Gas Chromatography and Mass Spectrometry. *Second School of the European Network of Excellence on Artificial Olfactory Sensing*.
- Galdikas, A., Z. Kancleris, D. Senuliene, and A. Setkus. 2001. Detection of Bacteria in Meat with Dynamic Electronic Nose. *EURODEUR-AIRODEUR. La Metrologie des Odeurs et les Nez*

*Electroniques.*

- Garrigues, S., M. Morvan, T. Talou, D. Nesa, and J. F. Beziau. 2001. Electronic Noses Applications in Automotive Industry. *EURODEUR-AIRODEUR. La Metrologie des Odeurs et les Nez Electroniques.*
- Gelperin, A., J. L. Dawson, S. M. Cazares, and H. S. Seung. Rapid Fruit Cultivar Identification by an Artificial Olfactory System. *5<sup>th</sup> International Symposium on Olfaction and the Electronic Nose.*
- Goschnick, J. 2001a. The Karlsruhe Micronose KAMINA. A Low Cost Electronic Nose to Make Mass Products Intelligent. *Technik Und Umwelt.*
- ———. 2001b. Mobile Odor Tester for Granular Materials or Soft Soil. *Technik Und Umwelt.*
- Gouronnec, A. M., and P. Najean. 2001. Measure des Odeurs par Analyse Sensorielle ou "Olfactometrie". *EURODEUR-AIRODEUR. La Metrologie des Odeurs et les Nez Electroniques.*
- Grenier, P. 1998. Calcul de l'Espace de Tête. *Cemagref.* 1-14.
- Griffin, M. Electronic Noses: Multi-Sensor Arrays.
- Guadarrama, A., J. A. Fernández, M. Íñiguez, J. Souto, and J. A. de Saja. 2000. Array of Conducting Polymer Sensors for the Characterisation of Wines. *Analytica Chimica Acta*, no. 411: 193-200.
- Guidi, V., G. C. Cardinali, L. Dori, G. Faglia, M. Ferroni, G. Martinelli, P. Nelli, and G. Sberveglieri. 1998. Thin-film Gas Sensor Implemented on a Low-power-consumption Micromachined Silicon Structure. *Sensors and Actuators B.*
- Gutierrez, A., P. Ramos, M. Zarzo, E. Moltó, and F. Juste. 2000. A Multi-Sensor Approach for Assessing Olive Oil Quality. *AgEng 2000*, 00-AE-013.
- Gutierrez, N., M. L. Rodríguez-Méndez, and J. A. de Saja. 2001. Array of Sensors Based on Lanthanide Bisphthalocyanine Langmuir-Blodgett Films for the Detection of Olive Oil Aroma. *Sensors and Actuators B*, no. 77: 437-42.
- Gutierrez-Osuna, R. 2000. Statistical Pattern Recognition. *Second School of the European Network of Excellence on Artificial Olfactory Sensing.*
- Hagleitner, C., A. Hierlemann, D. Lange, A. Kummer, N. Kerness, O. Brand, and H. Baltes. 2001. Smart Single-Chip Gas Sensor Micro system. *Nature*, no. 414: 293-96.
- Hatfield, J. V., J. A. Covington, and J. W. Gardner. 2000. GasFETs Incorporating Conducting Polymers as Gate Materials. *Sensors and Actuators B*, no. 65: 253-56.
- Hesse, M., H. Meier, and B. Zeeh. 1997. Espectrometría de Masas. *Métodos Espectroscópicos en Química Orgánica.* 5<sup>o</sup> ed., .Nueva York: Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Hines, E. L., E Lobet, and J. W. Gardner. 1999. Neural Network Based Electronic Nose for Apple Ripeness Determination. *Electronics Letters* 35, no. 10: 772-73.
- Holmberg, M. 2000. Drift Compensation. *Second School of the European Network of Excellence*

*on Artificial Olfactory Sensing.*

- Horvat, R. J., G. W. Chapman, J. A. Robertson, F. I. Meredith, R. Scorza, A. M. Callahan, and P. Morgens. 1990. Comparison of the Volatile Compounds from Several Commercial Peach Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 38: 234-37.
- Informe Unión Europea. 2000. *Agriculture in the European Union Statistical and Economic Information 2000*.
- Introduction to Ecological Biochemistry Feeding Preferences of Vertebrates, Including Man. 174-79.
- Kleperis, J., and L. Grinberga. 2001. Comparison of Odour Absorbing Capability of Different Textiles. *EURODEUR-AIRODEUR. La Metrologie des Odeurs et les Nez Electroniques*.
- Lacey, R. E., and G. S. Osborn. 1998. Application of Electronic Noses in Measuring Biological Systems. *ASAE Annual International Meeting*, 98-6116.
- Lavilla, M. T., J. Puy, M. L. López, I. Recasens, and M. Vendrell. 1999. Relationships between Volatile Production, Fruit Quality, and Sensory Evaluation in Granny Smith Apples Stored in Different Controlled-Atmosphere Treatments by Means of Multivariate Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, no. 47: 3791-803.
- Levine, I. N. 1984. *Físicoquímica*. McGraw-Hill.
- Llamazares, A., and A. Martínez. 2001. El Análisis Sensorial como Método para Evaluar La Calidad Final de las Frutas (I). *Informaciones Técnicas. Dirección General De Tecnología Agraria*, no. 94: 1-8.
- Llobet, E., E. L. Hines, J. W. Gardner, and Franco S. 1999. Non-Destructive Banana Ripeness Determination Using a Neural Network Based Electronic Nose. *Measurement Science and Technology* 10: 538-48.
- Llobet, E., R. Ionescu, S. Al-Khalifa, J. Brezmes, X. Vilanova, X. Correig, N. Bârsan, and J. W. Gardner. 2001. Multicomponent Gas Mixture Analysis Using a Single Tin Oxide Sensor and Dynamic Pattern Recognition. *IEEE Sensor Journal* 1, no. 3: 207-13.
- López, M. L., M. T. Lavilla, J. Graell, I. Recasens, and M. Vendrell. 1999. Effect of Different CA Conditions on Aroma and Quality of Golden Delicious Apples. *Journal of Food Quality*. no. 22: 583-97.
- López, M. L., M. T. Lavilla, I. Recasens, J. Graell, and M. Vendrell. 2000. Changes in Aroma Quality of Golden Delicious Apples after Storage at Different Oxygen and Carbon Dioxide Concentrations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, no. 80: 311-24.
- López, M. L., M. T. Lavilla, M. Riba, and M. Vendrell. 1998a. Comparison in Volatile Compounds in two Seasons in Apples: Golden Delicious and Granny Smith. *Journal of Food Quality*. no. 21: 155-66.
- López, M. L., T. Lavilla, I. Recasens, M. Riba, and M. Vendrell. 1998b. Influence of Different Oxygen and Carbon Dioxide Concentrations During Storage on Production of Volatile Compounds by Starking Delicious Apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, no. 46:

634-43.

- Lu, C. C., J. W. Gardner, and F. Udrea. 2001. Design and Development of SOI MOSFET Micro Gas Sensors. *Instruments Today*, no. 121: 76-90.
- Marco, S. 2000. Introduction to Artificial Neural Networks and Fuzzy Interference Systems. *Second School of the European Network of Excellence on Artificial Olfactory Sensing*.
- Marco, S., A. Ortega, A. Pardo, and J. Samitier. 1998. Gas Identification with Tin Oxide Sensor Array and Self-Organizing Maps: Adaptive Correction of Sensor Drifts. *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement* 47, no. 1.
- Maruniak, J. A. 1996. The Sense of Smell. *Sensory Analysis of Food*. Second ed., J. R. Piggott, 25-68. London and New York.
- Mattheis, J. P., D. A. Buchanan, and Fellman J.K. 1995. Volatile Compound Production by Bisbee Delicious Apples after Sequential Atmosphere Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43: 194-99.
- Matzger, A. J., C. E. Lawrence, R. H. Grubbs, and N. S. Lewis. 2000. Combinatorial Approaches to the Synthesis of Vapor Detector Arrays for an Electronic Nose. *J. Com. Chem.* , no. 2: 301-4.
- Maul, F., S. A. Sargent, D. J. Huber, M. O. Balaban, C. A. Sims, and E. A. Baldwin. 1999. Affect Volatile Profiles of Ripe Tomato Fruits: Electronic Nose and Gas Chromatographic Analyses. *5<sup>th</sup> International Symposium on Olfaction and the Electronic Nose*.
- McNair, H. M., and J. M. Miller. 1999. *Basic Gas Chromatography*. Wiley-Interscience Publication.
- Medved, A. V., Y. V. Gulyaev, R. G. Kryshtal, and V. V. Shemet. 2002. Electronically Tunable Saw Gas Sensors. *6th Interantional Symposium of Fruit, Nut, and Vegetable Production Engineering.*, 519 Institute of Agricultural Engineering Bornim e. V.(ATB).
- Mielle, P. 1996. "Electronic Nose" Towards the Objective Instrumental Characterization of Food Aroma. *Trends in Food Science & Technology* 7: 432-38.
- ———. 2000. Validity of Measurements: Sampling Methods. *Second School of the European Network of Excellence on Artificial Olfactory Sensing*.
- Mielle, P., and F. Marquis. 1999. An Alternative Way to Improve the Sensitivity of Electronic Olfactometers. *Sensors and Actuators B*, no. 58: 526-35.
- Mistry, B. S., T. Reineccius, and L. K. Olson. 1997. Gas Chromatography - Olfactometry for the Determination of Key Odorants in Foods. *Techniques for Analysing Food Aroma.* , 265-93. Vol. 79. Ray Marsili.
- Moltó, E., E. Selfa, J. Ferriz, E. Conesa, and A. Gutierrez. 1999. An aroma sensor for assessing peach quality. *Journal of Agricultural Engineering Research* 72: 311-16.
- Nobel, P. S. 1970. *Biophysical Plant Physiology*. USA: W.H. Freeman and Company.
- Paolesse, R., C. Di Natale, V. Campo dall'Orto, A. Macagnano, A. Angelaccio, N. Motta, A.

- Sgarlata, J. Hurst, I. Rezzano, M. Mascini, and A. D'Amico. 1999a. Porphyrine Thin Solid Films Solid Coated Quartz Crystal Microbalances Prepared by Electropolymerization Technique . *Thin Solid Films* 354: 245-50.
- Paolesse, R., C. di Natale, A. Macagnano, F. Sagone, M. A. Scarsekli, P. Chiaradia, V. I. Troitsky, T. S. Berzina, and A. D'Amico. 1999b. Langmuir-Blodgett Films of a Manganese Corrole Derivative. *Langmuir*, no. 15: 1268-74.
  - Pardo, M., A. Bottarelli, G. Sberveglieri, S. Sironi, P. Centola, M. Bergonzoni, and L. Cortellini. 2001. Monitoring Olfactory Nuisances with the Pico-1 Electronic Nose. *EURODEUR-AIRODEUR. La Metrologie des Odeurs et les Nez Electroniques*.
  - Paulsson, N. 2000. New Instrumentation for Forensic Applications: Automatic Fiber Detection and Breath Alcohol Measurements. *Linköping Studies in Science Technology Dissertation*, no. 632.
  - Perera, A., T. Pardo, T. Sundic, R. Gutierrez-Osuna, S. Marco, and J. Nicolas. 2001. IpNose: Electronic Nose for Remote Bad Odour Monitoring System in Landfill Sites. *EURODEUR-AIRODEUR. La Metrologie des Odeurs et les Nez Electroniques*.
  - Pérez, A. G., C. Sanz, J. J. Ríos, and J. M. Olías. 1993. Estudio Comparativo de los Perfiles Aromáticos de Manzana, Plátano y Fresa. *Revista Española De Ciencia y Tecnología De Los Alimentos*. 33, no. 6: 665-77.
  - Persaud, K. C. 2002. Intelligent Conducting Polymer Chemical Sensors. *First World Congress on Biomimetics and Artificial Muscles* .
  - Poll, L. 1985. The Influence of Apple Ripeness and Juice Storage Temperature on the Sensory Evaluation and Composition (Volatile and Non-Volatile Components) of Apple Juice. 18: 205-11.
  - Rebière, D., C. Dejous, C. Cazaubon, and J. Pistré. 2001. Real Time SAW Sensory Array System Using Shifting Temporal Window Technique. *EURODEUR-AIRODEUR. La Metrologie des Odeurs et les Nez Electroniques*.
  - Rechenbach, T., U. Schramm, P. Boeker, G. Horner, C. E. O. Roesky, J. Trepte, S. Winter, R. Pollex, J. Bargon, E. Weber, and P. Schulze Lammers. 1999. A Humidity-Independent Ammonia Sensor Based on a Quartz Microbalance: a Test Under Agricultural Conditions. *Sensors and Actuators B* 57: 255-60.
  - Ragazzo, J. A., P. Chalier, J. Crouzet, and C. Ghommidh. Identification of Alcoholised Beverages by Coupling GC and Electronic Nose.
  - Reglamento (CE) N° 1619/2001 de la Comisión. 2001. Reglamento del 6 de Agosto de 2001, por el que se Establecen las Normas de Comercialización de las Manzanas y Peras y se Modifica el Reglamento (CEE) n° 920/89. *Diario Oficial De Las Comunidades Europeas* 9.8.2001, no. L 215: 3-16.
  - Rizzolo, A., and A. Polesello. 1989. CGC/Sensory Analysis of Volatile Compounds Developed from Ripening Apple Fruit. *Journal of High Resolution Chromatography*. 12: 824-27.
  - Saevels, S., C. di Natale, and B. Nicolai. 2002. Electronic Nose Technology to Evaluate Picking Date of Apples. *6th Interantional Symposium of Fruit, Nut, and Vegetable Production*

*Engineering*, 519 Institute of Agricultural Engineering Bornim e. V.(ATB).

- Saevels, S., E. A. Veraverbeke, A. Z. Berna, J. Lammertyn, C. di Natale, and B. M. Nicolai. 2002. Evaluating Apple Quality after Storage by Means of an Electronic Nose and GC. *EurAgEng 2002*, 02-Ph-031.
- Sabate, P. 1999. La Estructura Financiera de las Cooperativas Agrarias. Las Cooperativas Comercializadoras de Fruta de la Provincia de Lleida. *Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg.* 14, no. 3: 495-513.
- Sarig, Y. 2000. Potential Applications of Artificial Olfactory Sensing for Quality Evaluation of Fresh Produce. *Journal of Agricultural Engineering Research* 77, no. 3: 239-58.
- Sberveglieri, G. 1995. Recent Developments in Semiconducting Thin-Film Gas Sensors. *Sensors and Actuators B* 23: 103-9.
- Sberveglieri, G., E. Comini, G. Faglia, G. Niederjaufer, and G. Benussi. 1998. A Novel Electronic Nose Based on Semiconductor Thin film Sensor to Distinguish Different Heat Treatments of Milk. *Seminars in Food Analysis* 3: 67-76.
- Sberveglieri, G., G. Faglia, S. Gropeli, P. Nelli, and A. Taroni. 1992. A Novel PVD Technique for the Preparation of SnO<sub>2</sub> Thin Film as C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH Sensors. *Sensors and Actuators B* 7: 721-26.
- Sberveglieri, G., S. Gropeli, P. Nelli, C. Perego, G. Valdre, and A. Camanzi. 1993. Detection of Sub-ppm H<sub>2</sub>S Concentrations by Means of SnO<sub>2</sub> (Pt) Thin Films, Grown by the RGTO Technique. *Sensors and Actuators B* 15, no. 16: 86-89.
- Sberveglieri, G., S. Gropeli, P. Nelli, A. Tintinelli, and G. Giunta. 1995. A Novel Method for the Preparation of NH<sub>3</sub> Sensors Based on ZnO-In Thin Films. *Sensors and Actuators B* 24, no. 25: 588-90.
- Schramm, U., C. E. O. Roesky, S. Winter, T. Rechenbach, P. Boeker, P. Schulze Lammers, E. Weber, and J. Bargon. 1999. Temperature Dependence of an Ammonia Sensor Humid Air Based on a Cryptophane-Coated Quartz Microbalance. *Sensors and Actuators B* 57: 233-37.
- Schweizer-Berberich, P. M., S. Vaihinger, and W. Göpel. 1994. Characterisation of Food Freshness with Sensor Arrays. *Sensors and Actuators B* 18-19: 282-90.
- Shaath, N. A., and P. M. Griffin. 1988. Modern Analytical Techniques in the Flavor Industry. *5th International Flavor Conference*, 89. Developments in Food Science, no. 17, Frontiers of Flavor. George Charalambous.
- Shepherd, N. 1999. Sensory Assessment of Foods. *Summer School "Sensors for Food Applications"*.
- Shiota Haruyasu. 1990. Changes in the Volatile Composition of La France Pear During Maturation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 52: 421-29.
- Song, J., and F. Bangerth. 1994. Production and Development of Volatile Aroma Compounds Apple Fruits at Different Times of Maturity. *Acta Horticulturae*. 368: 150-159.
- Southgate, D. 1992. *Conservación de Frutas y Hortalizas*. Zaragoza: ACRIBIA, S.A.

- Strathmann, S., and U. Weimar. 2000. Sensor Overview II: Semiconductor Based Transducers. *Second School of the European Network of Excellence on Artificial Olfactory Sensing*.
- Streif, J., and F. Bangerth. 1988. Production of Volatile Aroma Substances by "Golden Delicious" apple fruits after storage for various times in different CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> concentrations. *Journal of Horticultural Science*. 63, no. 2: 193-99.
- Suslick, K. S., and N. A. Rakow. 2001. A Colorimetric Nose: "Smell-Seeing". *Artificial Chemical Sensing: Olfaction and the Electronic Nose*. J. R. Stetter, and W. R. Pensrose, 8-14. Pennington, NJ.: Electrochem. Soc.
- Svenningstorp, H., L. Unéus, P. Tobias, I. Lundström, L. G. Ekedahl, and A. Lloyd. 1999. High Temperature Gas Sensors Based in Catalytic Metal Field Effect Transistors. *ICSCRM'99*.
- Takeoka, G. R., R. G. Buttery, and R. A. Flath. 1992. Volatile Constituents of Asian Pear (*Pyrus serotina*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40: 1925-29.
- Takeoka, G. R., R. A. Flath, T. R. Mon, R. Teranishi, and M. Guentert. 1990. Volatile Constituents of Apricot (*Prunus armeniaca*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 38: 471-77.
- Tauler, R. 2000. Chemometric methods: linear methods. *Second School of the European Network of Excellence on Artificial Olfactory Sensing*.
- Udrea, F., J. W. Gardner, J. A. Setiadi, J. A. Covington, C. C. Dogaru, C. C. Lu, and W. I. Milne. 2001. Design and Simulations of a New Class of SOI CMOS Micro Hot-Plate Gas Sensors. *Sensors and Actuators B*, no. 78: 180-190.
- van de Velde, C., F. Blockhuys, C. van Alsenoy, A. Lenstra, and H. J. Geise. 2002. Structural Effects Influencing Cis-Trans Isomerisation in Methoxy and Cyano Substituted Stilbene Derivatives. *Journal of the Chemical Society: Perkin Transactions II*: 1345-51.
- Watada, A. E., Abbott J.A., R. E. Hardenburg, and W. Lusby. 1981. Relationships of Apple Sensory Attributes to Headspace Volatiles, Soluble Solids and Titratable Acids. *Journal of American Society of Horticultural Science*. 106, no. 2: 130-132.
- Young, H., J. M. Gilbert, S. H. Murray, and R. D. Ball. 1996. Causal Effects of Aroma Compounds on Royal Gala Apple Flavours. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 71: 329-36.
- Young, H., K. Rossiter, M. Wang, and M. Miller. 1999. Characterization of Royal Gala Apple Aroma Using Electronic Nose Technology-Potential Maturity Indicator. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, no. 47: 5173-77.

# **Anejo I:**

# **normas de comercialización**

# **de manzanas y peras**

---



**REGLAMENTO (CE) Nº 1619/2001 DE LA COMISIÓN**

**de 6 de agosto de 2001**

**por el que se establecen las normas de comercialización de las manzanas y peras y se modifica el Reglamento (CEE) nº 920/89**

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea,

Visto el Reglamento (CE) nº 2200/96 del Consejo, de 28 de octubre de 1996, por el que se establece la organización común de mercados en el sector de las frutas y hortalizas <sup>(1)</sup>, cuya última modificación la constituye el Reglamento (CE) nº 911/2001 de la Comisión <sup>(2)</sup>, y, en particular, el apartado 2 de su artículo 2,

Considerando lo siguiente:

- (1) Las manzanas y las peras figuran en el anexo I del Reglamento (CE) nº 2200/96 entre los productos que deben estar regulados por normas. El Reglamento (CEE) nº 920/89 de la Comisión, de 10 de abril de 1989, por el que se establecen normas de calidad para las zanahorias, los cítricos y las manzanas y peras de mesa y por el que se modifica el Reglamento nº 58 de la Comisión <sup>(3)</sup>, cuya última modificación la constituye el Reglamento (CE) nº 730/1999 <sup>(4)</sup>, ha sido objeto de múltiples modificaciones que menoscaban su necesaria claridad jurídica.
- (2) Para garantizar esa claridad, es oportuno que la normativa aplicable a las manzanas y las peras tenga carácter autónomo con relación a la de los otros productos incluidos en el Reglamento (CEE) nº 920/89. Es necesario por ello proceder a una refundición de esa normativa y suprimir el anexo III del citado Reglamento. Por motivos de transparencia en el mercado mundial, es preciso que en esa refundición se tenga en cuenta la norma recomendada para las manzanas y las peras por el Grupo de trabajo de normalización de los alimentos perecederos y de desarrollo de la calidad, de la Comisión Económica de las Naciones Unidas para Europa (CEPE-NU).
- (3) La aplicación de las presentes disposiciones deberá permitir eliminar del mercado los productos de calidad insatisfactoria, orientar la producción a las exigencias de los consumidores y facilitar las relaciones comerciales en un marco de competencia leal, contribuyendo así a aumentar la rentabilidad de la producción.
- (4) Estas disposiciones han de aplicarse en todas las fases de la comercialización; el transporte a larga distancia, el almacenamiento de cierta duración o las diversas manipulaciones a las que se someten los productos pueden provocar en ellos alteraciones debidas a su evolución

biológica o a su carácter más o menos perecedero. Procede tener en cuenta esas alteraciones al aplicar las normas en las fases de la comercialización que siguen a la de expedición. En el caso de los productos de la categoría «Extra», que deben seleccionarse y acondicionarse con especial cuidado, la única alteración que ha de poder admitirse es la disminución de la frescura y la turgencia.

- (5) Las medidas previstas en el presente Reglamento se ajustan al dictamen del Comité de gestión de las frutas y hortalizas frescas.

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

*Artículo 1*

En el anexo se establecen las normas de comercialización de los productos siguientes:

- las manzanas del código NC ex 0808 10,
- las peras del código NC ex 0808 20.

Dichas normas se aplicarán en todas las fases de la comercialización en las condiciones dispuestas por el Reglamento (CE) nº 2200/96.

No obstante, en las fases siguientes a la de expedición, los productos podrán presentar frente a las disposiciones de esas normas:

- una ligera disminución de su estado de frescura y de turgencia, y,
- salvo en el caso de los productos clasificados en la categoría «Extra», ligeras alteraciones debidas a su evolución y su carácter más o menos perecedero.

*Artículo 2*

El Reglamento (CEE) nº 920/89 se modificará como sigue:

- 1) Se suprimirá el tercer guión del apartado 1 del artículo 1.
- 2) Se suprimirá el anexo III.

*Artículo 3*

El presente Reglamento entrará en vigor el vigésimo día siguiente al de su publicación en el *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*.

Será aplicable a partir del primer día del segundo mes siguiente al de su entrada en vigor.

<sup>(1)</sup> DO L 297 de 21.11.1996, p. 1.

<sup>(2)</sup> DO L 129 de 11.5.2001, p. 3.

<sup>(3)</sup> DO L 97 de 11.4.1989, p. 19.

<sup>(4)</sup> DO L 93 de 8.4.1999, p. 14.

El presente Reglamento será obligatorio en todos sus elementos y directamente aplicable en cada Estado miembro.

Hecho en Bruselas, el 6 de agosto de 2001.

*Por la Comisión*  
Franz FISCHLER  
*Miembro de la Comisión*

---

## ANEXO

## NORMAS PARA LAS MANZANAS Y PERAS

## I. DEFINICIÓN DEL PRODUCTO

Las presentes normas se aplicarán a las manzanas y las peras de las variedades (cultivares) obtenidas de *Malus domestica* Borkh. y de *Pyrus communis* L. que se destinen a su entrega en estado fresco al consumidor y no a la transformación industrial.

## II. DISPOSICIONES RELATIVAS A LA CALIDAD

Esta norma tiene por objeto establecer los requisitos de calidad que deberán cumplir las manzanas y las peras tras su acondicionamiento y envasado.

## A. Requisitos mínimos

En el caso de todas las categorías y sin perjuicio de las disposiciones especiales de cada una de ellas y de los límites de tolerancia establecidos, las manzanas y las peras deberán estar:

- enteras,
- sanas, quedando excluidos los productos que presenten podredumbre u otras alteraciones que los hagan impropios para el consumo,
- limpias, es decir, prácticamente exentas de materias extrañas visibles,
- prácticamente exentas de plagas,
- prácticamente exentas de daños causados por plagas,
- exentas de un grado anormal de humedad exterior,
- exentas de olores y sabores extraños.

Además, tendrán que haberse recolectado con cuidado y se hallarán en un estado y una fase de desarrollo que les permitan:

- continuar el proceso de maduración y alcanzar el grado de madurez que sea adecuado en función de las características de su variedad <sup>(1)</sup>,
- conservarse bien durante su transporte y manipulación, y
- llegar en condiciones satisfactorias a su destino.

## B. Clasificación

Las manzanas y las peras se clasificarán en una de las tres categorías siguientes:

## i) Categoría «Extra»

Las manzanas y peras de esta categoría deberán ser de calidad superior, presentarán las características de forma, desarrollo y color <sup>(2)</sup> que sean propias de la variedad a la que pertenezcan y conservarán su pedúnculo intacto.

La pulpa no deberá haber sufrido ningún deterioro.

Además, no podrán presentar defectos, salvo ligerísimas alteraciones superficiales de la epidermis que no afecten al aspecto general del producto ni a su calidad, conservación y presentación en el envase.

Las peras no deberán ser pétreas.

## ii) Categoría I

Las manzanas y peras de esta categoría deberán ser de buena calidad y presentarán las características de forma, desarrollo y color <sup>(2)</sup> que sean propias de la variedad a la que pertenezcan.

La pulpa no deberá haber sufrido ningún deterioro.

<sup>(1)</sup> Debido a las características propias de la variedad Fuji en lo que se refiere a la madurez en el momento de la cosecha, se admitirá la vidriosidad radial siempre que ésta se limite al haz fibro-conductor de cada fruto.

<sup>(2)</sup> Los criterios de color y de coloración castaña de las manzanas figuran en el apéndice de las presentes normas junto con una lista no exhaustiva de las variedades a las que se aplica cada criterio.

No obstante, siempre que no se vean afectados su aspecto general ni su calidad, conservación y presentación en el envase, algunos frutos podrán presentar los defectos leves siguientes:

- una ligera malformación,
- un ligero defecto de desarrollo,
- un ligero defecto de coloración,
- ligeros defectos de la epidermis que no sobrepasen los límites siguientes:
  - 2 cm de longitud en el caso de los defectos de forma alargada,
  - 1 cm<sup>2</sup> de superficie total en el caso de los demás defectos, salvo la roña (*Venturia inaequalis*), cuya superficie no podrá exceder de 0,25 cm<sup>2</sup>,
  - 1 cm<sup>2</sup> de superficie total en el caso de las magulladuras ligeras, excluidas las decoloradas.

Las manzanas de esta categoría podrán haber perdido el pedúnculo, siempre que la línea de rotura sea limpia y que la epidermis adyacente no se halle deteriorada. En el caso de las peras, el pedúnculo podrá estar ligeramente dañado.

Las peras no deberán ser pétreas.

### iii) Categoría II

Esta categoría comprenderá las manzanas y peras que no puedan clasificarse en las categorías superiores pero que cumplan los requisitos mínimos arriba establecidos <sup>(1)</sup>.

La pulpa no deberá presentar ningún defecto importante.

No obstante, siempre que el fruto conserve sus características esenciales de calidad, conservación y presentación, se admitirán:

- malformaciones,
- defectos de desarrollo,
- defectos de coloración,
- defectos de la epidermis que no sobrepasen los límites siguientes:
  - 4 cm de longitud en el caso de los defectos de forma alargada,
  - 2,5 cm<sup>2</sup> de superficie total en el caso de los demás defectos, incluidas las magulladuras ligeramente decoloradas y excluida la roña (*Venturia inaequalis*), cuya superficie no podrá exceder de 1 cm<sup>2</sup>.

## III. DISPOSICIONES RELATIVAS AL CALIBRADO

El calibre de las manzanas y las peras vendrá determinado por el diámetro máximo de la sección ecuatorial o por el peso.

En este segundo caso, el peso mínimo deberá fijarse de tal forma que todos los frutos presenten el diámetro mínimo que se indica a continuación para cada categoría:

		(en mm)		
		«Extra»	Categoría I	Categoría II
<b>Manzanas</b>				
Variedades de fruto grande <sup>(1)</sup>		70	65	65
Otras variedades		60	55	55
<b>Peras</b>				
Variedades de fruto grande <sup>(1)</sup>		60	55	55
Otras variedades		55	50	45

<sup>(1)</sup> El apéndice de las presentes normas contiene una lista no exhaustiva de las variedades de fruto grande.

Excepcionalmente, no se exigirá un calibre mínimo para las variedades de peras de verano que, estando incluidas en la lista del Apéndice de las presentes normas, se expidan entre el 10 de junio y el 31 de julio, inclusive, de cada año.

<sup>(1)</sup> Los criterios de color y de coloración castaña de las manzanas figuran en el apéndice de las presentes normas junto con una lista no exhaustiva de las variedades a las que se aplica cada criterio.

Con el fin de garantizar la homogeneidad de calibre, la diferencia de diámetro entre los frutos mayor y menor de un mismo envase no podrá sobrepasar los límites siguientes:

- 5 mm en el caso de los frutos de categoría Extra y en el de los de las categorías I y II que se presenten en capas ordenadas <sup>(1)</sup>,
- 10 mm en el caso de los frutos de categoría I que se presenten a granel dentro de un envase o un envase previo <sup>(2)</sup>.

Los frutos de categoría II que se presenten a granel en un envase o un envase previo no estarán sujetos a ningún requisito de homogeneidad de calibre.

#### IV. DISPOSICIONES RELATIVAS A LAS TOLERANCIAS

Dentro de los límites que se disponen a continuación, se admitirá en cada envase la presencia de productos que no cumplan los requisitos de calidad y calibre de la categoría en él indicada.

##### A. Tolerancias de calidad

###### i) Categoría «Extra»

Un 5 % en número o en peso de manzanas o peras que no cumplan los requisitos de esta categoría pero que se ajusten a los de la categoría I o, excepcionalmente, que se incluyan en las tolerancias de esa categoría.

###### ii) Categoría I

Un 10 % en número o en peso de manzanas o peras que no cumplan los requisitos de esta categoría pero que se ajusten a los de la categoría II o, excepcionalmente, que se incluyan en las tolerancias de esa categoría. Esta tolerancia no será aplicable a las peras que estén desprovistas de pedúnculo.

###### iii) Categoría II

Un 10 % en número o en peso de manzanas o peras que no cumplan los requisitos de esta categoría ni tampoco los requisitos mínimos, quedando excluidos los frutos que presenten podredumbre, magulladuras profundas u otras alteraciones que los hagan impropios para el consumo.

Dentro de esta tolerancia, se podrá admitir, como máximo, un 2 % en número o en peso de frutos que presenten los defectos siguientes:

- ataques importantes de suberificación o de vidriosidad,
- ligeras lesiones o grietas no cicatrizadas,
- ligerísimas trazas de podredumbre,
- presencia de parásitos vivos en el fruto y/o alteraciones de la pulpa causadas por parásitos.

##### B. Tolerancias de calibre

En el caso de todas las categorías:

- a) tratándose de productos sujetos a los requisitos de homogeneidad, un 10 % en número o en peso de frutos que se ajusten al calibre inmediatamente inferior o superior al indicado en el envase; para los frutos clasificados en el calibre más pequeño de los fijados en el título III («Disposiciones relativas al calibrado»), sólo se admitirá una variación de hasta 5 mm con respecto a ese calibre mínimo;
- b) tratándose de productos no sujetos a los requisitos de homogeneidad, un 10 % en número o en peso de frutos que no alcancen el calibre mínimo fijado, con una variación máxima de 5 mm con respecto a ese calibre.

<sup>(1)</sup> No obstante, en el caso de las manzanas de las variedades Bramley's Seedling (Bramley, Triomphe de Kiel) y Horneburger, la diferencia de diámetro podrá alcanzar 10 mm.

<sup>(2)</sup> No obstante, en el caso de las manzanas de las variedades Bramley's Seedling (Bramley, Triomphe de Kiel) y Horneburger, la diferencia de diámetro podrá alcanzar 20 mm.

**V. DISPOSICIONES RELATIVAS A LA PRESENTACIÓN****A. Homogeneidad**

El contenido de cada envase deberá ser homogéneo, incluyendo únicamente manzanas o peras del mismo origen, variedad, calidad, estado de madurez y calibre (este último sólo en los casos en que sea exigible).

Además, en el caso de la categoría Extra, será obligatoria también la homogeneidad de coloración.

La homogeneidad de variedad no será exigible en el caso de los pequeños envases de manzanas, de un peso neto no superior a 3 kg, que se destinen a la venta al consumidor. Tampoco la homogeneidad de origen será obligatoria cuando se comercialicen diferentes variedades de manzanas dentro de un mismo envase.

La parte visible del contenido del envase tendrá que ser representativa del conjunto.

**B. Acondicionamiento**

El envase de las manzanas y peras deberá protegerlas convenientemente.

Los materiales utilizados en el interior del envase deberán ser nuevos, estar limpios y ser de una materia que no pueda causar al producto alteraciones internas ni externas. Se permitirá el uso de materiales y, en especial, de papeles o sellos que lleven indicaciones comerciales, siempre que la impresión o el etiquetado se hagan con tintas o gomas que no sean tóxicas.

Los envases deberán estar exentos de materias extrañas.

**C. Presentación**

Los frutos de categoría «Extra» deberán envasarse en capas ordenadas.

**VI. DISPOSICIONES RELATIVAS AL MARCADO**

Cada envase llevará, agrupadas en uno de sus lados y con caracteres legibles, indelebles y visibles, las indicaciones siguientes:

**A. Identificación**

Envasador y/o expedidor: nombre y dirección o código expedido o reconocido oficialmente. En caso de utilizarse un código, se harán figurar junto a él las palabras «Envasador y/o expedidor» (o abreviaturas correspondientes).

**B. Naturaleza del producto**

- «Manzanas» o «Peras», si no puede verse el contenido.
- Nombre de la variedad o, en su caso, de las variedades.

**C. Origen del producto**

País de origen y, en su caso, zona de producción o denominación nacional, regional o local. En el caso al que se refiere el párrafo tercero del punto V.A, es decir, cuando se comercialicen manzanas de diferentes variedades y orígenes en un mismo envase destinado a la venta al consumidor, deberá indicarse el país de origen de cada una de esas variedades.

**D. Características comerciales**

- Categoría.
- Calibre o, en el caso de los frutos que se presenten en capas ordenadas, número de piezas.  
Cuando la identificación del producto se haga por el calibre, se indicarán:
  - a) en el caso de los frutos sujetos a los requisitos de homogeneidad, los diámetros mínimo y máximo;
  - b) en el caso de los frutos no sujetos a esos requisitos, el diámetro de la pieza menor del envase, seguido de «o más» u «o +», o, en su caso, el diámetro de la pieza mayor.

**E. Marca de control oficial** (facultativa).

## APÉNDICE

## 1. COLOR DE LAS MANZANAS

Las variedades de manzanas se clasificarán en cuatro grupos según su color:

**Grupo A — Variedades rojas**

Categoría «Extra»: coloración roja de al menos  $\frac{1}{4}$  de la superficie del fruto.

Categoría I: coloración roja de al menos  $\frac{1}{2}$  de la superficie del fruto.

Categoría II: coloración roja de al menos  $\frac{1}{4}$  de la superficie del fruto.

**Grupo B — Variedades de coloración mixta-roja**

Categoría «Extra»: coloración roja de al menos  $\frac{1}{2}$  de la superficie del fruto.

Categoría I: coloración roja de al menos  $\frac{1}{3}$  de la superficie del fruto.

Categoría II: coloración roja de al menos  $\frac{1}{10}$  de la superficie del fruto.

**Grupo C — Variedades estriadas, ligeramente coloreadas**

Categoría «Extra»: coloración roja, en estrías, de al menos  $\frac{1}{3}$  de la superficie del fruto.

Categoría I: coloración roja, en estrías, de al menos  $\frac{1}{10}$  de la superficie del fruto.

**Grupo D — Otras variedades**

## 2. CRITERIOS DE «RUSSETING» DE LAS MANZANAS

Las variedades de manzanas se clasificarán en dos grupos según su «russetting»:

**Grupo R** — Variedades cuyo «russetting» es característico de su epidermis y no constituye un defecto si responde al aspecto varietal típico.

Para el resto de las variedades, el «russetting» se admitirá dentro de los límites siguientes:

	Categoría Extra	Categoría I	Categoría II	Tolerancia de la categoría II
i) Manchas pardas	Que no sobrepasen la cavidad peduncular	Que sobrepasen ligeramente la cavidad peduncular o pistilar	Que sobrepasen la cavidad peduncular o pistilar	Frutos que no puedan afectar gravemente al aspecto y estado del contenido del envase
	Que no sean rugosas	Que no sean rugosas	Que sean ligeramente rugosas	
ii) «Russetting»		<b>Proporción máxima en la superficie del fruto</b>		
Reticular fina (sin fuertes contrastes con la coloración general del fruto)	Consistente en ligeras señales aisladas que no afecten al aspecto general del fruto o del contenido del envase	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{2}$	Frutos que no puedan afectar gravemente al aspecto y estado del contenido del envase
Densa	Inexistente	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{3}$	Frutos que no puedan afectar gravemente al aspecto y estado del contenido del envase

	Categoría Extra	Categoría I	Categoría II	Tolerancia de la categoría II
De ambos tipos (excluidas las manchas pardas arriba indicadas), sin sobrepasar en conjunto un máximo de:	—	1/5	1/2	Frutos que no puedan afectar gravemente al aspecto y estado del contenido del envase

### 3. CALIBRE DE LAS MANZANAS Y LAS PERAS

Las variedades de manzanas y de peras se clasificarán en tres grupos según su calibre:

**Grupo GF** — Variedades de manzanas y peras de fruto grande indicadas en el cuadro que figura en el título III de las «Normas para las manzanas y peras».

**Grupo PE** — Variedades de peras de verano indicadas en el párrafo segundo del título III de las «Normas para las manzanas y peras».

Otras variedades.

### 4. LISTA NO EXHAUSTIVA DE VARIEDADES DE MANZANAS CLASIFICADAS SEGÚN SU COLOR, «RUSSETING» Y CALIBRE

Variiedad	Sinónimos y/o mutaciones	Grupo de coloración	Coloración castaña	Calibre
Abbondanza		C		
Akane	Prime Rouge, Prime Red, Tohoku 3, Tokyo Rose	B		
Alice		B		
Alkmenc	Early Windsor	C		
Altländer				GF
Apollo		C		GF
Arlet		C		GF
Aroma		C		
Aroma Amorosa		B		
Ashmead's Kernel			R	
Belfort	Pella	B		
Bellavista	Vista Bella	B		
Belle de Boskoop y mutaciones	Schöner von Boskoop, Schone van Boskoop, Goudrenet		R	GF
Belle fleur double				GF
Berlepsch		C		
Berlepsch rouge	Red Berlepsch, Roter Berlepsch	B		
Bismarck				GF
Black Ben Davis		A		GF
Black Stayman		A		GF
Blenheim				GF
Boskoop rouge	Red Boskoop, Roter Boskoop, Schmitz-Hübsch, Rode Roskoop	B	R	GF



Variedad	Sinónimos y/o mutaciones	Grupo de coloración	Coloración castaña	Calibre
Braeburn		C		GF
Bramley's Seedling	Bramley, Triomphe de Kiel			GF
Brettacher				GF
Calville (grupo de las ...)				GF
Cardinal		B		
Carmio		A		
Carola	Kalco	C		GF
Casanova de Alcobaça		C		
Charden				GF
Charles Ross				GF
Chata Encarnada		C		
Commercio		C		
Cortland		B		GF
Cox Pomona				GF
Cox's Orange Pippin y mutaciones	Cox Orange	C Cherry Cox: B	R	
Crimson Bramley				GF
Cunha	Riscadinha	C		
Delicious ordinaire	Ordinary Delicious	B		
Delicious Pilafa		B		GF
Democrat		A		GF
Discovery		B		
Dunn's Seedling			R	
Egremont Russet			R	
Elan				GF
Ellison's Orange (Ellison)		C		GF
Elstar		C		
Finkenwerder				GF
Fortuna Delicious		A		GF
Fortune			R	
Fuji		C		GF
Gala		C		
Garcia				GF
Gelber Edel				GF
Glorie van Holland				GF
Gloster 69		B		GF
Golden Delicious y mutaciones				GF
Golden Russet			R	
Graham	Graham Royal Jubile			GF
Granny Smith				GF
Gravenstein rouge	Red Gravenstein, Gravenstein rossa, Roter Gravensteiner	B		GF


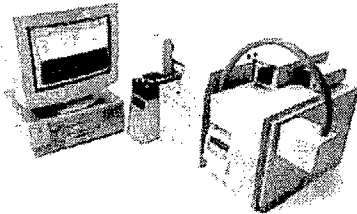

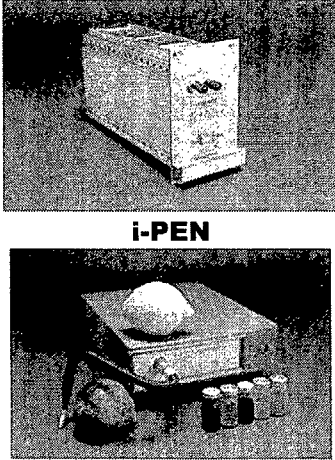
## 5. LISTA NO EXHAUSTIVA DE VARIEDADES DE PERAS CLASIFICADAS SEGÚN SU CALIBRE

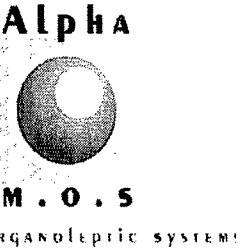
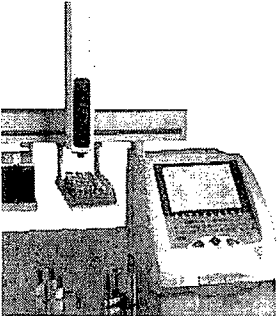
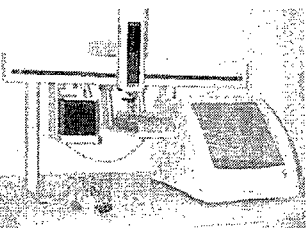
Variedad	Sinónimos y/o mutaciones	Calibre
Abbé Fétel	Abbate Fétel, Abate Fétel	GF
Abugo o Siete en Boca		PE
Alexandrine Douillard		GF
André Desportes		PE
Azucar Verde		PE
Bergamotten		PE
Beurré Alexandre Lucas	Lucas, Alexander Lucas	GF
Beurré Clairgeau	Clairgeau, Clairgeaus Butterbirne	GF
Beurré d'Arenberg	Hardenpont	GF
Beurré Diel	Diels Butterbirne	GF
Beurré Giffard	Giffards Butterbirne	PE
Beurré Gris		PE
Beurré Lebrun		GF
Beurré précoce Morettini	Buttira precoce Morettini	PE
Blanca de Aranjuez	Agua de Aranjuez, Espadona, Blanquilla	PE
Buntrocks		PE
Carapinha		PE
Carusella		PE
Castell	Castell de Verano	PE
Catillac	Pondspear, Ronde Gratio, Grand Monarque, Charteuse	GF
Claude Blanchet		PE
Colorée de Juillet	Bunte Juli	PE
Condoula		PE
Coscia	Ercolini	PE
Curé	Curato, Pastoren, Del Cura de Ouro, Espadon de Invierno, Bella de Berry, Lombarda de Rioja, Batall de Campana	GF
D. Joaquina	Doyenné de Juillet	PE
Devoe		GF
Don Guido		GF
Doyenné d'hiver	Winterdechant, Decana d'Inverno	GF
Doyenné du Comice	Comice, Vereinsdechant, Decana del Comizio	GF
Duchesse d'Angoulême	Duchessa d'Angoulême	GF
Empereur Alexandre	Beurré Bosc, Bosc, Beurré d'Apremont, Kaiser Alexander, Imperatore Alessandro, Kaiserkrone, Alexanderbirne	GF
Flor de Invierno		GF


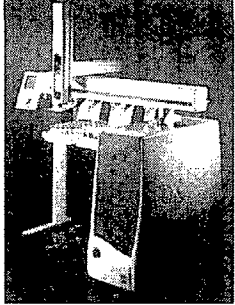
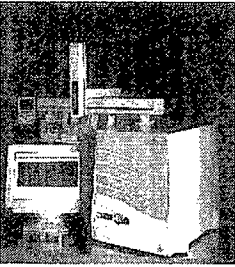
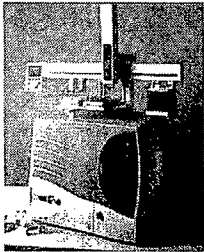
# **Anejo II:**


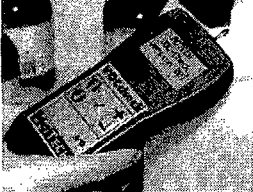
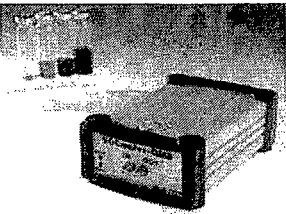
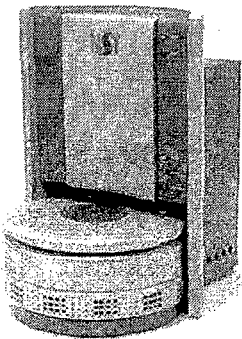
## **modelos comerciales de NE**


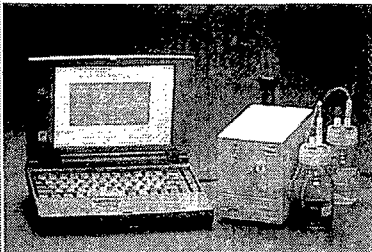
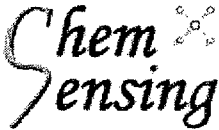
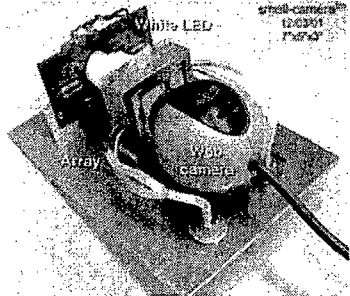
---

Fabricante y sitio de Internet	Equipo comercial	Tipo de sensor/ sistema de muestreo/ Portabilidad	Aplicaciones	Universidad
<p>Agilent Technology (Dinamarca) <a href="http://we.home.agilent.com">http://we.home.agilent.com</a></p> 	 <p><b>Agilent 4440A</b></p>	<p>EM con detector cuadrupolar.</p> <p>Sistema automático de muestreo.</p> <p>No portátil</p>	<p>Industria alimentaria, farmacéutica y química.</p>	
<p>Airsense Analysis GMBH <a href="http://www.airsense.com/">http://www.airsense.com/</a></p> 	 <p><b>i-PEN</b></p> <p><b>PEN-EDU</b></p>	<p>10 x MOS</p> <p>Sonda activa de muestreo</p> <p>Portátil</p>	<p>Detección de escape de gases y vapores. Realización de controles de calidad rápidos en la industria alimentaria</p> <p>Límites de detección muy bajos (ppb) y capacidad para incrementar su selectividad para aplicaciones en por ejemplo la industria de bebidas alcohólicas.</p>	


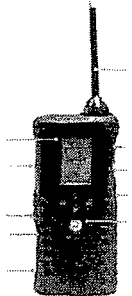


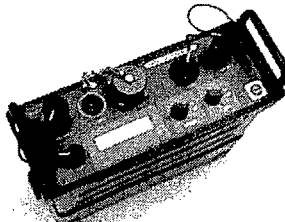
Fabricante y sitio de Internet	Equipo comercial	Tipo de sensor/ sistema de muestreo/ Portabilidad	Aplicaciones	Universidad
<p>AlphaMOS (Francia)</p> <p><a href="http://www.alpha-mos.com/">http://www.alpha-mos.com/</a></p> 	 <p><b>α-Centauri</b></p>  <p><b>α-Gemini</b></p>	<p>6 xMOS.</p> <p>Sistema automático de muestreo</p> <p>No portátil</p> <p>MOS</p> <p>Sistema automático de muestreo</p> <p>No portátil</p>	<p>Aporta información cualitativa y cuantitativa en tiempo real que permite que tenga aplicaciones en el aseguramiento preciso de grados de calidad y cantidad de contaminantes presentes. Rancidez en aceites.</p> <p>Análisis de datos basado en la generación de un "fingerprint" que permite detectar las variaciones en la calidad del producto respecto del estándar establecido. Rápida detección de contaminantes y malos olores.</p>	



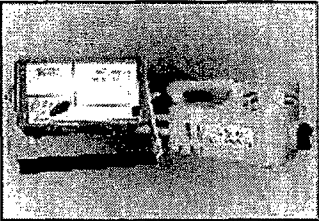
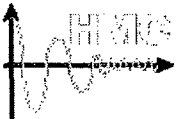
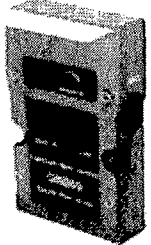

Fabricante y sitio de Internet	Equipo comercial	Tipo de sensor/ sistema de muestreo/ Portabilidad	Aplicaciones	Universidad
<p>AlphaMOS (Francia)</p> <p><a href="http://www.alpha-mos.com/">http://www.alpha-mos.com/</a></p>  <p><b>M . O . S</b> Multi organoleptic system</p>	 <p><b>FOX</b></p>  <p><b>KRONOS</b></p>  <p><b>PROMETHEUS</b></p>	<p>Sistema híbrido MOS, PC, QCM (6, 12 y 18 sensores)</p> <p>Sistema automático de muestreo</p> <p>No portátil</p> <p>EM con detector cuadrupolar</p> <p>Sistema automático de muestreo</p> <p>No portátil</p> <p>EM con detector cuadrupolar + matriz de sensores.</p> <p>Sistema automático de muestreo</p> <p>No portátil</p>	<p>Equipos muy versátiles y con múltiples aplicaciones en la industria agroalimentaria, farmacéutica y química</p> <p>Caracterización de muestras con matriz dominante (alcohol, agua, azufre...) y detección de compuestos específicos como contaminantes o malos olores bien conocidos.</p> <p>Instrumento básicamente destinado a investigación como una plataforma de desarrollo para seleccionar la tecnología correcta para cada aplicación.</p>	


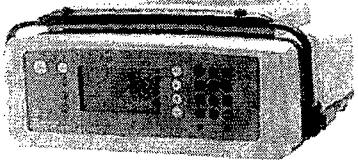
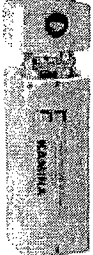

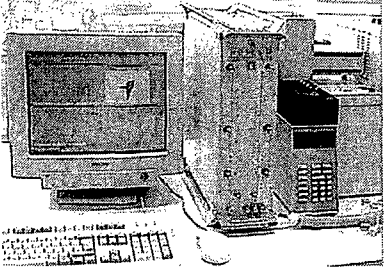
Fabricante y sitio de Internet	Equipo comercial	Tipo de sensor/ sistema de muestreo/ Portabilidad	Aplicaciones	Universidad
<p>Applied Sensor</p> <p><a href="http://www.appliedsensor.com/">http://www.appliedsensor.com/</a></p>  <p>AppliedSensor</p>	 <p><b>VOCcheck</b></p>  <p><b>VOCmeter-VARIO</b></p>  <p><b>At-line 3320</b></p>	<p>4 x QCM</p> <p>Sonda activa de muestreo</p> <p>Portátil (400g)</p> <p>8 x QCM o MOS, individuales y separados (hasta 100m) de la unidad electrónica de control</p> <p>Matriz híbrida 10 MOSFET + 5 MOS</p> <p>Carrusel para sistema automático de muestreo</p> <p>No portátil</p>	<p>Identificación rápida de sustancias volátiles frente al estándar de referencia, de productos químicos y detección de escapes de gases.</p> <p>Control de emisiones, control continuo de procesos para la industria farmacéutica y química.</p> <p>Equipo de laboratorio desarrollado para conocer las necesidades de los usuarios de NE y ser capaces de adaptar la tecnología al medio industrial.</p>	


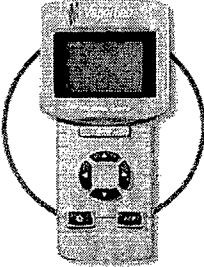
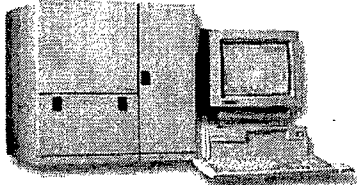

Fabricante y sitio de Internet	Equipo comercial	Tipo de sensor/ sistema de muestreo/ Portabilidad	Aplicaciones	Universidad
<p>Bloodhound Sensors Ltd. (Reino Unido) <a href="http://www.bloodhound.co.uk/bloodhound/">http://www.bloodhound.co.uk/bloodhound/</a></p> 	 <p><b>BH 114</b></p>	<p>14 x CP No portátil</p>	<p>Prototipo para análisis en la industria agroalimentaria.</p>	<p>University of Leeds, UK</p>
<p>Chemsensing INC (USA) <a href="http://www.chemsensing.com/">http://www.chemsensing.com/</a></p> 	 <p><b>SMELL-SEEING</b></p>	<p>Matriz miniaturizada desechable de metaloporfirinas + cámara color digital  Portátil</p>	<p>Diagnósticos médicos, control de calidad en alimentos y bebidas, control de toxinas en el lugar de trabajo.</p>	







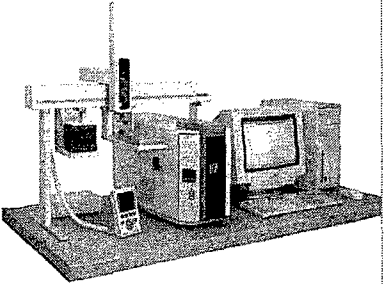
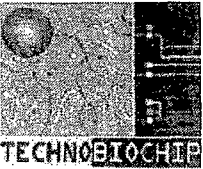
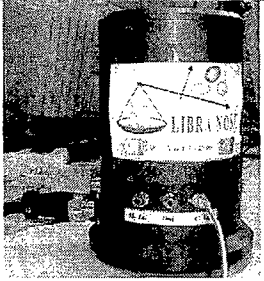
<b>Fabricante y sitio de Internet</b>	<b>Equipo comercial</b>	<b>Tipo de sensor/ sistema de muestreo/ Portabilidad</b>	<b>Aplicaciones</b>	<b>Universidad</b>
<p>Cyrano Sciences Inc. (USA)</p> <p><a href="http://www.cyranosciences.com/">http://www.cyranosciences.com/</a></p> 	 <p><b>CIYRANOSE 320</b></p>	<p>32 x CP</p> <p>Sonda activo de muestreo</p> <p>Portátil</p>	<p>Industria agroalimentaria, cosmética, embalaje, química y medioambiental.</p>	<p>California Institute of Technology, USA</p>
<p>Element Ltd.(Islandia)</p> <p><a href="http://www.element.is/">http://www.element.is/</a></p> 	<p><b>FreshSense</b></p>	<p>MOS</p>	<p>Industria agroalimentaria: detección de la frescura del pescado</p>	<p>Science Institute at the University of Iceland</p>
<p>Environics Industry Oy (Finlandia)</p> <p><a href="http://www.environics.fi/">http://www.environics.fi/</a></p> 	 <p><b>MGD-1</b></p>	<p>Imcell (detector químico)</p> <p>Portátil</p>	<p>Control de calidad de materias primas, en localizaciones donde los gases y olores tienen que ser detectados durante las fabricación de productos o donde suponen un riesgo para la salud.</p>	

Fabricante y sitio de Internet	Equipo comercial	Tipo de sensor/ sistema de muestreo/ Portabilidad	Aplicaciones	Universidad
EEV Chemical Sensor Systems (Reino Unido) <a href="http://www.e2vtechnologies.com/">http://www.e2vtechnologies.com/</a> 	<p style="text-align: center;"><b>e-Nose 5000</b></p>	<p style="text-align: center;">PC, MOS, QCM</p>	Prototipo en desarrollo para aplicaciones en la industria agroalimentaria, en la detección de gases peligrosos, industria del automóvil..	<p style="text-align: center;">University of Warwick, UK</p>
Electronic Sensor Technology Inc. (USA) <a href="http://www.estcal.com/">http://www.estcal.com/</a> 	 <p style="text-align: center;"><b>ZNose-4200.</b></p>	Ultra rápida CG con detector híbrido matriz SAW + QCM .  Sonda activa de muestreo  Portátil	Análisis cuantitativos y cualitativos en tiempo real. Validado por la White House Office of National Drug Control Policy para el control del tráfico de drogas en aeropuertos, vehículos etc...	
HKR-Sensorsysteme GmbH (Dinamarca) <a href="http://hossbach.com/">http://hossbach.com/</a> 	 <p style="text-align: center;"><b>QMS 60</b></p>	<p style="text-align: center;">6 x QCM</p> Sistema automático de muestreo  No portátil	Aplicaciones en análisis químicos en laboratorios y análisis on-line	<p style="text-align: center;">Technical University of Munich, Germany</p>
Illumina (USA) <a href="http://www.illumina.com/">http://www.illumina.com/</a> 		<p style="text-align: center;">Sensores de fibra óptica</p>	<p style="text-align: center;">Detección de gases y volátiles</p>	<p style="text-align: center;">Tufts University, USA</p>

Fabricante y sitio de Internet	Equipo comercial	Tipo de sensor/ sistema de muestreo/ Portabilidad	Aplicaciones	Universidad
<p>INFICON (USA)</p> <p><a href="http://www.inficon.com">http://www.inficon.com</a></p> 	 <p><b>HAPSITE Field-Portable GC/MS</b> On-Site VOC Analysis In Minutes</p>	<p>CG/EM</p> <p>Sistema automático de muestreo</p> <p>Portátil</p>	<p>Especialmente concebido para análisis in situ, permitiendo realizar análisis rápidos sobre el lugar de la emisión o escape de compuestos orgánicos volátiles.<sup>o</sup></p>	
<p>Forschungszentrum Karlsruhe. Technik und Umwelt (Alemania).</p>	 <p><b>KAMINA</b></p>	<p>Micromatriz: de 38 o 16 x MOS</p> <p>Sonda activa de muestreo</p> <p>Portátil</p>	<p>Rápida caracterización de atmósferas, control de procesos y control de calidad.</p>	
<p>Lennartz Electronic GmbH (Dinamarca)</p> <p><a href="http://www.lennartz-electronic.de/">http://www.lennartz-electronic.de/</a></p> 	 <p><b>MOSES II</b></p>	<p>8 x MOS o 8 x QCM</p> <p>Sistema de muestreo automático</p> <p>No portátil</p>	<p>Equipo completamente modular que se puede adaptar a las distintas necesidades del usuario. Muy versátil para múltiples aplicaciones en las industrias químicas y agroalimentaria.</p>	<p>Center for Interface Analytics and Sensors of Tübingen University</p>

<b>Fabricante y sitio de Internet</b>	<b>Equipo comercial</b>	<b>Tipo de sensor/ sistema de muestreo/ Portabilidad</b>	<b>Aplicaciones</b>	<b>Universidad</b>
<p>Microsensor Systems, Inc.(USA) <a href="http://www.microsensorsystem.com">http://www.microsensorsystem.com</a></p> 	 <p><b>VaporLab</b></p>	<p>SAW Portátil</p>	<p>Instrumento para la identificación de especies químicas que permite la monitorización on-line de procesos, productos o medioambientes</p>	
<p>Neotronics Scientific</p>	 <p><b>ENOSE-4000</b></p>	<p>12 x PC Sistema de muestreo automático No portátil</p>	<p>Control de calidad, desarrollo de productos y aplicaciones medioambientales</p>	
<p>OligoSense nv (Bélgica) <a href="http://sch-www.uia.ac.be/struct/oligosense/">http://sch-www.uia.ac.be/struct/oligosense/</a></p> 	<p>Bajo desarrollo</p>	<p>Nuevos sensores de alimentación solar de la empresa belga IMECnology de nombre <u>IMEC-UJA</u></p>	<p>Industria de la alimentación, envases y automóvil</p>	<p>University of Antwerpen (Bélgica)</p>

Fabricante y sitio de Internet	Equipo comercial	Tipo de sensor/ sistema de muestreo/ Portabilidad	Aplicaciones	Universidad
<p>Osmetech plc (Reino Unido)</p> <p><a href="http://www.osmetech.plc.uk/">http://www.osmetech.plc.uk/</a></p> 		<p>48 x CP</p> <p>Equipo de laboratorio no portátil</p>	<p>Fundamentalmente biomédicas para la detección de microorganismos (infecciones del tracto urinario y vaginosis bacteriana). Control de materias primas para productos destinados a la higiene personal, plásticos, etc...</p>	<p>University of Manchester Institute of Science &amp; Technology, UK</p>
<p>RST Rostock Raumfahrt und Umweltschatz GmbH (Dinamarca)</p> <p><a href="http://www.rst-rostock.de/">http://www.rst-rostock.de/</a></p> 	<p><b>SamSystem</b></p>	<p>QCM; SAW; MOS</p>	<p>Mercado aeroespacial. Monitorización del medio, espacial pero también el producido en industrias químicas ..</p>	

Fabricante y sitio de Internet	Equipo comercial	Tipo de sensor/ sistema de muestreo/ Portabilidad	Aplicaciones	Universidad
<p>SMart Nose <a href="http://www.smartnose.com/">http://www.smartnose.com/</a></p> 	 <p><b>Smar Nose-300</b></p>	<p>EM con detector cuadrupolar</p> <p>Sistema automático de muestreo</p> <p>No portátil</p>	<p>Control de calidad y análisis de volátiles así como complemento de los análisis con paneles sensoriales.</p>	
<p>Technobiochip (Italia) <a href="http://www.technobiochip.com">http://www.technobiochip.com</a></p> 	 <p><b>LIBRANOSE</b></p>	<p>8 x QCM</p> <p>Portátil</p>	<p>Industria agroalimentaria, aplicaciones médicas, etc...</p>	<p>Universita di Roma "TorVergata" Dipartimento di Ingegneria Elettronica Sensori e Microsistemi</p>

# **Anejo III:**

## **análisis estadísticos**

---

## 1. Anejo III

### 1.1. Análisis de varianza (F) para las variables de referencia

#### 1.1.1. Decana 99-00

		PF	PSTE	MF	MPTE	CFD1	%elasticidad	SF	Peso	Area jugo	°Brix	meq x 1000	L*c	a*c	b*c	L*v	a*v	b*v
<b>Tiempo de Almacenamiento (6 y 8 meses)</b>	<b>1</b>	6,67	16,99	6,51	11,10	151,42	17,30	7,16	ns	ns	ns	4,53	ns	ns	ns	5,02	7,87	ns
<b>Condición de Almacenamiento (FN, AC 0,7%, AC 2%, AC 5%)</b>	<b>2</b>	4,14	26,91	6,57	22,74	8,92	7,41	13,64	5,16	7,40	ns	ns	ns	7,02	ns	5,10	40,86	ns
<b>Vida en estantería</b>	<b>3</b>	108,96	88,84	119,89	202,28	20,47	53,76	37,32	39,07	69,13	12,60	6,67	ns	3,15	6,92	ns	20,76	4,09
	<b>12</b>	3,12	4,69	6,57	11,19	ns	3,25	3,60	7,49	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	13,52	3,96
	<b>13</b>	ns	3,76	ns	ns	9,98	ns	4,80	ns	35,06	ns	3,27	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<b>Interacciones</b>	<b>23</b>	13,31	10,72	9,82	17,07	ns	2,85	4,89	ns	5,15	ns	ns	2,41	ns	ns	ns	ns	ns
	<b>123</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	5,74	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns



		PF	PPTE	MF	MPTE	CFD2	%elasticidad	SF	Peso	Area jugo	°Brix	meq x 1000	L*c	a*c	b*c	L*v	a*v	b*v
<b>Tiempo de Almacenamiento (6, 8 y 9 meses)</b>	<b>1</b>	ns	ns	ns	ns	50,18	4,73	ns	ns	9,55	ns	ns	ns	ns	ns	8,73	21,66	ns
<b>Condición de Almacenamiento (AC 0.7%, AC2%, AC5%)</b>	<b>2</b>	ns	18,49	ns	15,21	ns	6,43	ns	4,99	4,39	ns	ns	ns	ns	ns	8,06	ns	ns
<b>Vida en estantería</b>	<b>3</b>	165,50	153,22	275,84	380,24	64,67	117,74	78,97	17,33	86,75	5,12	3,21	ns	ns	ns	ns	53,36	3,46
	<b>12</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	2,81	ns	ns	3,87	ns	ns	ns	ns	2,95	2,87
<b>Interacciones</b>	<b>13</b>	ns	2,82	ns	ns	11,39	3,22	4,04	ns	46,00	2,55	ns	ns	ns	ns	ns	4,10	ns
	<b>23</b>	ns	ns	ns	3,56	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	<b>123</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	2,04	2,90	ns

### 1.1.2. Fuji 99-00

		PF	PPTE	MF	MPTE	CFD1	% elasticidad	SF	Peso	Area jugo	°Brix	meq x 1000	L*c	a*c	b*c	L*v	a*v	b*v
<b>Tiempo de almacenamiento (3 y 5 meses)</b>	<b>1</b>	ns	ns	ns	ns	32,04	ns	ns	43,47	123,96	ns	37,01	ns	ns	10,00	ns	ns	14,96
<b>Fecha de recolección</b>	<b>2</b>	ns	ns	7,06	ns	11,35	4,22	ns	6,87	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	9,99
<b>Condición de almacenamiento (FN, ACS, ULO1 ULO 2)</b>	<b>3</b>	3,98	10,85	19,66	10,17	3,31	12,90	16,48	2,80	5,01	8,46	25,52	3,62	7,05	ns	ns	ns	ns

		PF	PPTE	MF	MPTE	CFD1	% elasticidad	SF	Peso	Area jugo	°Brix	meq x 1000	L*c	a*c	b*c	L*v	a*v	b*v
<b>Vida en estantería</b>	<b>4</b>	6,64	50,27	12,79	10,01	7,85	64,21	8,43	97,96	46,69	6,60	ns	ns	ns	7,91	ns	ns	7,48
	<b>12</b>	ns	5,32	6,24	ns	ns	ns	ns	6,19	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	<b>13</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	2,89	2,98	10,54	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	<b>23</b>	ns	5,94	ns	3,01	3,54	ns	ns	2,98	2,60	ns	ns	3,13	ns	ns	ns	ns	ns
	<b>14</b>	ns	7,64	ns	ns	4,48	ns	3,71	8,98	6,96	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	<b>24</b>	ns	ns	ns	ns	32,98	ns	ns	ns	8,77	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<b>Interacciones</b>	<b>34</b>	ns	ns	3,10	2,28	3,86	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	3,38	ns	ns
	<b>123</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	5,65	ns	6,93	5,76	ns	ns	3,91	3,87	5,11	2,65
	<b>124</b>	4,20	ns	ns	ns	36,67	ns	ns	ns	10,11	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	<b>134</b>	ns	ns	2,24	ns	3,19	ns	ns	ns	2,29	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	<b>234</b>	ns	ns	ns	ns	3,32	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	<b>1234</b>	2,72	ns	ns	ns	2,24	ns	ns	ns	2,27	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

		PF	PPTE	MF	MPTE	CFD1	%elasticidad	SF	Peso	Area jugo	°Brix	meq x 1000	L*c	a*c	b*c	L*v	a*v	b*v
<b>Tiempo de Almacenamiento (3, 5 y 7 meses)</b>	<b>1</b>	10,68	6,34	8,49	ns	81,96	ns	ns	11,30	118,02	ns	13,38	ns	ns	4,26	ns	ns	8,79
	<b>Fecha de recolección</b>	<b>2</b>	ns	ns	ns	5,19	4,89	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

		PF	PPTE	MF	MPTE	CFD1	%elasticidad	SF	Peso	Area jugo	°Brix	meq x 1000	L*c	a*c	b*c	L*v	a*v	b*v
<b>Condición almacenamiento (FN, ACS, ULO2)</b>	<b>3</b>	4,59	13,92	15,66	11,39	4,04	10,58	11,42	ns	11,56	ns	64,24	ns	8,19	ns	ns	ns	ns
<b>Vida en estantería</b>	<b>4</b>	ns	37,34	ns	5,23	15,67	24,11	ns	ns	26,28	ns	Ns	5,40	ns	14,17	ns	ns	10,62
	<b>12</b>	ns	3,79	ns	ns	6,57	ns	ns	ns	5,88	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	<b>13</b>	ns	ns	ns	ns	3,50	ns	ns	ns	ns	2,96	12,44	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	<b>23</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	Ns	5,99	3,46	ns	ns	ns	ns
	<b>14</b>	5,99	ns	ns	ns	4,35	ns	3,19	4,27	5,20	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	<b>24</b>	ns	ns	ns	ns	8,88	ns	ns	ns	9,53	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<b>Interacciones</b>	<b>34</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	<b>123</b>	ns	2,62	ns	ns	ns	ns	ns	4,95	ns	3,48	3,22	ns	ns	ns	3,31	4,09	ns
	<b>124</b>	3,72	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	9,35	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	<b>134</b>	ns	ns	3,45	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	<b>234</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	4,24	ns	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	<b>1234</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	2,74	ns	ns	ns	ns	ns	ns	2,92	ns

### 1.1.3. Fuji 00-01

<b>Variables:</b>		<b>PPTE</b>	<b>MPTE</b>	<b>CFD1</b>	<b>%elasticidad</b>	<b>SF</b>	<b>Peso</b>	<b>Area jugo</b>	<b>°Brix meq x 100</b>	<b>L*c</b>	<b>a*c</b>	<b>b*c</b>	<b>a*v</b>	<b>b*v</b>	
<b>Tiempo almacenamiento</b>	<b>1</b>	26,57	17,34	6,95	ns	ns	3,86	ns	3,26	59,57	ns	ns	4,42	ns	ns
<b>Fecha de recolección</b>	<b>2</b>	5,70	ns	ns	ns	ns	6,99	6,01	ns	ns	34,45	ns	7,56	ns	ns
<b>Condición de almacenamiento</b>	<b>3</b>	12,36	16,55	8,16	ns	13,83	ns	ns	4,96	85,35	3,55	2,72	5,34	ns	ns
<b>Vida en estantería</b>	<b>4</b>	142,89	112,25	ns	21,42	8,01	54,88	46,64	7,36	16,95	ns	3,69	12,25	11,56	22,82
	<b>12</b>	ns	ns	ns	ns	ns	5,21	ns	ns	ns	ns	ns	4,56	ns	ns
	<b>13</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	6,47	ns	ns	ns	ns	2,83
	<b>23</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	4,61	5,48	6,62	3,73	ns	ns
	<b>14</b>	ns	ns	4,82	4,99	ns	ns	4,99	2,41	4,99	ns	ns	ns	ns	3,12
	<b>24</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<b>Interacciones</b>	<b>34</b>	ns	ns	ns	2,16	2,42	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	<b>123</b>	2,50	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	2,52	2,47	2,93	ns	ns
	<b>124</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	3,29	ns	ns	3,08	ns	ns
	<b>134</b>	ns	ns	2,70	ns	ns	ns	ns	ns	2,02	ns	ns	ns	ns	ns
	<b>234</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	<b>1234</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

## 1.2. Análisis de varianza (F) para las variables cromatográficas

### 1.2.1. Decana 99-00

		AcetatoButilo	1-butanol	Acetato Pentilo	Acetato Hexilo	CO <sub>2</sub>	Etileno
<b>Tiempo</b>							
<b>Almacenamiento</b>	<b>1</b>	ns	4,86	ns	ns	14,59	ns
<b>(6, 8 y 9 meses)</b>							
<b>Condición</b>							
<b>Almacenamiento</b>	<b>2</b>	53,85	14,12	14,12	87,12	12,07	ns
<b>(AC 0,7%, AC 2%, AC 5%)</b>							
<b>Interacciones</b>	<b>12</b>	13,32	3,41	3,79	25,18	ns	ns
<b>Tiempo</b>							
<b>Almacenamiento</b>	<b>1</b>	ns	ns	ns	ns	11,70	ns
<b>(6 y 8 meses)</b>							
<b>Condición</b>							
<b>Almacenamiento</b>	<b>2</b>	11,26	5,71	7,93	20,44	7,30	ns
<b>(FN, AC 0,7%, AC 2%, AC 5%)</b>							
<b>Interacciones</b>	<b>12</b>	ns	ns	ns	ns	3,93	ns
<b>Condición</b>							
<b>Almacenamiento</b>	<b>1</b>	15,29	8,61	11,69	13,40	4,98	3,88
<b>(AC 0,7%, AC 2%, AC 5%)</b>							
<b>Vida en estantería</b>	<b>2</b>	ns	ns	4,84	ns	ns	14,23
<b>Interacciones</b>	<b>12</b>	ns	ns	ns	ns	ns	6,41
<b>Condición</b>							
<b>Almacenamiento</b>	<b>1</b>	ns	ns	ns	11,60	ns	6,88
<b>(FN, AC 0,7%, AC 2%, AC 5%)</b>							
<b>Vida en estantería</b>	<b>2</b>	ns	ns	ns	ns	ns	12,73
<b>Interacciones</b>	<b>12</b>	ns	ns	ns	ns	ns	5,99

### 1.2.2. Fuji 99-00

		etanol	1propanol	butanoato etilo	2metilbu tanoato etilo	acetato butilo	acetato 2metilbu tilo	acetato pentilo	2metil 1butanol	acetato hexilo	Butanoa to hexilo	etanol etileno	CO <sub>2</sub>	
<b>Tiempo almacena 5 y 7mes</b>	<b>1</b>	4,73	13,09	9,80	51,32	7,65	5,79	ns	5,28	ns	ns	9,01	5,22	21,00
<b>Condición almacena (FN, ACS, ULO2)</b>	<b>2</b>	ns	5,12	21,20	9,03	144,64	ns	17,45	ns	15,35	17,88	ns	18,16	4,85
<b>Vida estantería</b>	<b>3</b>	ns	48,00	8,26	ns	9,41	ns	5,84	ns	10,59	3,87	ns	ns	ns
	<b>12</b>	ns	3,51	4,27	5,23	6,99	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<b>Interaccio nes</b>	<b>13</b>	ns	6,93	3,74	9,44	3,58	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	<b>23</b>	ns	3,38	5,51	5,41	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	<b>123</b>	ns	3,06	ns	4,54	4,79	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

		etanol	1propanol	butanoato etilo	2metilbu tanoato etilo	acetato butilo	acetato 2metilbu tilo	acetato pentilo	2metil 1butanol	acetato hexilo	Butanoa to hexilo	etanol etileno	CO <sub>2</sub>	
<b>Tiempo almacena 5 meses</b>	<b>1</b>	30,58	7,32	18,85	ns	8,16	ns	ns	ns	5,43	ns	ns	8,48	26,66

		etanol	1propanol	butanoato etilo	2metilbu tanoato etilo	acetato butilo	acetato 2metilbu tilo	acetato pentilo	2metil 1butanol	acetato hexilo	Butanoa to hexilo	etanol	etileno	CO <sub>2</sub>
<b>Condición almacena FN, ACS, ULO1ULO2</b>	<b>2</b>	4,42	72,29	53,08	4,91	55,19	30,17	7,21	ns	11,15	10,68	ns	10,93	3,52
<b>Vida estantería</b>	<b>3</b>	7,19	109,01	9,34	ns	5,76	10,65	10,10	ns	22,05	4,41	ns	ns	ns
	<b>12</b>	2,80	ns	11,35	ns	6,15	ns	ns	ns	ns	ns	ns	3,12	ns
<b>Interaccio nes</b>	<b>13</b>	5,00	4,62	ns	16,51	5,33	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	<b>23</b>	1,59	32,42	7,97	2,75	ns	4,41	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	<b>123</b>	1,26	2,84	2,88	2,56	3,98	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

<b>1-Tiempo almacenamiento (5 y 7 meses)</b>			<b>1-Tiempo almacenamiento (5 meses)</b>		
<b>2-Fecha recolección,</b>			<b>2-Fecha recolección,</b>		
<b>3- Condición almacenamiento (FN, ACS, ULO2)</b>			<b>3- Condición almacenamiento (FN, ACS, ULO1, ULO2)</b>		
	<b>etileno</b>	<b>CO<sub>2</sub></b>		<b>etileno</b>	<b>CO<sub>2</sub></b>
<b>1</b>	35,79	58,00	<b>1</b>	77,55	77,75
<b>2</b>	19,88	24,83	<b>2</b>	26,33	27,26
<b>3</b>	124,51	13,41	<b>3</b>	99,91	10,28
<b>12</b>	23,46	15,12	<b>12</b>	40,72	25,49
<b>13</b>	16,88	ns	<b>13</b>	28,50	ns
<b>23</b>	8,02	ns	<b>23</b>	15,83	ns
<b>123</b>	20,86	ns	<b>123</b>	28,80	ns

### 1.2.3. Fuji 00-01

<b>1-Tiempo de almacenamiento 2- Condición de almacenamiento 3-Vida en estantería</b>					
	<b>Acetato de metilo</b>	<b>etanol</b>	<b>1propanol</b>	<b>Butanoato etilo</b>	<b>2-metilbutanoato de etilo</b>
<b>1</b>	66,21	6,32	4,44	19,93	ns
<b>2</b>	ns	ns	45,27	3,60	ns
<b>3</b>	ns	ns	113,82	4,82	6,58
<b>12</b>	ns	ns	20,59	ns	ns
<b>13</b>	2,84	3,45	16,85	ns	ns
<b>23</b>	ns	ns	17,59	ns	ns
<b>123</b>	ns	ns	13,46	ns	ns

	<b>Acetato de butilo</b>	<b>Acetato de 2-metilbutilo</b>	<b>1-butanol</b>	<b>2-metil-1-butanol</b>	<b>2-metilbutanoato de butilo</b>
<b>1</b>	ns	4,99	4,79	28,10	11,64
<b>2</b>	69,56	11,27	136,60	18,02	161,07
<b>3</b>	27,64	7,31	8,84	34,56	19,37
<b>12</b>	ns	3,17	3,77	3,94	6,47
<b>13</b>	ns	3,29	ns	11,75	3,55
<b>23</b>	3,98	3,85	ns	8,06	7,59
<b>123</b>	ns	ns	ns	3,17	2,06

	<b>Acetato de hexilo</b>	<b>1-hexanol</b>	<b>Hexanoato de butilo</b>	<b>2-metilbutanoato de hexilo</b>	<b>2-heptanol</b>
<b>1</b>	ns	31,65	ns	15,28	11,25
<b>2</b>	33,40	120,77	36,35	88,71	ns
<b>3</b>	70,93	53,68	ns	13,09	ns
<b>12</b>	ns	15,68	ns	6,80	ns
<b>13</b>	ns	4,23	ns	5,76	2,69
<b>23</b>	2,91	3,79	ns	6,76	ns
<b>123</b>	ns	2,59	ns	2,08	ns

	<b>farneseno</b>	<b>limoneno</b>
<b>1</b>	22,51	ns
<b>2</b>	8,87	ns
<b>3</b>	3,26	ns
<b>12</b>	ns	ns
<b>13</b>	ns	ns
<b>23</b>	ns	ns
<b>123</b>	ns	ns



<b>1-Tiempo almacenamiento</b>			<b>1-Tiempo almacenamiento</b>		
<b>2- Condición de almacenamiento</b>			<b>2-Fecha de recolección</b>		
<b>3- Vida en estantería</b>			<b>3- Condición de almacenamiento</b>		
	<b>CO<sub>2</sub></b>	<b>etileno</b>		<b>CO<sub>2</sub></b>	<b>etileno</b>
<b>1</b>	ns	4,42	<b>1</b>	ns	9,39
<b>2</b>	25,36	25,00	<b>2</b>	ns	14,43
<b>3</b>	ns	ns	<b>3</b>	32,45	53,10
<b>12</b>	ns	3,32	<b>12</b>	ns	6,03
<b>13</b>	ns	ns	<b>13</b>	ns	7,04
<b>23</b>	ns	ns	<b>23</b>	ns	6,17
<b>123</b>	ns	ns	<b>123</b>	ns	2,94

### 1.3.Análisis de varianza (F) para las variables de la nariz electrónica

#### 1.3.1. Decana 99-00

<b>1-Tiempo de almacenamiento (6 y 8 meses)</b>							
<b>2- Condición de almacenamiento (FN, AC0,7%, AC2%, AC5%)</b>							
<b>3-Vida en estantería</b>							
	<b>S1</b>	<b>S3</b>	<b>S4</b>	<b>S5</b>	<b>S6</b>	<b>S7</b>	<b>S8</b>
<b>1</b>	12880,10	139,97	44,58	1142,29	6253,07	651,39	11764,74
<b>2</b>	13,85	8,12	ns	13,30	3,62	20,69	ns
<b>3</b>	14,77	4,12	3,25	12,22	7,01	21,49	5,00
<b>12</b>	6,29	3,72	ns	6,44	ns	11,69	ns
<b>13</b>	11,84	ns	4,63	4,69	2,54	8,24	ns
<b>23</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<b>123</b>	3,47	ns	ns	2,08	ns	ns	ns

<b>1-Tiempo de almacenamiento (6, 8 y 9 meses)</b>							
<b>2- Condición de almacenamiento ( AC0,7%, AC2%, AC5%)</b>							
<b>3-Vida en estantería</b>							
	<b>S1</b>	<b>S3</b>	<b>S4</b>	<b>S5</b>	<b>S6</b>	<b>S7</b>	<b>S8</b>
<b>1</b>	8319,18	100,42	32,97	992,09	4709,39	352,62	7370,45
<b>2</b>	23,86	8,84	ns	24,59	6,59	31,38	2,56
<b>3</b>	198,67	55,75	10,59	27,88	112,65	26,50	119,40
<b>12</b>	6,97	ns	ns	5,71	ns	7,02	ns
<b>13</b>	230,54	25,60	6,57	44,93	137,34	36,38	158,89
<b>23</b>	2,50	ns	ns	ns	ns	ns	ns

<b>1-Tiempo de almacenamiento (6, 8 y 9 meses)</b>							
<b>2- Condición de almacenamiento ( AC0,7%, AC2%, AC5%)</b>							
<b>3-Vida en estantería</b>							
	<b>S1</b>	<b>S3</b>	<b>S4</b>	<b>S5</b>	<b>S6</b>	<b>S7</b>	<b>S8</b>
<b>123</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

### 1.3.2. Fuji 99-00

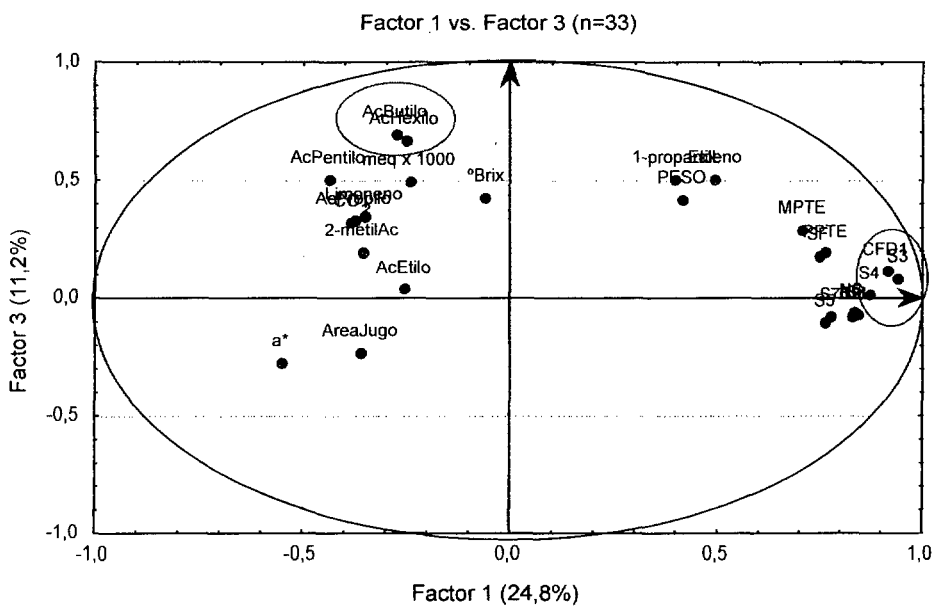
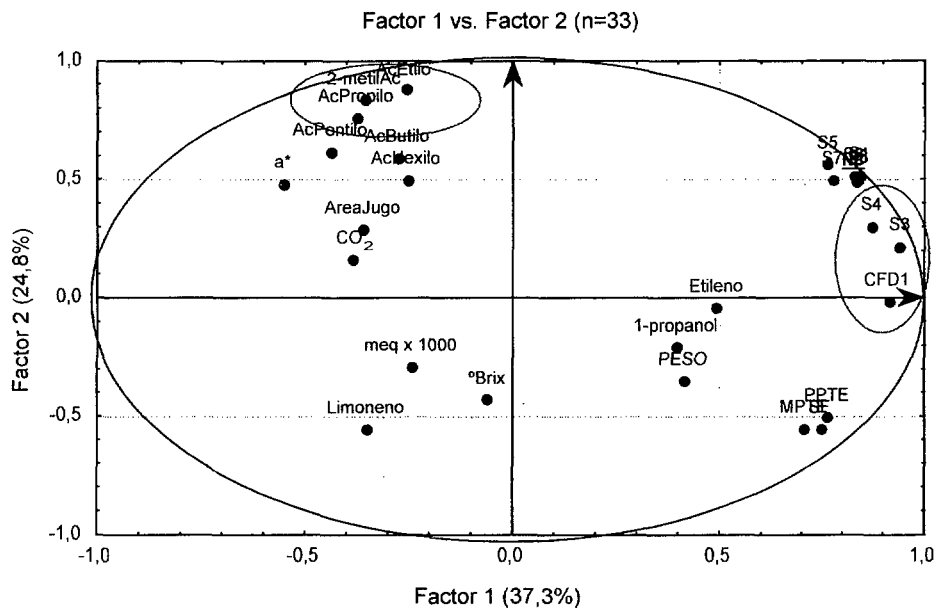
<b>1-Tiempo de almacenamiento</b>							
<b>2-Fecha de recolección</b>							
<b>3- Condición de almacenamiento (FN,ACS,ULO2)</b>							
<b>4-Vida en estantería</b>							
	<b>S1</b>	<b>S3</b>	<b>S4</b>	<b>S5</b>	<b>S6</b>	<b>S7</b>	<b>S8</b>
<b>1</b>	10,22	33,80	1506,88	1678,65	84,50	80,80	69,05
<b>2</b>	ns	15,43	39,10	32,20	88,98	15,81	96,30
<b>3</b>		ns	45,56	5,26	ns	7,67	ns
<b>4</b>	3,11	27,25	22,61	ns	34,84	19,21	29,28
<b>12</b>	29,23	ns	120,29	ns	109,10	14,62	103,31
<b>13</b>	ns	ns	8,93	ns	ns	ns	ns
<b>23</b>	4,28	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<b>14</b>	84,73	115,58	591,25	191,86	599,35	157,28	583,53
<b>24</b>	19,85	23,99	126,62	20,36	86,12	22,05	87,43
<b>34</b>	ns	ns	ns	4,91	3,62	6,34	ns
<b>123</b>	6,46	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<b>124</b>	6,50	48,95	79,37	60,98	76,67	31,00	84,06
<b>134</b>	ns	ns	6,11	ns	ns	ns	ns
<b>234</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<b>1234</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

### 1.3.3. Fuji 00-01

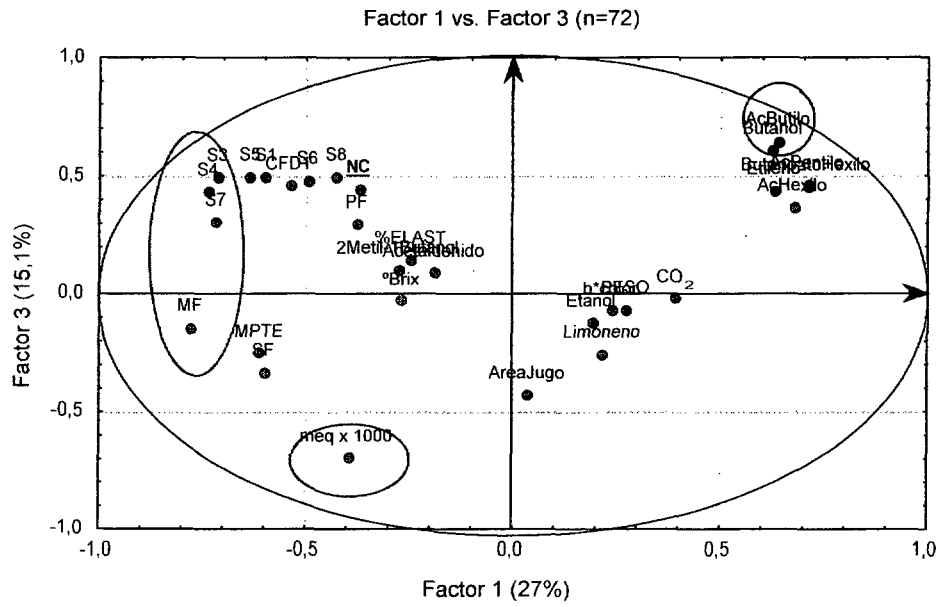
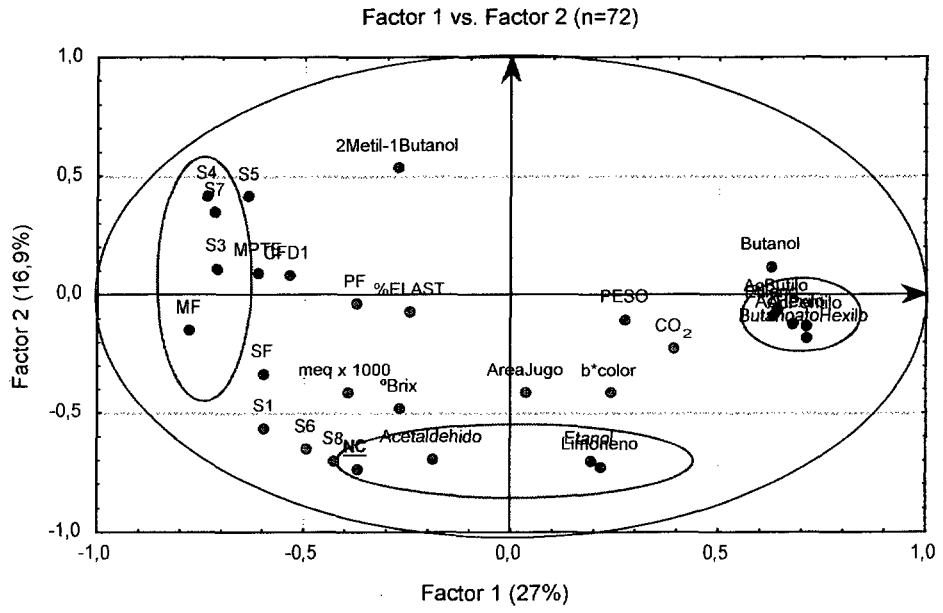
	<b>S7</b>	<b>S2</b>	<b>S3</b>	<b>S4</b>	<b>S5A</b>	<b>S5B</b>	<b>S1</b>	<b>S8</b>
<b>1-Tiempo de almacenamiento</b>								
<b>2-Fecha de recolección</b>								
<b>3- Condición de almacenamiento</b>								
<b>4-Vida en estantería</b>								
<b>1</b>	85,09	ns	51,84	60,18	40,05	40,25	415,09	312,19
<b>2</b>	7,68	33,95	4,40	69,22	150,59	48,72	ns	26,98
<b>3</b>	ns	ns	ns	12,11	ns	7,68	5,30	4,33
<b>4</b>	38,68	33,79	42,60	245,88	29,23	216,58	161,61	205,23
<b>12</b>	12,16	ns	20,01	58,16	37,31	46,39	8,44	43,44
<b>13</b>	ns	ns	2,38	4,18	2,15	2,76	ns	ns
<b>23</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<b>14</b>	25,31	35,79	71,59	57,06	86,85	36,27	38,32	46,54
<b>24</b>	ns	22,38	9,73	17,85	17,21	6,29	ns	ns
<b>34</b>	2,78	ns	ns	3,46	2,34	2,92	3,37	4,92
<b>123</b>	ns	3,49	ns	5,54	3,85	4,81	ns	3,81
<b>124</b>	ns	12,83	9,88	6,87	8,41	5,97	6,04	9,13
<b>134</b>	ns	ns	ns	2,65	2,25	2,03	3,85	3,61
<b>234</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<b>1234</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

### 1.4. Análisis de componentes principales completo de todos los datos: sensores de nariz electrónica y variables de referencia

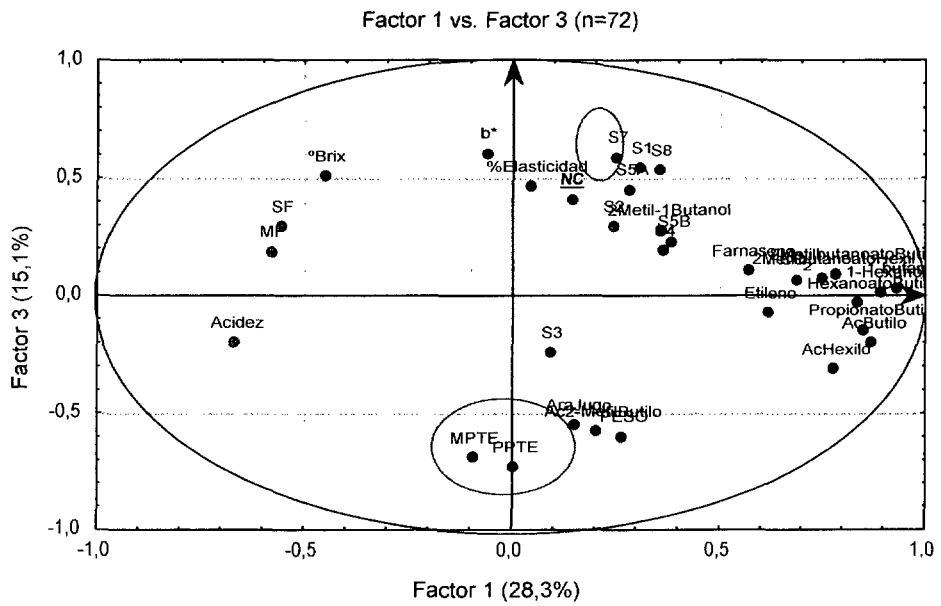
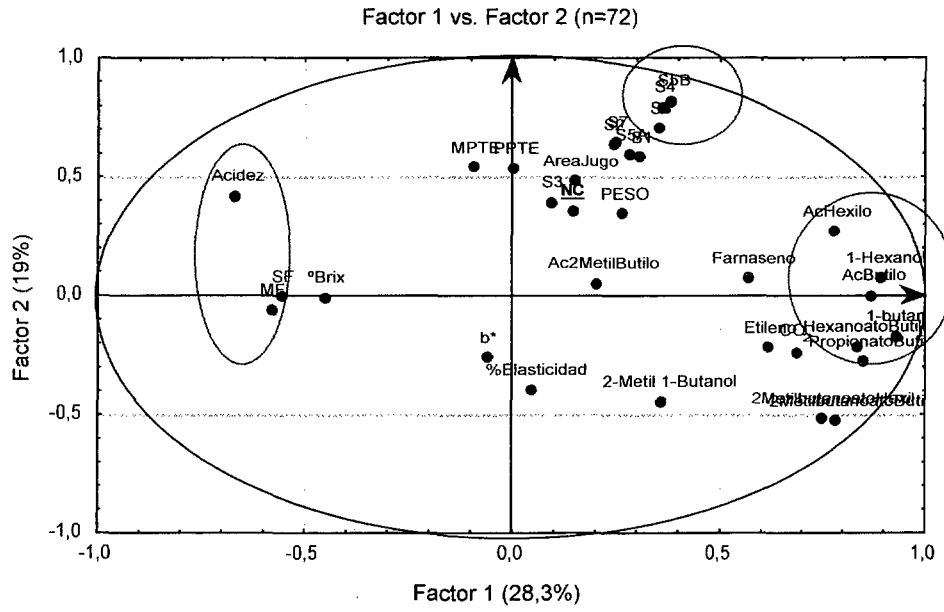
#### 1.4.1. Decana 99-00



**1.4.2. Fuji 99-00**



### 1.4.3. Fuji 00-01



### 1.5.Comparativa (medias) entre las campañas 99-00 y 00-01 de manzana Fuji

	PF (N)		PSTE N/mm		MF (N)		MPTE N/mm		CFD1 N/mm		SF (N)	
	00-01	99-00	00-01	99-00	00-01	99-00	00-01	99-00	00-01	99-00	00-01	99-00
<b>3ºmes FN</b>	3,0	3,0	4,8	5,1	37,0	30,8	12,4	11,4	45,1	30,9	52,8	51,9
<b>3ºmes ACS</b>	3,1	3,0	5,1	5,3	37,1	36,1	13,2	12,7	45,5	32,8	55,5	56,9
<b>3ºmesULO1</b>	3,2	3,0	4,8	4,9	40,7	37,4	13,8	12,4	50,5	34,1	61,9	62,9
<b>3ºmesULO2</b>	3,2	3,2	5,3	5,3	39,0	37,9	14,0	12,4	47,1	34,3	60,7	61,0
<b>5ºmes FN</b>	3,0	2,8	4,4	4,7	33,2	30,5	11,9	11,1	46,5	35,6	55,6	53,1
<b>5ºmes ACS</b>	3,3	3,0	5,0	5,5	33,4	33,5	14,1	12,4	43,5	36,8	57,8	54,3
<b>5ºmesULO1</b>	3,2	3,0	4,8	5,0	40,4	37,1	14,0	12,7	49,2	37,9	60,9	59,0
<b>5ºmesULO2</b>	3,2	3,1	4,9	5,3	37,1	36,0	13,5	12,7	45,6	37,3	57,6	59,5
<b>7ºmes FN</b>	3,3	3,3	4,2	4,7	36,8	33,3	11,4	11,4	45,1	44,5	55,4	49,9
<b>7ºmes ACS</b>	3,4	3,1	4,5	4,9	36,2	33,9	12,4	12,0	40,8	41,6	53,1	54,2
<b>7ºmesULO1</b>	3,3		4,3		39,3		12,2		45,8		61,0	
<b>7ºmesULO2</b>	3,2	3,2	4,6	5,0	39,7	39,2	13,0	12,9	43,3	46,5	58,1	59,3

	PESO (g)		Area Jugo		Azúcares		Acidez		L*c		b*v	
	00-01	99-00	cm <sup>2</sup>		°Brix		meq x1000					
	00-01	99-00	00-01	99-00	00-01	99-00	00-01	99-00	00-01	99-00	00-01	99-00
<b>3ºmes FN</b>	251,2	265,0	6,2	9,6	17,2	15,9	46,7	34,6	53,8	53,1	36,7	32,9
<b>3ºmes ACS</b>	255,2	261,1	6,2	10,1	17,7	16,3	54,3	35,7	54,3	51,0	37,6	33,7
<b>3ºmesULO1</b>	249,4	241,8	5,9	9,5	18,4	17,5	61,5	39,6	51,7	52,2	35,7	34,4
<b>3ºmesULO2</b>	262,4	246,1	6,4	10,2	18,0	17,0	56,8	37,6	51,2	49,5	37,0	34,1
<b>5ºmes FN</b>	248,5	276,0	6,2	6,6	17,4	16,1	35,6	32,1	52,7	55,8	38,8	36,6
<b>5ºmes ACS</b>	234,9	286,9	6,1	8,0	17,9	16,9	47,0	43,9	52,1	52,2	37,7	37,6
<b>5ºmesULO1</b>	234,8	280,1	6,0	8,1	18,0	16,8	54,9	44,7	49,3	52,6	37,2	36,8
<b>5ºmesULO2</b>	243,1	275,9	6,4	7,8	17,8	16,7	54,4	47,0	51,8	50,5	37,6	36,2

	PESO (g)		Area Jugo		Azúcares		Acidez		L*c		b*v	
	00-01	99-00	cm <sup>2</sup>		°Brix		meq x1000		00-01	99-00	00-01	99-00
			00-01	99-00	00-01	99-00	00-01	99-00				
<b>7°mes FN</b>	246,3	273,2	5,7	5,8	18,3	16,8	29,8	19,8	52,8	50,2	39,6	35,5
<b>7°mes ACS</b>	256,1	267,4	5,9	6,8	17,6	16,5	32,5	36,3	51,2	50,0	35,1	35,7
<b>7°mesULO1</b>	246,4		5,8		18,6		54,6		51,5		38,6	
<b>7°mesULO2</b>	239,4	281,7	6,2	6,9	18,2	16,4	50,6	43,0	49,7	52,0	36,9	35,0

	CO <sub>2</sub>		Etileno		Acetato Metilo		Etanol	
	ml/kg-h		μl/kg-h		μg/kg <sub>fruta</sub>		μg/kg <sub>fruta</sub>	
	00-01	99-00	00-01	99-00	00-01	99-00	00-01	99-00
<b>3°mes FN</b>	16,89	11,39	9,77	13,18	64,58	0,89	30,19	6,36
<b>3°mes ACS</b>	23,90	9,08	13,29	3,14	60,96	1,08	31,57	15,42
<b>3°mesULO1</b>	15,37	6,29	7,63	0,42	49,73	1,77	65,84	12,99
<b>3°mesULO2</b>	13,21	4,53	7,24	0,60	62,04	1,71	61,56	13,18
<b>5°mes FN</b>	22,00	20,35	3,29	45,11	52,93	1,92	22,81	3,54
<b>5°mes ACS</b>	25,05	17,66	13,64	9,49	66,30	1,73	20,44	3,13
<b>5°mesULO1</b>	11,37	12,30	1,70	4,01	81,24	1,98	39,51	7,66
<b>5°mesULO2</b>	10,64	15,11	1,67	4,16	70,69	1,91	32,24	7,07
<b>7°mes FN</b>	21,19	10,29	8,36	23,33	6,93	1,30	10,85	6,04
<b>7°mes ACS</b>	30,36	8,03	23,21	10,00	6,61	1,36	12,95	12,41
<b>7°mesULO1</b>	11,47		1,39		5,87		14,58	
<b>7°mesULO2</b>	16,97	6,83	0,58	3,02	6,01	1,22	13,48	2,70

	1-propanol		Butanoato etilo		Acetato butilo		Acetato hexilo	
	μg/kg <sub>fruta</sub>		μg/kg <sub>fruta</sub>		μg/kg <sub>fruta</sub>		μg/kg <sub>fruta</sub>	
	00-01	99-00	00-01	99-00	00-01	99-00	00-01	99-00
<b>3°mes FN</b>	52,66	1,91	84,62	7,46	102,34	17,79	92,56	34,73
<b>3°mes ACS</b>	18,88	4,48	86,52	1,45	243,80	9,32	156,62	24,51
<b>3°mesULO1</b>	10,97	16,77	64,07	1,66	54,60	8,21	74,83	24,77
<b>3°mesULO2</b>	12,76	3,72	87,77	0,64	39,49	4,49	54,68	16,66



$\mu\text{g}/\text{kg}_{\text{fruta}}$	1-propanol		Butanoato etilo		Acetato butilo		Acetato hexilo	
	00-01	99-00	00-01	99-00	00-01	99-00	00-01	99-00
<b>5°mes FN</b>	31,10	1,90	57,64	18,86	134,07	29,17	111,22	54,77
<b>5°mes ACS</b>	30,76	3,96	64,77	3,25	258,54	10,52	159,79	30,66
<b>5°mesULO1</b>	13,20	11,95	54,35	1,83	39,88	7,89	70,20	25,63
<b>5°mesULO2</b>	13,16	1,70	41,06	1,05	23,22	4,91	41,58	20,67
<b>7°mes FN</b>	17,50	1,36	52,72	42,53	138,85	31,97	125,63	54,83
<b>7°mes ACS</b>	23,45	0,84	62,33	11,29	208,82	8,61	165,30	18,30
<b>7°mesULO1</b>	25,48		42,80		35,20		51,45	
<b>7°mesULO2</b>	7,99	1,34	34,07	1,69	13,03	5,00	21,58	17,97