

Tesis Doctoral

Metabolómica Aplicada al Estudio del Aroma y Sabor del Fruto del Tomate

Pablo R. Cortina

2015

**Instituto de Investigaciones en Fisicoquímica
de Córdoba**

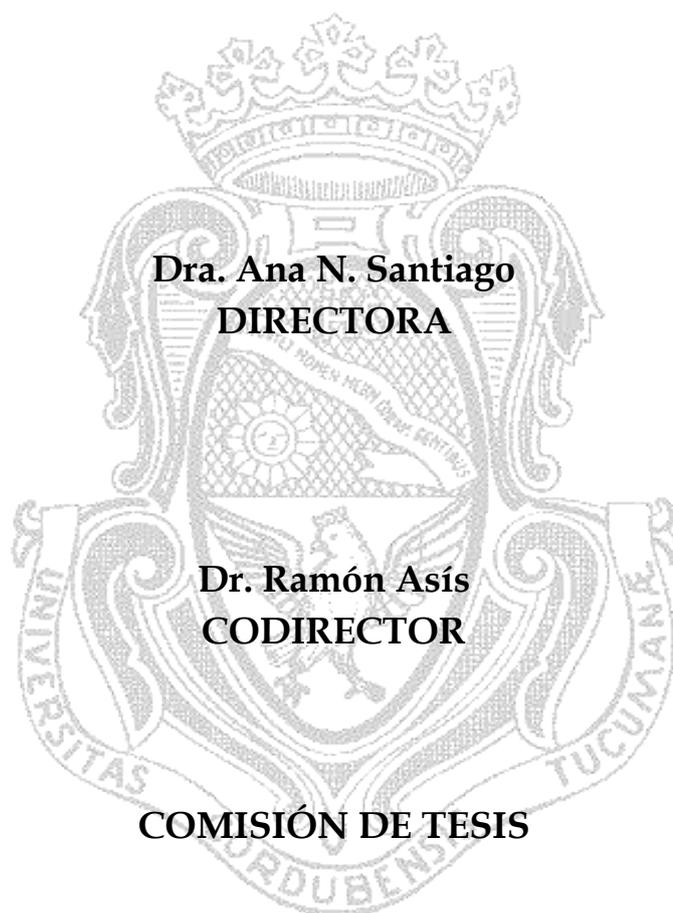
Departamento de Química Orgánica
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba



Universidad Nacional de Córdoba

2015

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
EN CIENCIAS QUIMICAS**



**Dra. Ana N. Santiago
DIRECTORA**

**Dr. Ramón Asís
CODIRECTOR**

COMISIÓN DE TESIS

Dra. María Elena Álvarez

Dra. Alicia V. Veglia

EVALUADOR EXTERNO

Dra. María Fernanda Silva

Resumen

El olor y el sabor del tomate (*Solanum lycopersicum*) están influenciados por diferentes compuestos naturales presentes en el fruto. Entre los responsables de producir estas características sensoriales se encuentran los azúcares, ácidos orgánicos y los compuestos orgánicos volátiles (COVs). Muchas investigaciones se han centrado sobre los dos primeros grupos de compuestos con resultados exitosos, mientras que para los compuestos volátiles la complejidad de su propia naturaleza presenta un enorme desafío en la búsqueda de esclarecer su aporte en el olor y sabor del tomate.

La presente tesis doctoral está focalizada en el estudio de 101 metabolitos volátiles encontrados en frutos de 20 variedades de tomate y su relación sobre la influencia en el desarrollo del olor y sabor característico. Las variedades de tomate estudiadas corresponden en su mayoría a genotipos de tipo *criollo*, originarias de la región noroeste de la Argentina, con características sensoriales y metabólicas diferentes a los frutos cultivados a gran escala de la actualidad. Se debe destacar que las variedades *criollas* de tomate no han sido anteriormente caracterizadas mediante perfiles metabólicos de compuestos orgánicos volátiles.

También fue realizado un análisis sensorial de los frutos que conjuntamente con el estudio de los metabolitos volátiles permitió discriminar las variedades de tomate más aceptadas sensorialmente y describir los compuestos químicos contenidos en los frutos de los cultivares de mayor interés. Así mismo, utilizando una novedosa técnica de análisis multivariado como el Análisis por Redes Neuronales Artificiales (ARNeu), fue posible determinar una serie de metabolitos volátiles y señales sin identificar estrechamente correlacionados con el olor y sabor del fruto del tomate. Los compuestos químicos asociados a las variables sensoriales de mayor importancia para este estudio contuvieron a los conocidos compuestos *volátiles de impacto* y 16 metabolitos que hasta el momento no han sido relacionados como potenciales contribuyentes al olor y sabor del fruto. En forma original los metabolitos 2-etil-1-hexanol, *p*-ment-1-en-9-al, DMHEX: 3,6-dimetil-2, 3, 3a, 4, 5, 7a-hexahidrobenzofurano, alcanfor, terpinoleno, 2-metilacetofenona, 1-fenil-1-propanol, óxido geránico, 2-dodecanona, decanal, *p*-metoxitolueno, 3-metilheptil acetato, benzofenona, β -metil ionona, salicilato de propilo y salicilato de isoamilo comprenden los nuevos compuestos orgánicos volátiles ligados al olor y sabor del fruto del tomate como resultado de las investigaciones abordadas en esta tesis.

Es importante mencionar que fue posible determinar, mediante diferentes análisis de correlación sobre el olor y sabor del fruto del tomate, la influencia de grupos de metabolitos volátiles, discriminados según su origen metabólico y los grupos funcionales presentes en su estructura.

Debe destacarse que mediante el empleo de un análisis metabolómico incluyendo nociones teóricas y prácticas de biología, química analítica, química orgánica y estadística ha permitido brindar resultados acerca de la participación e influencia de determinados compuestos volátiles, grupos funcionales y vías metabólicas en la generación de las características sensoriales percibidas en los frutos de tomate.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	I
ÍNDICE GENERAL.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	VII
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	IX
CAPÍTULO I	
INTRODUCCIÓN GENERAL	
El origen del tomate	3
Domesticación y mejoramiento del fruto del tomate	3
Metabólica.....	4
Análisis Estadísticos Multivariados.....	6
Importancia Sensorial de los Alimentos.....	7
Compuestos Orgánicos Volátiles del Fruto del Tomate	9
OBJETIVOS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN	
Escenario de la Tesis Doctoral	11
Objetivo General.....	11
Objetivos Específicos.....	11
Referencias.....	13
INTRODUCCIÓN AL ANÁLISIS DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES	
Metodologías de Análisis de Compuestos Orgánicos Volátiles	17
Cromatografía de Gases	18
Técnicas de Análisis del Espacio en Cabeza (Headspace Analysis).....	20
Técnicas de Microextracción.....	21
Microextracción en Fase Sólida	22
Principios de la extracción mediante la técnica de Microextracción en Fase Sólida..	24
Referencias.....	27
CAPÍTULO II	
MATERIALES Y MÉTODOS	
Cultivo de las plantas de tomate	31
Procesamiento de la muestra	31
Cultivares de Tomates	32
Cosecha 2009	32

Cosecha 2010	32
Cosecha 2012	33
Determinación de metabolitos volátiles del fruto del tomate por HS-SPME-GC/MS.....	34
Preparación de las muestras de frutos de tomate	34
Análisis de compuestos orgánicos volátiles de frutos de tomate	34
Análisis de Datos	37
Análisis Estadísticos.....	38
Estructuras de los Compuestos Orgánicos Volátiles Determinados en los Frutos de Tomate.....	39
Referencias.....	43

CAPÍTULO III

EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES DEL FRUTO DEL TOMATE POR MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

Optimización de la Extracción de Compuestos Orgánicos Volátiles	47
Recubrimiento sorbente de la fibra de SPME	48
Tiempo de extracción.....	51
Temperatura de extracción.....	55
Adición de Sales Inorgánicas	58
Conclusiones	66
Referencias.....	67

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS SENSORIAL DE LOS FRUTOS DE TOMATE

Evaluación Sensorial	71
Análisis de los Datos Sensoriales de las Cosechas de Tomate	76
Cosecha 2009	77
Cosecha 2010	79
Cosecha 2012	83
Conclusiones	89
Referencias.....	91

CAPÍTULO V

METABOLÓMICA DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES DEL FRUTO DEL TOMATE

Perfiles de metabolitos volátiles en tomates.....	95
Análisis de los Datos	96
Análisis de los Compuestos Orgánicos Volátiles de la Cosecha 2009.....	97
Análisis por Redes Neuronales Artificiales de la Cosecha 2009.....	103

Análisis Específico de los Compuestos Orgánicos Volátiles de la Cosecha 2009.....	110
Conclusiones de la Cosecha 2009	116
Análisis de los Compuestos Orgánicos Volátiles de la Cosecha 2010.....	117
Análisis por Redes Neuronales Artificiales de la Cosecha 2010.....	123
Análisis Específico de los Compuestos Orgánicos Volátiles de la Cosecha 2010.....	126
Conclusiones de la Cosecha 2010	132
Análisis de los Compuestos Orgánicos Volátiles de la Cosecha 2012.....	133
Análisis por Redes Neuronales Artificiales de la Cosecha 2012.....	142
Análisis Específico de los Compuestos Orgánicos Volátiles de la Cosecha 2012.....	146
Conclusiones de la Cosecha 2012	153
Comentarios Finales del Capítulo.....	154
Consideraciones Generales	154
Cosechas Individuales	154
Metabolitos Volátiles asociados al Olor y Sabor del Fruto del Tomate	155
Contribución Metabólica de los Compuestos Orgánicos Volátiles de las Cosechas de Tomate.....	155
Conclusiones Finales del Capítulo.....	156
Referencias.....	157

CAPÍTULO VI

ASOCIACIÓN DEL OLOR Y SABOR CON EL ORIGEN METABÓLICO Y GRUPOS FUNCIONALES DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES DEL FRUTO DEL TOMATE

Introducción	161
Análisis de Correlación entre Variables Sensoriales	161
Análisis de Correlación por Origen Metabólico	165
Análisis de Correlación por Grupo Funcional	167
Análisis de Correlación Mixto	169
Conclusiones	176
Referencias.....	178

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES GENERALES

Conclusiones Generales.....	181
Presentaciones a Congresos y Reuniones Científicas.....	183
Trabajos Científicos	184

Agradecimientos

El desarrollo de esta tesis y años previos tuvo la amabilidad de conducirme por laboratorios y oficinas inesperadas... los pasillos de Química Orgánica, Bioquímica Clínica, Cequimap, ICYTAC, las cosechas de Mendoza, las jornadas calurosas en el IFAPA, los días en el INTA-Castelar... En todos esos lugares tuve la suerte de conocer gente que me brindó consejos, discusiones, charlas, sonrisas y mates.

En primer lugar debo agradecer de manera especial a Ana, por haberme abierto las puertas de su laboratorio, darme un lugar de trabajo y confiar en mí para llevar a cabo este nuevo proyecto. Por su gran paciencia y comprensión en este largo camino que compartimos juntos.

A Ramón, por su gran dedicación, tranquilidad, compromiso, discusiones y su buena onda de siempre.

A ellos, por haberme dirigido en esta tesis y discutido todos los detalles que surgían en cada momento. Muchas gracias.

Agradezco también a la comisión de tesis, Dra. Alicia Veglia y Dra. María Elena Álvarez por su inmensa paciencia en cada ocasión, por sus opiniones, discusiones y por su constante predisposición.

A la evaluadora externa, Dra. María Fernanda Silva, por el tiempo dedicado a leer esta tesis.

Al Instituto de Investigaciones en Físicoquímica de Córdoba, la Universidad Nacional de Córdoba, la Facultad de Ciencias Químicas y al Depto. de Química Orgánica por brindarme el lugar de trabajo. A CONICET por las becas otorgadas para desarrollar esta tesis.

A los profesores del grupo de trabajo. Los secretarios, Kike, Gloria, Julio, Laura, Eva por su gran predisposición, a Raúl por su buena onda y mates compartidos.

A mis compañeros del 106, Jorge, Nati, Poli, Daiann, Rodri, Nati y Sol. GRACIAS, porque desde un inicio siempre me brindaron una gran sonrisa, un mate siempre listo y la mejor buena onda para compartir los días en este lugar.

A mis amigos, compañeros de laboratorio y del grupo de trabajo Javi, Caro, Walter, Silvia, Euge, Gise, Pupi, Marce, Lili, Patricia, Luciana, Silvi, Dani, Fabri, Adrián, Juan Pablo, Gaby, Manu, Wilber y Martín.

A los que ya no están por estos pasillos pero compartimos excelentes momentos dentro y fuera de los laboratorios, a Mario, Guille, Javi, Maru, Victoria y Pencho.

A JPF y Mario Ravera, por aconsejarme en los primeros años de trabajo, tanto en los equipos como también en mis días cotidianos.

A Virginia por su infinita constancia en estos últimos años, su buena onda y su enorme entereza por aguantar mis divagues de laboratorio. Gracias!

A la gente del Instituto (ICYTAC) y de Bromato, Mariana, Vero, Romi, Joaquín, Daniel, Rocio, Eugenia, Santi, Lidwina, Vale y Lucas por la mejor buena onda de siempre, los mates, consejos y charlas.

A mis compañeros de la facu, Esteban, Gime, Caro, Martín, José, Ceci y Carola por compartir conmigo una etapa previa que fue el inicio de este largo camino.

Especialmente a Ceci, una gran persona, que estuvo presente siempre, prestándome una oreja en todo momento.

A mis eternos amigos de siempre, Opi, Seba, Gaby, Nico, Leo, Dani, Pao, Laura y especialmente a Sabri. Personas que formaron parte de otra sección de mi vida, pero que sin ellos no hubiera podido llegar hasta este momento en pie. Eternamente agradecido...

A mi familia... a mis padres, por enseñarme tantas cosas que en ningún libro puede leerse, por todo el esfuerzo que hicieron para que estudiara, por compartir conmigo las buenas y las malas, por todo su infinito amor y cariño que día a día me hacen llegar desde lejos. A Fer, mi hermano, por compartir conmigo largos años en cambiantes situaciones, su complicidad, ocurrencias/locuras y por su silencioso cariño.

A la familia de Lydia, por su cariño y apoyo constante en estos años que compartimos.

A Lydia, mi amor, por darme la mano en todo momento, por ser mi apoyo en la vida cotidiana, por su infinita paciencia, por su profundo amor, por todas las pequeñas cosas diarias que hacen que mis días nunca sean iguales. Gracias por todo lo hermoso que dejas en mí...

Agradezco profundamente a todas las personas que la vida me cruzó, todas ellas moldearon de alguna forma mi persona y hoy es el resultado de su aporte que les dedique estas líneas en esta ocasión. Gracias conocidos y (des)conocidos....

El capítulo invisible....

La experiencia de haber transitado cansinamente los pasillos carmines estos años, ha dejado matices de todo tipo... tangibles e inmateriales...

El reflejo de mis labores, vanidosamente, encuentra reposo en las próximas páginas, *los capítulos fríos...*

Pero este libro posee también una sección no impresa. Indocumentada. Escrita invisiblemente y amparada en referencias antiguas, difusas e imprecisas y en otras que pronto se transformarán en las primeras...

En esos textos liberados de cuerpo se encuentran fragmentos y pasajes de la vida de otros, de su impronta, de sus miradas, de sus palabras...

¿Capítulo?... Invisible y obligadamente dinámico. En este registro de causas y azares: hoy-mañana-y-pasado engrosan su escritura. Los innombrables actuales serán conocidos mañana y lo que no ha sucedido estará aconteciendo...

Ingenuamente, todo ello irá apilándose en párrafos ligeros y la memoria pretenderá, como hasta hoy, engañarme que se despegará para siempre de ellos...

Presumida... pero gentil... jamás cumplirá sus amenazas...

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AA: aminoácidos.

AC: análisis de conglomerados.

ACP: análisis de componentes principales.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

AG: ácidos grasos.

ALC: alcoholes.

ALD: aldehídos.

ANAVA: análisis de varianza.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNeu: análisis por redes neuronales.

CAR: carboxen.

CAROT: carotenoides.

CET: cetonas.

CG: cromatografía de gases.

CG-O: cromatografía de gases con detector olfatométrico.

COVs: compuestos orgánicos volátiles.

CP1: componente principal 1.

CP2: componente principal 2.

CV%: coeficiente de variación porcentual.

CW: carbowax.

DI-SPME: microextracción en fase sólida en contacto directo.

DVB: divinilbenceno.

EDTA: ácido etilendiaminotetracético.

EI: *electronic impact*.

EIC: *extracted ion chromatogram*.

EM: espectrómetro de masas.

EPOX: epóxidos.

EST: ésteres.

EST-ALC: éster-alcohol.

ET-ALC: éter-alcohol.

eV: electron volt.

FID: *flame ionization detector*.

FS: *full scan*.

FUR: furanos.

HCA: *hierarchical cluster analysis*.

HIDR: hidrocarburos.

HS: *headspace*.

HS-SPME: microextracción en fase sólida en espacio en cabeza.

HPLC: *high performance liquid chromatography*.

ICR-FT: transformada de Fourier de resonancia del ion ciclotrón.

ILs: *introgession lines*.

IT: *ion trap*.

LPME: *liquid phase microextraction*.

MS: *mass spectrometry*.

m/z : relación masa sobre carga.

NITR: nitrocompuestos.

OU: *odor units*.

PA: poliacrilato.

PDMS: polidimetilsiloxano.

PLS: *partial least squares*

PM: peso molecular.

ppb: partes por billón (mg Kg^{-1}).

ppm: partes por millón ($\mu\text{g Kg}^{-1}$).

ppt : partes por trillón (ng Kg^{-1}).

PV: presión de vapor.

QqQ: triple cuadrupolo.

RPM: revoluciones por minuto.

RMN: Resonancia Magnética Nuclear.

s: desviación estándar muestral.

SBSE: *stir-bar sorptive extraction*.

Sens: variable sensorial.

SIM: *selected ion monitoring*.

SOM: *self-organizing maps*.

SPME: *solid phase microextraction*.

Sti: estándar interno.

Abreviaturas y Acrónimos

Teb: temperatura de ebullición.

TER: terpenos.

TIAZ: tiazoles.

TOF: *time of flight*.

TR: tiempo de retención.

uma: unidad de masa atómica.

UNK: señal no identificada.

(inv): invertido.

Capítulo I

Introducción General

INTRODUCCIÓN GENERAL

El origen del tomate

Las Solanáceas conforman una de las familias más amplias en el reino vegetal, conteniendo una gran cantidad de especies, aproximadamente entre 9000 y 10000, habitando en una enorme diversidad de ambientes. Miembros de esta gran familia se encuentran distribuidos en todos los continentes, pero la mayor diversidad está ubicada en la región comprendida entre el sur de EEUU y Méjico hasta la Patagonia. Dentro de esta familia se encuentra el género *Solanum* aportando alrededor de 2000 especies distribuidas en variados ambientes como selvas tropicales, regiones costeras, zonas montañosas y desiertos inhóspitos.

Pertenecientes a este género *Solanum* se encuentran importantes especies de interés agronómico como la papa (*Solanum tuberosum*), el tomate (*Solanum lycopersicum*) y la berenjena (*Solanum melongena*)^[1].

El tomate es una planta herbácea anual, de gran importancia comercial debido a sus frutos comestibles. Tuvo su origen en las zonas montañosas de Los Andes en América del Sur, incluyendo las regiones del norte de Chile, Bolivia, Ecuador, Colombia y Perú. Además de la especie *S. lycopersicum*, única especie domesticada, han podido identificarse al menos otras 12 especies silvestres relacionadas. Entre las especies más renombradas distribuidas en esa extensa región se han clasificado algunos tomates silvestres, como por ejemplo *S. pimpinellifolium*, *S. pennellii*, *S. habrochaites* (especies de zonas terrestres), *S. cheesmaniae* y *S. galapagense* (endémicos de la isla de Galápagos, Ecuador), entre otros^[2].

Domesticación y mejoramiento del fruto del tomate

Ancestralmente, el tomate fue llevado por los pobladores originarios desde su hábitat silvestre en las zonas andinas hacia las planicies de América Central. De esta manera se inició el primer evento de domesticación de la especie donde fueron seleccionados los genotipos de mayor interés alimenticio, que luego serían distribuidos por diferentes civilizaciones en el resto de América. Siglos posteriores con la llegada de los europeos a América y sus progresivos viajes, esta nueva especie fue introducida en las huertas del resto del mundo. Sin embargo se presume que en los viajes de retorno solo unas pocas variedades de semillas y plantas fueron llevadas hacia el viejo continente. Precisamente a partir de esos pocos individuos seleccionados comenzó a perfilarse el fruto del tomate moderno que se conoce en la actualidad.

La eficiencia en la domesticación del cultivo y los constantes procesos de mejoramiento han tenido un efecto muy importante sobre la variabilidad genética de la especie. Históricamente se asume que el proceso se inició con una serie pequeña de individuos, seleccionados como los más aptos. Estos pocos individuos comenzaron a cruzarse generando descendencia con características genéticas similares. Posteriormente

esta nueva generación comenzó a cruzarse entre pares progresivamente produciendo una drástica reducción de la variabilidad genética en la especie *S. lycopersum*.

Estudios genéticos postulan que la fuerza evolutiva conocida como *deriva génica* fue uno de los principales responsables de esta reducción en la variación en el genoma del tomate^[3]. La comparación de los genomas de especies silvestres y el tomate actual determinó que la especie cultivable ofrece solo un 5% de variabilidad genética respecto a sus pares silvestres^[4]. Investigaciones más recientes demostraron que entre el tomate moderno y su par silvestre más cercano, *S. pimpinellifolium*, hay solo 0.6% de divergencia distribuida en los doce cromosomas que componen su genoma y 8% con el genoma de la papa^[5].

Sin embargo, a pesar de la corta distancia genética que separa estas especies de tomate las diferencias en los frutos pueden observarse en el tamaño, color, textura de la piel, cantidad y tamaño de las semillas. Metabólicamente la variabilidad genética también está representada en los compuestos químicos presentes en los frutos, estos metabolitos además de cumplir con roles fisiológicos específicos poseen una enorme influencia en la apreciación del aroma y sabor en cada una de las especies.

Los programas de mejoramiento de la especie han pasado por diferentes intereses a medida que transcurrían las épocas. Algunas de las características buscadas en los mejoramientos fueron consistencia en el tamaño, forma, color, resistencia a enfermedades y estrés abiótico, mayor rinde por planta, maduración pareja, menor deterioro pos cosecha. Por otro lado a expensas de obtener estas aptitudes mencionadas se han desvanecido otras características muy estimadas, sobre todo por los consumidores habituales del fruto. Entre estas características se encuentran el olor y sabor característico del fruto del tomate.

En los últimos años los consumidores regulares de tomate han reclamado por conseguir, incluso a favor de pagar mayores precios, frutos con mayor calidad sensorial, más precisamente incluyendo un salto de calidad en el olor y el sabor del fruto.

Los compuestos orgánicos volátiles que produce naturalmente el fruto poseen una enorme influencia sobre estas características sensoriales, sin embargo debido a que el origen y la regulación de estos metabolitos tiene un carácter multigénico aun no ha podido esclarecerse en profundidad las relaciones entre los mismos y su aporte en el desarrollo del olor y sabor de la especie.

Recientemente enfoques basados en las ciencias denominadas *ómicas* como la genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica y la información disponible luego de la secuenciación del genoma de la especie, han podido esclarecer algunos intrincados aspectos sobre este complejo carácter desarrollado en el fruto del tomate^[5, 6].

Metabolómica

La metabolómica se define como el estudio de toda la porción de metabolitos contenidos en un organismo. Un análisis metabolómico contempla el análisis simultáneo a gran escala de un organismo ofreciendo resultados íntimamente asociados al genotipo expresado por el individuo estudiado bajo la influencia del ambiente^[7]. Las técnicas

analíticas predominantes aplicadas en la metabolómica para estudiar un organismo son la Espectrometría de Masas (EM) y la Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Existen dos estrategias generales de estudio en esta ciencia *ómica*, el estudio metabolómico dirigido (*targeted metabolomics*) y no dirigido (*untargeted metabolomics*). La primera de ellas, se concentra en determinar los aspectos ligados a una vía metabólica particular que posee una incidencia conocida sobre un suceso biológico específico. La otra variante, se focaliza en obtener una medida de todos los metabolitos medibles contenidos en una muestra biológica en un determinado contexto biológico.

El metaboloma representa el último nivel en un sistema biológico y los metabolitos son considerados las entidades funcionales del mismo. Este complejo sistema puede ser modificado por diferentes agentes como por ejemplo perturbaciones ambientales, estrés biótico, abiótico y nutricional o por procesos transgénicos. Si bien es un excelente complemento de información, la metabolómica al contrario de las demás ciencias *ómicas*, puede ser realizado e interpretado sin pleno conocimiento del genoma de la especie^[8]. Sin embargo, debe considerarse la complejidad de los sistemas biológicos, los cuales son controlados por diferentes niveles de bioregulación y dinámicamente conectados unos a otros. Cada nivel organizacional modula diferente información fisiológica y eventos celulares que impactan sobre otros niveles del flujo biológico. En la Figura 1 se esquematiza la porción de estudio de las ciencias *ómicas* más desarrolladas dentro del flujo de información biológica.

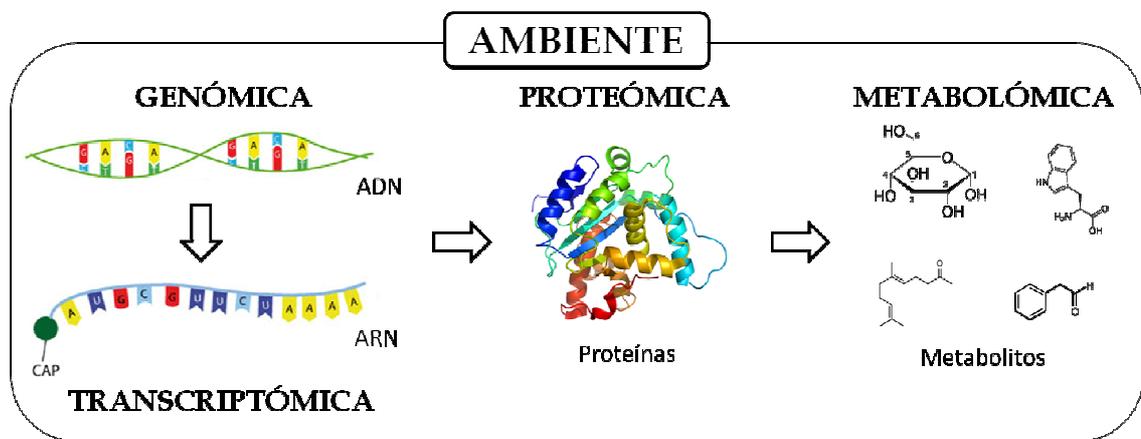


Figura 1. Diagrama del flujo de información biológica y su relación con las ciencias *ómicas*

La amplitud del metaboloma ofrece diversos inconvenientes para llevar a cabo con éxito un análisis metabolómico. Debido a la extensa naturaleza de los metabolitos expresados, es imposible determinar bajo las mismas condiciones todos los compuestos de interés. Por ello es necesario definir que sección del metaboloma, de acuerdo a sus características fisicoquímicas y bajo que técnica de análisis, se pretende orientar el análisis.

El procedimiento de análisis cuenta con diferentes subprocesos contiguos que dan origen a los resultados finales de la metodología. Un esquema general involucra 1) la obtención de los individuos a analizar bajo determinadas condiciones fisiológicas, 2) la adquisición de la porción del material de estudio, 3) preparación y tratamiento de las muestras, 4) análisis instrumental, 5) ordenamiento de los datos, 6) análisis

quimiométricos, 7) interpretación de los resultados, 8) correlación biológica con los individuos estudiados^[8-11].

Por otro lado, la metabolómica es una ciencia interdisciplinaria que requiere conocimientos de biología, química analítica, química orgánica, estadística e informática^[11]. En la actualidad, los análisis de base metabolómica están siendo aplicados complementariamente a muchas ciencias derivadas de la biología, como por ejemplo la medicina^[12, 13], nutrición^[14, 15] y biotecnología^[16] con objeto de profundizar el conocimiento acerca de las relaciones entre todos los niveles biológicos de un organismo y su interacción con el medio ambiente. Entre los organismos más estudiados pueden nombrarse a los seres humanos, los microorganismos, plantas y animales.

Respecto de los organismos vegetales, las especies de interés económico han marcado tendencia en estos estudios. Sobre los cultivos involucrados en la producción de alimentos se han centrado numerosos estudios metabolómicos que proporcionen valiosa información para mejorar las cualidades nutritivas y sensoriales de los derivados alimenticios de estas especies vegetales^[17]. El fruto del tomate no ha sido una excepción a esta corriente de estudios, por el contrario, es uno de los organismos modelo utilizados con mayor frecuencia debido a su gran importancia económica y nutricional en la dieta humana^[18, 19].

Los estudios metabolómicos del tomate han aportado valiosos conocimientos para descifrar los complejos procesos que dominan el metabolismo de esta especie. Por ejemplo, el cambio en los niveles de producción de diferentes metabolitos durante el proceso de maduración y desarrollo del fruto^[20], la biosíntesis y regulación de precursores bioactivos como carotenoides, tocoferoles y clorofila^[21, 22], o procesos ligados al metabolismo de los azúcares y ácidos orgánicos con importantes efectos sobre la calidad y el manejo pos cosecha de los frutos ^[23]. Sin embargo, debe destacarse que el mayor porcentaje de estudios realizados se concentran sobre el metabolismo central del tomate. Sobre esta porción del metaboloma, en general, se obtienen perfiles más estables que los observados del estudio del metabolismo secundario, como por ejemplo los metabolitos volátiles. El estudio de estos últimos, comprenden un gran desafío debido a la enorme diversidad, variabilidad, dificultad de determinación analítica y la escasa concentración presente en los distintos tejidos de la planta del tomate^[24].

Análisis Estadísticos Multivariados

Los datos provenientes de estudios metabolómicos, comprenden una inmensa cantidad de información proveniente de la determinación de cientos a miles de pequeñas moléculas de un organismo de estudio. Los análisis estadísticos de estas mediciones requieren de metodologías de análisis robustas capaces de analizar e interpretar complejas interacciones entre los analitos considerados^[25].

La comparación de diferencias entre individuos considerando sólo una variable metabólica es comúnmente analizada mediante el uso de técnicas univariadas de análisis, como el Análisis de Varianza (ANAVA) o la Prueba t de Student (t-test). Sin embargo,

cuando es necesario explorar relaciones entre muchas variables medidas con los organismos estudiados se recurre a las técnicas estadísticas multivariadas^[26].

Las metodologías de análisis multivariadas comúnmente utilizadas en estudios metabólicos son Análisis de Componentes Principales (ACP), Análisis de Conglomerados (AC), Regresión de Cuadrados Mínimos Parciales (mejor conocido por sus siglas en inglés PLS) y otras variaciones de similares de estas^[27, 28].

El ACP representa un modelo lineal mixto no supervisado que permite explicar la variabilidad dentro de los datos mediante nuevas variables normalizadas, los componentes principales (CPs). Estos nuevos ejes son construidos mediante combinaciones lineales ortogonales normalizadas a partir de las variables originales y ordenados de acuerdo al porcentaje de variabilidad que permiten explicar. La matriz de datos es factorizada en dos nuevas matrices, una que proyecta la posición de las observaciones y otra que demuestra la importancia de las variables originales en la transformación de los datos. Entre las ventajas que ofrece puede mencionarse a la importante reducción de la dimensionalidad y una consecuente facilitación en la interpretación de los datos. Además, ofrece una intuitiva visualización gráfica de los resultados (biplot) que permiten agrupar y clasificar conjuntos de observaciones en forma simple^[25].

Debido a su extensa aplicabilidad y su sencillo entendimiento gráfico, los ACP se han convertido en un punto de partida en la visualización e interpretación de los datos metabólicos.

Los AC representan otra técnica de análisis multivariado no supervisado. Dentro de este grupo también pueden nombrarse a los Mapas Auto-Organizativos (*SOM: Self Organizing Maps*), los Agrupamientos Jerárquicos (*HCA: hierarchical cluster analysis*) y *k-means*. Los métodos de agrupamiento permiten la visualización y clasificación de acuerdo a las similitudes o diferencias intrínsecas de las observaciones experimentales^[25]. Inicialmente se parte de una matriz de datos que luego es transformada en una matriz de proximidad que mide la distancia (semejanza) entre pares de objetos. La forma clásica de obtener estas medidas es a partir de la distancia euclídea entre n puntos (observaciones) dentro de un espacio n -dimensional^[28].

Importancia Sensorial de los Alimentos

Los compuestos orgánicos volátiles (COVs) son las moléculas encargadas de generar el olor de un alimento, por ello el análisis de COVs en productos alimenticios posee un gran interés por sectores económicos y académicos que se involucran en la industria alimentaria. Los compuestos volátiles además de generar el olor se combinan con la apreciación gustativa, en boca, produciendo la respuesta sensorial denominada aroma (*flavor* en lengua inglesa).

Se conoce que el aroma de un alimento es de gran importancia como estándar de calidad y además puede ofrecer información acerca del aporte nutricional, elección subjetiva y preferencia de un alimento por parte de los consumidores.

En general la cantidad de COVs presentes en los alimentos suele encontrarse en proporciones muy pequeñas, alrededor de 10 a 1000 ppb^[29]. A pesar de presentarse en ínfimas concentraciones poseen un notable impacto sobre la percepción sensorial. Las moléculas volátiles son detectadas por receptores específicos ubicados dentro de la cavidad nasal, precisamente en el epitelio olfatorio. Allí están ubicadas las neuronas olfatorias primarias, receptores quimioactivos (uno de los más antiguos desde el punto de vista evolutivo), que detectan la presencia de los compuestos volátiles por medio de un estímulo celular. A su vez este núcleo de sensores se encuentra conectado al bulbo olfatorio que funciona como nexo entre los receptores y el sistema nervioso central (Figura 1). El bulbo olfatorio clasifica e integra la información recogida y la retransmite por los nervios olfatorios hacia estructuras neuronales ubicadas en el cerebro^[30].

Las vías olfatorias derivan también hacia la amígdala y el hipocampo, que forman parte del sistema límbico involucrado en la emoción y la memoria. El procesamiento de los olores por medio del sistema límbico genera una biblioteca de profundas memorias olfativas mediante un mecanismo aún desconocido. Se cree que el complejo del sistema olfativo tiene la capacidad de distinguir aproximadamente 10.000 olores diferentes^[31].

No obstante los receptores olfativos pueden ser estimulados por dos vías diferentes, aunque relacionadas entre sí. Una de ellas corresponde a la inspiración por nariz del aire que contiene moléculas activas (estímulo ortonasal), la otra vía tiene lugar durante el acto de masticar o beber un producto, donde la expiración por nariz arrastra los compuestos volátiles que estimularán los mismos receptores ubicados en la cavidad nasal (estímulo retronasal). Además esta dualidad en la percepción del olor, se encuentra íntimamente asociada a la sensación del sabor y textura en boca.

El acto de masticar un alimento colecta la información sobre el gusto, que está dominado por 5 sensaciones básicas: dulce, ácido, amargo, salado y umami (altamente relacionado al glutamato). Sobre la lengua se ubican en diferentes secciones los receptores gustativos específicos para cada gusto básico. En el caso de frutos, vegetales y alimentos derivados los responsables más importantes en estimular las papilas gustativas corresponden en su mayoría a los diversos azúcares y ácidos orgánicos presentes naturalmente en estos alimentos.

Toda esta información organoléptica genera una compleja red de datos que promueve en su manera más simple y llana la formación de una sensación agradable o desagradable para un determinado producto^[32].

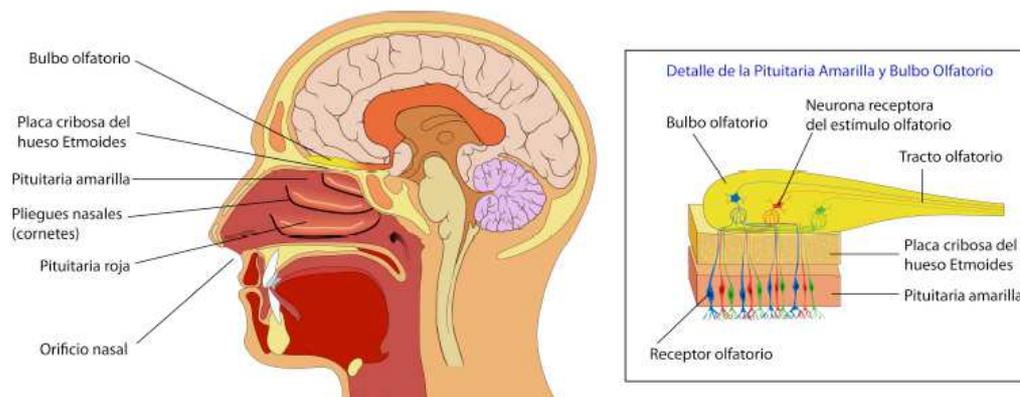


Figura 1. Esquema del aparato olfatorio.

Compuestos Orgánicos Volátiles del Fruto del Tomate

En el caso del tomate se conoce que hay reportados hasta la fecha aproximadamente unos 400 compuestos orgánicos volátiles (COVs) provenientes del fruto de este cultivo.

Estos compuestos incluyen metabolitos con diferentes grupos funcionales como ácidos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, sulfuros, furanos, epóxidos, fenoles, lactonas y terpenos. Normalmente son producidos en mayor abundancia durante el proceso de maduración, cuando los cambios metabólicos son más pronunciados y existe una mayor tendencia hacia el catabolismo de moléculas de mayor peso molecular hacia estos metabolitos secundarios de estructuras más simples. Por lo general derivan de diferentes vías metabólicas que involucran aminoácidos, lípidos, polisacáridos, ligninas y carotenoides^[33].

Unos pocos COVs han sido identificados como los "*metabolitos volátiles de impacto para el olor*" del fruto del tomate. Estos COVs han sido confirmados como los principales responsables de producir el olor característico del fruto. Sin embargo, no son más de 25 compuestos, de diferente origen metabólico y grupo funcional, los que se nombran en este selecto grupo de COVs^[34]. Entre los más abundantes, puede citarse al grupo de los derivados aldehídicos de ácidos grasos que confieren notas de tipo herbáceo. Sin embargo, constantemente los estudios se orientan en la búsqueda de nuevos COVs no reportados y en demostrar que otros metabolitos volátiles también pueden ser considerados como *volátiles de impacto*^[6]. En el Capítulo V, se desarrolla en mayor detalle la identidad de los *metabolitos volátiles de impacto* del tomate.

Evolutivamente la expresión de las moléculas activas a nivel olfatorio tenía un papel fundamental en atraer a organismos dispersadores de semillas. En el caso del tomate (y otros frutos) la mayoría de los COVs con mayor impacto sobre el aroma provienen de nutrientes esenciales y compuestos beneficiosos para la salud. En consecuencia, se postula que existe una relación entre la abundancia de estos metabolitos volátiles y la calidad nutricional del fruto. Esta relación genera un importante rasgo informativo acerca del valor nutricional de un alimento, con el mutuo beneficio de una mayor atracción hacia los dispersadores de semillas^[34].

Respecto de los COVs, la concentración, volatilidad, estructura, polaridad, peso molecular y otras propiedades fisicoquímicas juegan un papel fundamental en la emisión de los mismos a partir del soporte que los contiene. Debe tenerse en cuenta también la importancia de las propiedades de la matriz alimenticia, su estructura, estado de agregación, hidrofobicidad, humedad, fotosensibilidad, termosensibilidad, etc.

La capacidad de liberación de un analito volátil está gobernada por el coeficiente de partición entre el aire y la matriz donde está contenido, siendo este coeficiente dependiente de la temperatura. Todas estas interacciones entre los compuestos activos del olor y su matriz original generan una alta complejidad que debe tenerse en cuenta en el momento de elegir una metodología de análisis de compuestos volátiles.

En la actualidad, el estudio de los COVs, su biosíntesis y regulación metabólica en el fruto del tomate es un importante motivo de investigaciones en búsqueda de respuestas que hasta el momento no han podido ser aclaradas^[35]. Destacados grupos de

investigación, han arrojado luz sobre importantes aspectos relacionados a los genes involucrados en la biosíntesis de COVs utilizando modelos basados en líneas de introgresión (*ILs*) entre las especies *S. lycopersicum*, *S. pennellii* y *S. habrochaites* o líneas de plantas con mutaciones específicas. Puede citarse por ejemplo el descubrimiento de diferentes locus distribuidos en los cromosomas de la especie afectando una gran cantidad de metabolitos^[36]. Un caso muy particular fue reportado en el cromosoma 8 afectando la producción de importantes COVs de impacto provenientes del metabolismo de la fenilalanina como fenilacetaldehído, bencilnitrilo y 2-feniletanol^[37, 38].

Por otro lado, también se desprenden investigaciones enfocadas en acentuar la determinación masiva de COVs de los frutos de tomate identificando nuevos metabolitos del perfil de COVs. Uno de los trabajos más extensos hace mención a 322 metabolitos obtenidos de 94 variedades y especies diferentes de tomate^[39].

Otros trabajos hacen mención acerca de la relación de los COVs y el desarrollo de las características organolépticas como parámetro de calidad en el fruto del tomate^[40]. Distintos enfoques han tratado de correlacionar la información metabólica y sensorial por medio de ensayos de simulación de matrices biológicas y métodos estadísticos^[41-44]. Este tipo de investigaciones presenta una especial atención por parte de los mejoradores de la especie de tomate debido a que como fue comentado, aun no han podido desarrollarse variedades de tomate que cumplan con los altos estándares de calidad reclamados por los consumidores.

La búsqueda de la expresión de características beneficiosas en los frutos actuales de tomate ha llevado a investigar diferentes variedades y especies de tomate silvestres relacionadas que puedan ser considerados como fuentes de recursos genéticos para el mejoramiento de la especie^[35]. Es conocido que la expresión de una determinada característica metabólica está influenciada por el genotipo de la planta y por la presión ambiental que rodea el organismo. Debido a esto, el estudio de variedades y especies de tomate con potenciales características productivas que puedan incorporarse al cultivo actual se encuentra en auge en los últimos años^[16, 45]. Las investigaciones orientadas a los COVs, también se asocian a esta estrategia de análisis en busca de descifrar y promover nuevas posibilidades de mejoramiento de la calidad sensorial del fruto del tomate^[46, 47].

OBJETIVOS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

Escenario de la Tesis Doctoral

Los recursos genéticos naturales son uno de los bienes más valorados, y en algunos casos menos explotados, por la soberanía nacional. En la provincia de Mendoza se cuenta con una colección de semillas de tomates (*S. lycopersicum*) originarias de la región norte andina del país, denominadas variedades *criollas*. Este germoplasma de tomates ofrece una rica posibilidad de oportunidades para aprovechar estos recursos genéticos con el fin de mejorar las características actuales de este importante cultivo.

El presente trabajo de investigación se encuadra dentro de un proyecto interdisciplinario en red involucrando diferentes grupos de investigación de la Argentina con el fin de revalorizar los recursos agronómicos propios y fomentar el desarrollo de variedades de tomate capaces de cumplir con las exigencias modernas de calidad que recaen en la actualidad sobre este fruto.

El estudio fue centrado en determinar los compuestos orgánicos relacionados a la calidad organoléptica en variedades *criollas* de tomate. Si bien estas accesiones no poseen relevancia comercial debido a sus características agronómicas, estos cultivares de tomate poseen cualidades sensoriales muy superiores al tomate comercial producido en cosechas intensivas y a gran escala en la actualidad.

Objetivo General

El objetivo general está focalizado en el estudio de la porción volátil del metaboloma de distintas variedades *criollas* y cultivables de tomate (*S. lycopersicum*) para identificar cuáles metabolitos tienen implicancia en el desarrollo del olor y el sabor del fruto del tomate. Estos compuestos químicos serán considerados como potenciales marcadores de calidad capaces de incorporarse en futuros procesos de mejoramiento de la especie.

Objetivos Específicos

- Desarrollar una técnica que permita extraer, separar, identificar y cuantificar los metabolitos volátiles presentes en el fruto del tomate.
- Evaluar las características sensoriales de los frutos de tomate elegidos para la determinación metabolómica de los compuestos orgánicos volátiles (COVs).

- Determinar por medio de diferentes análisis quimiométricos las asociaciones y correlaciones entre la información sensorial y metabólica obtenida de los frutos de tomate.
- Identificar los responsables químicos de las características sensoriales desarrolladas en las diferentes líneas de frutos ensayadas.

Referencias

- [1] **Knapp S.** Tobacco to tomatoes: a phylogenetic perspective on fruit diversity in the Solanaceae. *J. Exp. Bot.*, 2002, 53:2001-2022.
- [2] **Peralta IE, Knapp S, Spooner DM.** New Species of Wild Tomatoes (Solanum Section Lycopersicon: Solanaceae) from Northern Peru. *Syst. Bot.*, 2005, 30:424-434.
- [3] **Miller JC, Tanksley SD.** RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus Lycopersicon. *Theor. Appl. Genet.*, 1990, 80:437-448.
- [4] **Yuling B, Lindhout P.** Domestication and Breeding of Tomatoes: What have We Gained and What Can We Gain in the Future? *Ann. Bot.*, 2007, 100:1085–1094.
- [5] **The, Tomato, Genome, Consortium.** The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, 2012, 485:635-641.
- [6] **Tieman DM, Bliss P, McIntyre LM, Blandon-Ubeda A, Bies D, Odabasi AZ, Rodriguez GR, van der Knaap E, Taylor MG, Goulet C, et al.** The Chemical Interactions Underlying Tomato Flavor Preferences. *Curr. Biol.*, 2012, 22:1035-1039.
- [7] **Fiehn O, Kopka J, Dörmann P, Altmann T, Trethewey RN, Willmitzer L.** Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nat. Biotechnol.*, 2000, 18:1157-1161.
- [8] **Ryan D, Robards K.** Metabolomics: The Greatest Omics of Them All? *Anal. Chem.*, 2006, 78:7954-7958.
- [9] **Sumner LW, Mendes P, Dixon RA.** Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry*, 2003, 62:817-836.
- [10] **Fiehn O.** Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant. Mol. Biol.*, 2002, 48:155-171.
- [11] **Fukusaki E, Kobayashi A.** Plant metabolomics: potential for practical operation. *J. Biosci. Bioeng.*, 2005, 100:347-354.
- [12] **Emwas A-H, Luchinat C, Turano P, Tenori L, Roy R, Salek R, Ryan D, Merzaban J, Kaddurah-Daouk R, Zeri A, et al.** Standardizing the experimental conditions for using urine in NMR-based metabolomic studies with a particular focus on diagnostic studies: a review. *Metabolomics*, 2014:1-23.
- [13] **Vermeersch KA, Styczynski MP.** Applications of metabolomics in cancer research. *J. Carcinog.*, 2013, 12:9.
- [14] **Moyon T, Le Marec F, Qannari E, Vigneau E, Le Plain A, Courant F, Antignac J-P, Parnet P, Alexandre-Gouabau M-C.** Statistical strategies for relating metabolomics and proteomics data: a real case study in nutrition research area. *Metabolomics*, 2012, 8:1090-1101.
- [15] **Su M, Zheng X, Zhang T, Pei L, Wang F, Zheng X, Gu X, Song X, Lu X, Chen G, et al.** Integrated profiling of metabolites and trace elements reveals a multifaceted malnutrition in pregnant women from a region with a high prevalence of congenital malformations. *Metabolomics*, 2012, 8:831-844.
- [16] **Okazaki Y, Saito K.** Recent Advances of Metabolomics in Plant Biotechnology. *Plant Biotechnol. Rep.*, 2012, 6:1-15.
- [17] **Cevallos-Cevallos JM, Reyes-De-Corcuera JI, Etxeberria E, Danyluk MD, Rodrick GE.** Metabolomic analysis in food science: a review. *Trends Food Sci. Technol.*, 2009, 20:557-566.
- [18] **Schauer N, Semel Y, Roessner U, Gur A, Balbo I, Carrari F, Pleban T, Perez-Melis A, Bruedigam C, Kopka J, et al.** Comprehensive metabolic profiling and phenotyping of interspecific introgression lines for tomato improvement. *Nat. Biotechnol.*, 2006, 24:447-454.
- [19] **Hall RD, Brouwer ID, Fitzgerald MA.** Plant Metabolomics and its Potential Application for Human Nutrition. *Physiol. Plant.*, 2008, 132:162-175.

- [20] **Hanhineva K, Aharoni A.** Metabolomics in Fruit Development. In *Molecular Techniques in Crop Improvement*. Edited by Jain S, Brar D. Berlín, Alemania: Springer; 2010: 675-693
- [21] **Almeida J, Asís R, Molineri VN, Sestari I, Lira BS, Carrari F, Peres LEP, Rossi M.** Fruits from Ripening Impaired, Chlorophyll Degraded and Jasmonate Insensitive Tomato Mutants have Altered Tocopherol Content and Composition. *Phytochemistry*, 2015, 111:72-83.
- [22] **Quadrana L, Almeida J, Otaiza S, Duffy T, Corrêa da Silva J, de Godoy F, Asís R, Bermúdez L, Fernie A, Carrari F, Rossi M.** Transcriptional Regulation of Tocopherol Biosynthesis in Tomato. *Plant Mol. Biol.*, 2013, 81:309-325.
- [23] **Centeno DC, Osorio S, Nunes-Nesi A, Bertolo ALF, Carneiro RT, Araújo WL, Steinhäuser M-C, Michalska J, Rohrmann J, Geigenberger P, et al.** Malate Plays a Crucial Role in Starch Metabolism, Ripening, and Soluble Solid Content of Tomato Fruit and Affects Postharvest Softening. *Plant Cell*, 2011, 23:162-184.
- [24] **de Vos RCH, Hall RD, Moing A.** Metabolomics of a Model Fruit: Tomato. In *Annual Plant Reviews Volume 43*. Edited by Hall RD. Oxford, Reino Unido. : Wiley-Blackwell; 2011: 109-155
- [25] **Bartel J, Krumsiek J, Theis FJ.** Statistical Methods for the Analysis of High-throughput Metabolomics Data. *Computat. Struct. Biotechnol. J.*, 2013, 4:1-31.
- [26] **De Livera AM, Olshansky M, Speed TP.** Statistical Analysis of Metabolomics Data. In *Metabolomics Tools for Natural Product Discovery: Methods and Protocols*. Edited by Roessner U, Dias DA. New York: Humana Press; 2013
- [27] **Uarrota VG, Moresco R, Coelho B, Nunes EdC, Peruch LAM, Neubert EdO, Rocha M, Maraschin M.** Metabolomics combined with chemometric tools (PCA, HCA, PLS-DA and SVM) for screening cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots during postharvest physiological deterioration. *Food Chem.*, 2014, 161:67-78.
- [28] **Liland KH.** Multivariate Methods in Metabolomics – from Pre-Processing to Dimension Reduction and Statistical Analysis. *TrAC*, 2011, 30:827-841.
- [29] **Aharoni A, Lewinsohn E.** Genetic Engineering of Fruit Flavor. In *Handbook of Fruit and Vegetable Flavors*. Edited by Hui YH: John Wiley & Sons; 2010
- [30] **Silverthorne DU:** *Fisiología Humana. Un Enfoque Integrado*. 4ta. edn. Buenos Aires. Argentina: Ed. Médica Panamericana; 2008.
- [31] **Sherwood L:** *Fisiología Humana. De las Células a los Sistemas*. 7ma. edn. Méjico D.F. Méjico: Cengage Learning; 2011.
- [32] **Auvray M, Spence C.** The multisensory perception of flavor. *Conscious. Cogn.*, 2008, 17:1016-1031.
- [33] **Schwab W, Davidovich-Rikanati R, Lewinsohn E.** Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *Plant J.*, 2008, 54:712-732.
- [34] **Goff SA, Klee HJ.** Plant Volatile Compounds: Sensory Cues for Health and Nutritional Value? *Science*, 2006, 311:815-819.
- [35] **Klee HJ.** Improving the Flavor of Fresh Fruits: Genomics, Biochemistry and Biotechnology. *New Phytol.*, 2010, 187:44-56.
- [36] **Mathieu S, Cin VD, Fei Z, Li H, Bliss P, Taylor MG, Klee HJ, Tieman DM.** Flavour compounds in tomato fruits: identification of loci and potential pathways affecting volatile composition. *J. Exp. Bot.*, 2009, 60:325-337.
- [37] **Tieman DM, Loucas HM, Kim JY, Clark DG, Klee HJ.** Tomato phenylacetaldehyde reductases catalyze the last step in the synthesis of the aroma volatile 2-phenylethanol. *Phytochemistry*, 2007, 68:2660-2669.
- [38] **Tieman D, Taylor M, Schauer N, Fernie AR, Hanson AD, Klee HJ.** Tomato aromatic amino acid decarboxylases participate in synthesis of the flavor volatiles 2-phenylethanol and 2-phenylacetaldehyde. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2006, 103:8287-8292.

- [39] **Tikunov Y, Lommen A, de Vos CHR, Verhoeven HA, Bino RJ, Hall RD, Bovy AG.** A Novel Approach for Nontargeted Data Analysis for Metabolomics. Large-Scale Profiling of Tomato Fruit Volatiles. *Plant Physiol.*, 2005, 139:1125-1137.
- [40] **Figueira J, Câmara H, Pereira J, Câmara JS.** Evaluation of Volatile Metabolites as Markers in *Lycopersicon esculentum* L. Cultivars Discrimination by Multivariate Analysis of Headspace Solid Phase Microextraction and Mass Spectrometry Data. *Food Chem.*, 2014, 145:653-663.
- [41] **Noble AC, Lesschaeve I.** Sensory Methods of Flavour Analysis. In *Food Flavour Technology*. Wiley-Blackwell; 2010: 296-318
- [42] **Ennis JM, Rousseau B, Ennis DM.** Sensory Difference Tests as Measurement Instruments: a Review of Recent Advances. *J. Sens. Stud.*, 2014, 29:89-102.
- [43] **Tandon KS, Baldwin EA, Scott JW, Shewfelt RL.** Linking Sensory Descriptors to Volatile and Nonvolatile Components of Fresh Tomato Flavor. *J. Food Sci.*, 2003, 68:2366-2371.
- [44] **Baldwin EA, Goodner K, Plotto A.** Interaction of Volatiles, Sugars, and Acids on Perception of Tomato Aroma and Flavor Descriptors. *J. Food Sci.*, 2008, 73:S294-S307.
- [45] **Perez-Fons L, Wells T, Corol DI, Ward JL, Gerrish C, Beale MH, Seymour GB, Bramley PM, Fraser PD.** A Genome-Wide Metabolomic Resource for Tomato Fruit from *Solanum pennellii*. *Sci. Rep.*, 2014, 4.
- [46] **Rambla JL, Tikunov YM, Monforte AJ, Bovy AG, Granell A.** The Expanded Tomato Fruit Volatile Landscape. *J. Exp. Bot.*, 2014.
- [47] **Iijima Y.** Recent Advances in the Application of Metabolomics to Studies of Biogenic Volatile Organic Compounds (BVOC) Produced by Plant. *Metabolites*, 2014, 4:699-721.

INTRODUCCIÓN AL ANÁLISIS DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES

Metodologías de Análisis de Compuestos Orgánicos Volátiles

Las estrategias que se utilizan en el análisis de COVs son muy diversas y estas dependen de las propiedades de la matriz y de los analitos de interés. Sin embargo determinados pasos coinciden en la mayoría de las metodologías de análisis de compuestos volátiles.

Los procesos que intervienen en el análisis de COVs incluyen:

- 1) Aislamiento de los COVs de la fracción no volátil de la materia
- 2) Concentración de los COVs aislados
- 3) Separación analítica de los constituyentes de la fracción volátil
- 4) Identificación y cuantificación de los COVs

Los métodos para determinar COVs pueden separarse en dos amplios grupos. Es posible nombrar los que están basados en la extracción total de los compuestos volátiles de la matriz y los métodos que se basan en la extracción selectiva de la fracción volátil existente en el espacio en cabeza circundante de la muestra. Todos ellos poseen ventajas y desventajas que deberán ser valoradas de acuerdo a los objetivos del análisis.

Por lo general en la mayoría de los casos un perfil de COVs por una determinada técnica rara vez coincide plenamente con el perfil realizado por otra metodología, cada una de ellas brinda diferente información acerca de la cantidad y proporción de los compuestos analizados.

Entre las metodologías de análisis que pueden brindar valiosa información se encuentra **la olfatometría**. Es una antigua técnica que está basada en la apreciación de la intensidad del olor de una muestra juzgada por paneles de individuos (expertos y no entrenados).

Esta técnica no permite la identificación de compuestos o grupos de compuestos, sino que permite aproximar el efecto e intensidad de una mezcla gaseosa sobre la percepción de un individuo. Las unidades referidas a esta determinación son las Unidades de Olor (*Odour Units: OU*), que se plantea como la menor cantidad de moléculas de un analito dispersas en 1 m³ de aire capaz de ser detectada por un individuo. De esta manera puede ser estimada la intensidad del olor de una muestra, pero no deja de ser una determinación subjetiva por parte de los catadores, por lo tanto la reproducibilidad no puede garantizarse en este tipo de metodología. Además los panelistas sufren luego de un determinado tiempo la saturación de los receptores olfativos generando una respuesta distorsionada sobre los materiales valorados.

Sin embargo se utiliza ampliamente porque ofrece información útil que luego puede ser analizada en conjunto con la información obtenida por otras técnicas de análisis donde es posible obtener datos individuales de los COVs de una muestra^[1].

Las primeras metodologías utilizadas para determinar individualmente los componentes volátiles de una muestra corresponden a técnicas que implicaban la destilación y/o extracción con solventes. Aun siguen empleándose pero más específicamente en el análisis de esencias y extractos vegetales. Una de las ventajas que poseen es que por lo general son capaces de extraer en su totalidad toda la fracción volátil de la muestra, aunque en algunos casos pueden extraer también otros componentes de mayor peso molecular de la matriz. Muchos de ellos no poseen características de volatilidad y dependiendo del método de detección empleado, pueden dar origen a artefactos o nuevos compuestos derivados de su descomposición. Otra característica desfavorable suele presentarse cuando se utilizan temperaturas elevadas en el proceso de extracción, donde muchos compuestos no volátiles e incluso algunos volátiles suelen ser térmicamente lábiles, generando diferentes estructuras e isomerizaciones que perjudican el análisis de la fracción volátil.

Además, excepto por la utilización de CO₂ como fluido supercrítico, los solventes utilizados en las extracciones suelen ser líquidos orgánicos inmiscibles en agua, por lo general compuestos clorados, inflamables y tóxicos que generan una corriente de desecho difícil de tratar.

Todos estos inconvenientes han sido superados a lo largo de los años por el constante avance de nuevas metodologías de extracción más simples, económicas, eficientes y con respeto sobre el medio ambiente.

Cromatografía de Gases

El cromatógrafo de gases es el instrumento por excelencia para la determinación de COVs, es extensa la bibliografía que constantemente cita el uso de este equipamiento desde los inicios de la técnica hasta la actualidad^[2, 3]. El principal requerimiento para que un compuesto pueda ser detectado por cromatografía de gases (CG) es que sea volátil, pueda ser separado en la columna cromatográfica y detectado en las condiciones de análisis.

El rango de compuestos que pueden ser analizados contempla los gases permanentes, los volátiles y los semivolátiles. El detector comúnmente utilizado es el Detector de Ionización de Llama (*FID: Flame Ionization Detector*) que genera señales debido a la combustión de los compuestos separados al llegar al detector del equipo.

Otros de los detectores empleados en la CG es el Espectrómetro de Masas (*EM*). Es uno de los detectores más ampliamente utilizados, con niveles de detección similares al *FID*, o incluso con mayor sensibilidad en ciertos modos de adquisición como por ejemplo la monitorización selectiva de iones (*SIM: selected ion monitoring*)^[4]. Además este tipo de detector brinda información adicional acerca del peso molecular, grupos funcionales y la fragmentación típica de los compuestos analizados. Cuando una molécula es expulsada al final de la columna cromatográfica, ingresa en una cámara de alto vacío donde es impactada por un haz de electrones de alta energía (cámara de

ionización), formando un radical catión que posteriormente se fragmenta en iones más pequeños con diferente relación masa/carga (m/z , siendo por lo general $z=1$ para moléculas pequeñas). Luego estos fragmentos dependiendo de su estabilidad y abundancia definen un espectro de masas particular para cada molécula ionizada.

Una de las mayores ventajas que ofrece la espectrometría de masas, sobre todo por ionización por impacto electrónico (EI: *electronic impact*), es la generación de librerías de compuestos. Por ejemplo, un determinado analito si es sometido al proceso de ionización en similares condiciones generará un patrón reproducible de fragmentación. Esta propiedad es la que se utiliza para identificar una señal mediante la comparación de su perfil de fragmentación con las bases de datos disponibles^[5].

Existen diversos arreglos en los detectores de masas, pero los más utilizados son los de cuadrupolo y trampa de iones (IT: *ion trap*). Este último tiene la ventaja de retener y concentrar iones aumentando la sensibilidad y selectividad frente al detector cuadrupolar. En la Figura 2 se esquematiza el diseño de un detector de trampa de iones de un espectrómetro de masas.

En los últimos años ha incrementado el uso de detectores de mayor complejidad como el detector de tiempo de vuelo (TOF: *time of flight*)^[6], triple cuadrupolo (QqQ)^[7], Transformada de Fourier de resonancia del ion ciclotrón (ICR-FT)^[8] y otras geometrías para estudios de COVs y moléculas de mayor peso molecular.

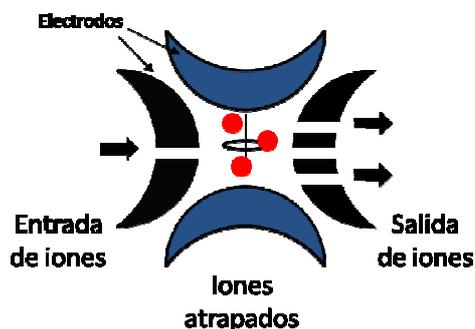


Figura 2. Diseño de detector de trampa de iones.

Otra metodología acoplada a la CG es la detección por olfatometría (CG-O). En el extremo terminal de la columna cromatográfica se encuentra una bifurcación donde un determinado analito separado previamente es detectado en forma simultánea por dos detectores. Uno de ellos corresponde a un FID o EM, mientras que el otro es un dispositivo donde un operador introduce su nariz en el puerto olfatométrico (*sniffing port*) y es capaz de determinar sensorialmente cada analito de forma individual. En la Figura 3 se esquematiza un equipo con detector de olfatometría. La determinación en el dispositivo contiene una medida de la magnitud y la descripción del tipo de olor percibido, conocido como olfatograma. Por otra parte una de las controversias sobre esta metodología plantea la diferencia entre una señal integrada como área bajo la curva y la intensidad medida por el olfato humano ya que estos eventos no necesariamente mantienen una relación lineal para determinados COVs^[9].

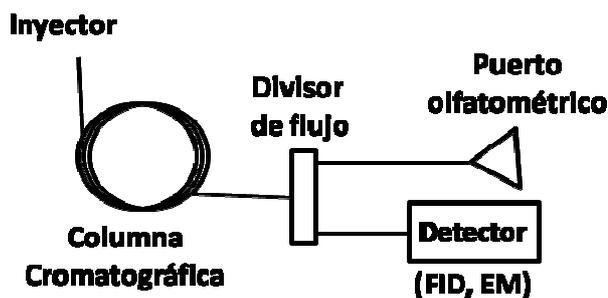


Figura 3. Esquema de cromatógrafo de gases con detector olfatométrico

Técnicas de Análisis del Espacio en Cabeza (*Headspace Analysis*)

La técnica de análisis del espacio en cabeza (HS: *Headspace*) consiste en la determinación de los compuestos volátiles que son capaces de ser desprendidos de la muestra sin el agregado de ningún tipo de aditivo ni solvente. Esta técnica solo se limita al análisis de los compuestos que cumplen con este requisito en base a sus propiedades fisicoquímicas.

Existen dos tipos de variantes para el análisis de espacio en cabeza, el estático (o de equilibrio) y el dinámico (purga y trampa). En el espacio en cabeza estático, la muestra es colocada en un vial cerrado hasta que se logra el equilibrio de los analitos volátiles entre el espacio en cabeza y la muestra líquida o sólida. Posteriormente se toma una porción o la totalidad del aire del vial y se inyecta en el equipo de análisis, normalmente un cromatógrafo de gases. Las ventajas de esta versión de la técnica consisten en la capacidad de extraer la totalidad de los COVs, la necesidad de no utilizar solventes orgánicos, una simple preparación de muestras y un bajo costo por análisis.

La versión de espacio en cabeza de tipo dinámico o purga y trampa, posee la diferencia de que un gas inerte (N_2 o He) se hace pasar por la muestra termostatazada para favorecer la salida de los compuestos volátiles hacia el espacio en cabeza. Los niveles de detección en esta variante de la técnica pueden mejorarse utilizando ciclos de extracción sobre un mismo vial de muestra y el uso de trampas con material sorbente o de tipo criogénicas.

Los inconvenientes que presenta esta derivación del análisis en espacio en cabeza son el tipo de instrumentación requerida que suele ser más complejo y costoso, la posible desnaturalización de analitos durante la desorción de la trampa utilizando elevadas temperaturas, la minuciosa estandarización de los parámetros analíticos para fines cuantitativos y problemas de efecto memoria por una baja eficiencia en el purgado de la trampa. Otra de las desventajas es la introducción de trazas de vapor de agua y oxígeno en los equipos de análisis durante el proceso de inyección, siendo conocido que los mismos pueden reaccionar con la fase de las columnas capilares disminuyendo sistemáticamente la vida útil y afectando la calidad de los ensayos.

Sin embargo el análisis de espacio en cabeza fundamentalmente la versión de tipo dinámico sigue siendo una de las técnicas más empleadas para el estudio de los COVs en la actualidad^[10].

Técnicas de Microextracción

El análisis de compuestos volátiles por medio de técnicas de extracción a menor escala es una de las variantes que más han sido utilizadas en los últimos años^[11]. Este tipo de metodologías han mostrado ciertas características ventajosas que las han colocado entre las más empleadas. Entre las ventajas puede remarcarse una gran sensibilidad, sencillez, inexistente o bajo volumen de solvente orgánico empleado, mínimo pre-tratamiento de la muestra, automatización y capacidad de medir muestras sólidas, líquidas o gaseosas.

Algunas de las técnicas de microextracción más utilizadas son microextracción en fase sólida (*Solid Phase Microextraction: SPME*), extracción mediante agitador con sorción (*Stir-bar sorptive extraction: SBSE*) y microextracción en fase líquida (*Liquid Phase Microextraction: LPME*).

Las dos primeras metodologías están basadas en las capacidades de sorción de una matriz sólida en contacto con la muestra, mientras que la otra técnica está basada en el principio de distribución de los analitos en la fase de extracción (solvente orgánico) y la fase original donde están contenidos.

En cuanto a las técnicas que involucran una fase sólida, la extracción mediante agitador con sorción (*SBSE*) ha encontrado muchas aplicaciones importantes desde su aparición en 1999 comercializada con el nombre de *Twister*® por la empresa *Gerstel* (Alemania). El principio está basado en un agitador magnético recubierto en su superficie por una fase sólida con capacidad de retener analitos orgánicos apolares disueltos en una muestra acuosa. Inicialmente se ponen en contacto bajo agitación la muestra de interés y el dispositivo sorbente. Luego de un determinado tiempo de extracción se retira el agitador y se coloca en un dispositivo que permite, por medio de temperatura o por un solvente orgánico, desorber y transferir los analitos a un equipo de análisis. Durante el contacto con el agitador sorbente los analitos llegan a un equilibrio entre la cantidad retenida en la superficie del dispositivo y la solución acuosa original. Este proceso depende del coeficiente de partición del soluto entre las fases del sistema. Considerando las características de los analitos y la aplicación esta técnica puede demandar largos tiempos de contacto entre la fase sólida y la matriz para una extracción eficiente.

El avance más novedoso que ofrece *SBSE* está relacionado sobre todo a una gran superficie disponible de sorción, posibilitando un gran poder de enriquecimiento y alcanzando niveles de detección muy bajos. La determinación de compuestos orgánicos a nivel de trazas, como es el caso de pesticidas en matrices vegetales, es una de las aplicaciones más empleadas mediante esta técnica^[12].

Entre las desventajas que pueden nombrarse se destacan los largos tiempos de extracción (en la mayoría de casos superiores a los 60 minutos) necesarios para alcanzar buenos niveles de sensibilidad, la poca variación en las fases sorbentes disponibles comercialmente y la obligación de adquirir un módulo adicional para la desorción térmica. Sin embargo la limitación más importante que tiene es la imposibilidad de utilizarse sobre matrices sólidas, necesariamente la matriz debe estar disuelta en algún medio líquido para obtener buenos resultados^[13].

Microextracción en Fase Sólida

Otra técnica basada en el mismo principio de extracción es la microextracción en fase sólida (SPME), en este caso los compuestos orgánicos sufren la absorción o adsorción, dependiendo de la fase, sobre una pequeña matriz sólida modificada y una posterior desorción por medio de temperatura o solventes al inyectarse en un equipo de análisis. A principios de la década del 90, Pawliszyn^[14] y colaboradores desarrollaron la metodología utilizando un proceso similar al actual, cuando intentaban transferir compuestos orgánicos retenidos en la superficie de fibras ópticas dentro del inyector de un cromatógrafo de gases.

El primer diseño fue sobre la base de una microjeringa, donde el émbolo fue sustituido por una fibra de sílice fundida de diámetro pequeño que en uno de los extremos estaba recubierta por una fina capa de material sorbente. El primer material polimérico utilizado para retener los compuestos orgánicos fue polidimetilsiloxano (PDMS), químicamente inerte, con gran eficiencia para retener compuestos hidrofóbicos y capaz de soportar elevadas temperaturas que normalmente son utilizadas en los inyectores de los cromatógrafos gaseosos.

La posibilidad de montar el dispositivo sobre una jeringa modificada (Figura 4) le permitió resguardar la frágil fibra de sílice dentro de la aguja metálica, siendo esta la que soporta fuerzas mecánicas y capaz de atravesar septas para poner en contacto el material sorbente con la muestra de interés.

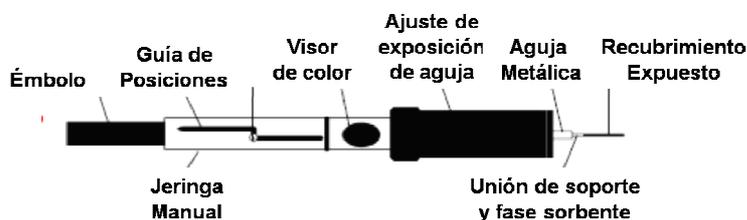


Figura 4. Jeringa de SPME manual

Inicialmente se utilizó en circunstancias donde la fibra tenía contacto directo con la muestra (*DI-SPME*), que normalmente eran medios acuosos que contenían disueltos compuestos orgánicos. Pero a medida que la técnica se diversificó al análisis de matrices más complejas surgió la necesidad de implementar su uso en el espacio en cabeza (*Headspace Solid Phase Microextraction: HS-SPME*)^[15]. En la Figura 5 se esquematizan los procesos de microextracción directa y en espacio en cabeza.

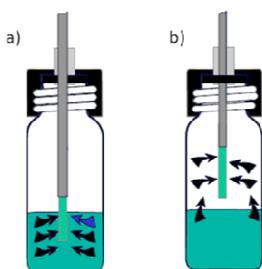


Figura 5. Esquematización del proceso de SPME a) directa b) en espacio en cabeza

Las aplicaciones que han surgido utilizando *SPME* desde su aparición contemplan la determinación de compuestos orgánicos en muestras ambientales, alimentos y fluidos biológicos [16].

El desarrollo de un método basado en *SPME* necesita diversos parámetros que es necesario controlar para obtener un resultado cuantitativo con buen desempeño analítico. Todos ellos están relacionados para favorecer la salida de los compuestos orgánicos de la muestra y ser capturados por el polímero sorbente.

Entre los parámetros más importantes se encuentran el recubrimiento de la fibra, temperatura del sistema, tiempo de extracción, agitación de la muestra y las propiedades fisicoquímicas de los analitos y de la matriz.

Como fue mencionado anteriormente la primera fase sorbente utilizada fue polidimetilsiloxano (*PDMS*), con excelentes resultados sobre compuestos apolares. Luego se agregaron diferentes recubrimientos como el poliacrilato (*PA*), más recomendado para extraer compuestos de mayor polaridad.

A partir del año 1993 y comercializado por Supelco (EE.UU.), salieron al mercado una serie de fibras con diferentes recubrimientos que se adaptaban a diferentes usos y aplicaciones[17]. Para la determinación de compuestos provenientes de matrices muy complejas, como alimentos, es muy común el empleo de fibras mixtas que poseen una mezcla definida de exactas proporciones de polímeros sorbentes, como por ejemplo divinilbenceno/carboxen/polidimetilsiloxano (*DVB/CAR/PDMS*), que permiten obtener un perfil de analitos volátiles y semivolátiles en las mismas condiciones de extracción.

En la Tabla 1, se muestran las fibras de *SPME* más utilizadas para la determinación de compuestos volátiles.

Tabla 1. Recubrimientos sorbentes de fibras de *SPME*.

Recubrimiento	Grosor (µm)	Temp Max (°C)	Fases	Color*	Aplicaciones
<i>PDMS</i>	100	280	no ligada	roja	volátiles no polares
<i>PDMS</i>	30	280	no ligada	amarilla	semivolátiles no polares
<i>PDMS</i>	7	340	ligada	verde	semivolátiles no polares de alto peso molecular
<i>PA</i>	85	320	entrecruzada	blanca	volátiles polares
<i>DVB/CAR/PDMS</i>	50/30	270	entrecruzada	gris	volátiles/semivolátiles en general
<i>CAR/PDMS</i>	75	320	entrecruzada	celeste	volátiles a nivel de trazas
<i>PDMS/DVB</i>	60	270	entrecruzada	rosa	volátiles en general (HPLC)
<i>CW/DVB</i>	65	265	entrecruzada	verde claro	volátiles polares

PDMS: polidimetilsiloxano, *PA*: poliacrilato, *DVB*: divinilbenceno, *CAR*: carboxen, *CW*: carbowax. *Cada una de las fibras de *SPME* posee un color particular que permite identificar cada una de las fases que componen el recubrimiento.

Las fibras disponibles actualmente pueden interactuar de diferente manera con los analitos de la muestra. En base al polímero que posee el recubrimiento pueden ocurrir dos fenómenos diferentes, la absorción o la adsorción (Figura 7 y Tabla 2).

En el caso de que el soluto interactuere sobre la superficie de la fase sorbente el evento correspondiente es la absorción, donde las fibras presentan una gran capacidad y los analitos no compiten por los sitios disponibles. En cambio cuando el fenómeno de la adsorción tiene lugar, los solutos se encuentran físicamente atrapados dentro de la estructura porosa del material. En este caso, los analitos si compiten por los sitios activos de adsorción y la fibra presenta un límite en la cantidad de COVs que puede extraer.

Tabla 2. Interacción de los COVs con la fase sorbente

Fase	Interacción	Color de la fibra
PDMS	Absorción	roja
PA	Absorción	blanca
DVB/CAR/PDMS	Adsorción	gris
CAR/PDMS	Adsorción	celeste
PDMS/DVB	Adsorción	rosa
CW/DVB	Adsorción	verde claro

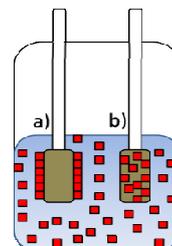


Figura 7. Esquematación de los procesos de a) absorción y b) adsorción en SPME

Principios de la extracción mediante la técnica de Microextracción en Fase Sólida

La técnica de *SPME* tiene como base un sistema de equilibrio, donde los analitos volátiles se distribuyen entre diferentes fases que componen el sistema a ensayar. Al exponer la fase sorbente con la muestra comienza un proceso de transferencia de masa desde la muestra hacia la fase de extracción, si el tiempo de exposición es lo suficientemente extenso se establece una condición de equilibrio. En esta circunstancia la transferencia de masa entre fases no es significativa, por lo cual no hay un aumento en la acumulación de los analitos extraídos a tiempos mayores.

La cantidad de analito extraído en tiempos de equilibrio es considerada proporcional a la concentración presente en la muestra mediante la siguiente ecuación:

$$\text{---} \quad (1)$$

n es la cantidad de moles de analito retenida por la fibra, K_1 es el coeficiente de partición del analito entre la fase de la fibra y la muestra, V_1 es el volumen de la fibra, V_2 volumen de la muestra y C_0 es la concentración inicial del analito en la muestra.

En el caso de la variante de *SPME* sobre el espacio en cabeza, los analitos deben migrar desde la matriz de la muestra hacia el aire para encontrar la fase polimérica sorbente. Una de las ventajas que denota esta variación es sobre el cuidado de la fibra, ya que moléculas de alto peso molecular no volátiles (ácidos húmicos, proteínas) pueden quedar retenidas y dañar la superficie o generar artefactos en los cromatogramas al entrar en contacto con altas temperaturas. Además permite el agregado de aditivos sobre la matriz que favorezcan la salida de los COVs, como por ejemplo cambios en el pH o fuerza iónica.

El sistema está conformado por una nueva fase y volumen, el espacio en cabeza, por lo cual deben agregarse nuevos términos para relacionar la cantidad de masa extraída a tiempos de equilibrio con la concentración inicial en el nuevo sistema. La siguiente ecuación permite relacionar los términos.

$$n = \frac{K_1 K_2 V_1 V_2 C_0}{K_1 K_2 V_1 + K_2 V_3 + V_2} \quad (2)$$

n es la cantidad de moles de analito retenida por la fibra, K_1 es el coeficiente de partición del analito entre la fase de la fibra y la fase vapor, K_2 es el coeficiente de partición entre la fase vapor y la muestra, V_1 es el volumen de la fibra, V_2 volumen de la muestra, C_0 es la concentración inicial del analito en la muestra y V_3 es el volumen del espacio en cabeza.

La cinética de extracción en el espacio en cabeza está limitada por la velocidad de transferencia de masa desde la muestra hacia el espacio en cabeza, ya que los coeficientes de difusión de los analitos volátiles en aire son aproximadamente 4 órdenes de magnitud mayores que en medio líquido. Es por eso que a un determinado tiempo fijo la condición de equilibrio está más próxima a alcanzarse en el espacio en cabeza que bajo inmersión en una fase acuosa.

La temperatura tiene un efecto muy significativo sobre la cinética del proceso, el aumento de la misma incrementará la presión de vapor de los COVs forzando a distribuirse en mayor proporción en la fase aérea.

La agitación de la muestra también tiene un efecto similar a la temperatura. Un equilibrio entre la fase acuosa y la fase vapor puede lograrse más rápidamente cuando se incorpora una agitación vigorosa y constante, debido a que se genera permanentemente una nueva interfase agua-aire producto de la disrupción de la superficie estática facilitando la salida de los COVs al espacio en cabeza. El efecto de la temperatura y la agitación, sumado a una correcta elección de la fase sorbente producen un notable incremento en la captación de los COVs en tiempos cortos de exposición^[18].

En 2013 Yang publicó una recopilación de trabajos basados en técnicas de microextracción sobre matrices vegetales contemplando los últimos 5 años, donde *SPME* tiene 10 veces más de publicaciones que otras técnicas similares. De esta manera es posible dimensionar la utilización de la técnica de *SPME* como una de las empleadas por las enormes ventajas que ofrece respecto de otras metodologías^[11].

Algunas de las ventajas que es posible asociar a esta técnica son:

- Simplicidad de uso.
- Enorme versatilidad de aplicaciones analíticas.
- Bajo costo por análisis.
- Cortos tiempos de preparación de muestras.
- Procesos de extracción, concentración e inyección en un solo paso.
- Mínima o nula cantidad de solventes orgánicos utilizados.
- Gran capacidad de concentración de COVs en pequeños volúmenes de fase de extracción.

- Capacidad de extracción selectiva de COVs.
- Transferencia total de analitos extraídos.
- Automatización y adaptabilidad a diferentes equipos de análisis.
- Excelente sensibilidad con niveles de detección del orden de ppb y ppt.

Recientes trabajos de investigación sobre COVs derivados de matrices vegetales han aportado excelentes antecedentes donde el uso de la técnica de *SPME* ha permitido la determinación sencilla de una gran cantidad de analitos volátiles con un excelente desempeño analítico.

Song en 1998, desarrolló una breve técnica para una rápida adquisición de perfiles de volátiles en frutillas y tomates utilizando *SPME* acoplado a *GC-MS-TOF* comparando el desempeño con la metodología de Análisis de Espacio en Cabeza Dinámico (Purga y Trampa)^[19]. Por otro lado Bezman en 2003, ha buscado interpretar las diferentes modificaciones que pueden realizarse sobre la matriz de tomate para lograr un buen perfil de COVs mediante la extracción con *SPME*^[20]. Más recientemente Zanor en 2009, utilizó la metodología para obtener un amplio perfil de analitos volátiles de tomate intentando correlacionarlos con un perfil de compuestos no volátiles pertenecientes al metabolismo central de la especie^[21]. Mientras que Kovacs en una estrategia similar generó perfiles de COVs por *HS-SPME* de tomates con mutaciones que afectaban la maduración del fruto observando una correlación entre determinados metabolitos volátiles que de forma indirecta sufrían variaciones dependientes del proceso de maduración ^[22].

En la bibliografía pueden encontrarse numerosos antecedentes que involucran la metodología con el estudio del tomate, esto permite obtener un sólido marco de referencia para llevar a cabo investigaciones centradas en este importante fruto.

Las ventajas expuestas de la técnica de *SPME* respecto de la simplicidad de su uso, la posibilidad de automatizar el proceso, sumado a la complejidad de la matriz de análisis y los antecedentes encontrados sobre la determinación de COVs en productos vegetales han consolidado la elección de la metodología de Microextracción en Fase Sólida en su versión de espacio en cabeza por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (desde ahora citado como *HS-SPME-GC/MS*) para llevar a cabo los objetivos del presente trabajo de investigación.

Referencias

- [1] **Biniecka M, Caroli S.** Analytical methods for the quantification of volatile aromatic compounds. *TrAC* 2011, 30:1756-1770.
- [2] **Ray NH.** Gas Chromatography. *Nature*, 1957, 180:403-405.
- [3] **Carter GT.** NP/MS since 1970: from the basement to the bench top. *Nat. Prod. Rep.*, 2014, 31:711-717.
- [4] **Skoog D, Holler J, Crouch S:** *Principios de Análisis Instrumental*. 6ta. edn. Méjico D.F. Méjico: Cengage Learning; 2008.
- [5] **Dickschat JS.** Capturing volatile natural products by mass spectrometry. *Nat. Prod. Rep.*, 2014, 31:838-861.
- [6] **Song J, Gardner BD, Holland JF, Beaudry RM.** Rapid Analysis of Volatile Flavor Compounds in Apple Fruit Using SPME and GC/Time-of-Flight Mass Spectrometry. *J. Agr. Food Chem.*, 1997, 45:1801-1807.
- [7] **Zhang Y, Wang X, Li L, Li W, Zhang F, Du T, Chu X.** Simultaneous determination of 23 flavor additives in tobacco products using gas chromatography–triple quadrupole mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 2013, 1306:72-79.
- [8] **Gugeon RD, Lucio M, Frommberger M, Peyron D, Chassagne D, Alexandre H, Feuillat F, Voilley A, Cayot P, Gebefügi I, et al.** The chemodiversity of wines can reveal a metabo-geography expression of cooperage oak wood. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2009, 106:9174-9179.
- [9] **d’Acampora Zellner B, Dugo P, Dugo G, Mondello L.** Gas chromatography–olfactometry in food flavour analysis. *J. Chromatogr. A*, 2008, 1186:123-143.
- [10] **Bicchi C, Cordero C, Liberto E, Sgorbini B, Rubiolo P.** Headspace sampling of the volatile fraction of vegetable matrices. *J. Chromatogr. A*, 2008, 1184:220-233.
- [11] **Yang C, Wang J, Li D.** Microextraction techniques for the determination of volatile and semivolatile organic compounds from plants: a review. *Anal. Chim. Acta*, 2013, 799:8-22.
- [12] **Sasamoto K, Ochiai N, Kanda H.** Dual low thermal mass gas chromatography–mass spectrometry for fast dual-column separation of pesticides in complex sample. *Talanta*, 2007, 72:1637-1643.
- [13] **Sánchez-Rojas F, Bosch-Ojeda C, Cano-Pavón J.** A Review of Stir Bar Sorptive Extraction. *Chromatographia*, 2009, 69:79-94.
- [14] **Arthur CL, Pawliszyn J.** Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. *Anal. Chem.*, 1990, 62:2145-2148.
- [15] **Zhang Z, Pawliszyn J.** Headspace solid-phase microextraction. *Anal. Chem.*, 1993, 65:1843-1852.
- [16] **Vas G, Vékey K.** Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *J. Mass Spectrom.*, 2004, 39:233-254.
- [17] [<http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/sample-preparation/spme.html>]
- [18] **Lord H, Pawliszyn J.** Evolution of solid-phase microextraction technology. *J. Chromatogr. A*, 2000, 885:153-193.
- [19] **Song J, Fan L, Beaudry RM.** Application of Solid Phase Microextraction and Gas Chromatography/Time-of-Flight Mass Spectrometry for Rapid Analysis of Flavor Volatiles in Tomato and Strawberry Fruits. *J. Agr. Food Chem.*, 1998, 46:3721-3726.
- [20] **Bezman Y, Mayer F, Takeoka GR, Buttery RG, Ben-Oliel G, Rabinowitch HD, Naim M.** Differential Effects of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) Matrix on the Volatility of Important Aroma Compounds. *J. Agr. Food Chem.*, 2003, 51:722-726.
- [21] **Zanor MI, Rambla J-L, Chaïb J, Steppa A, Medina A, Granell A, Fernie AR, Causse M.** Metabolic characterization of loci affecting sensory attributes in tomato allows an

- assessment of the influence of the levels of primary metabolites and volatile organic contents. *J. Exp. Bot.*, 2009, 60:2139-2154.
- [22] **Kovács K, Fray RG, Tikunov Y, Graham N, Bradley G, Seymour GB, Bovy AG, Grierson D.** Effect of tomato pleiotropic ripening mutations on flavour volatile biosynthesis. *Phytochemistry*, 2009, 70:1003-1008.

Capítulo II

Materiales y Métodos

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de las plantas de tomate

Las semillas de los cultivares elegidos para el trabajo de investigación fueron obtenidas del Banco de Germoplasma de la Estación Experimental de La Consulta del Instituto de Tecnología Agropecuaria (INTA) en La Consulta, Mendoza, Argentina.

Las plantas de tomates fueron cultivadas en el Campo Experimental del Instituto de Horticultura de la Facultad de Ciencias Agrarias dependiente de la Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina (32°50'S, 68°52'O, a 900 metros sobre el nivel mar). Inicialmente se sembraron las semillas en pequeñas macetas hasta el desarrollo de hojas en la planta, luego fueron trasplantadas a tierra en una parcela homogénea conservando un diseño aleatorio de un mismo genotipo en diferentes sectores de la parcela. De esta manera los frutos obtenidos de las plantas estuvieron distribuidos en diferentes sectores, cubriendo en mayor medida diferentes efectos ambientales naturales del sitio de cultivo.

El horario de cosecha fue estrictamente conservado, debido a los posibles cambios en el metabolismo de los frutos y plantas por la incidencia de la luz ambiental. El horario efectivo de cosecha fue desde las 10:00 a.m. hasta las 16:00 p.m.

El cosechado fue realizado de forma manual, priorizando los frutos que poseían una madurez similar de un determinado estrato de la planta. Se obtuvo entre 3 y 6 frutos provenientes de distintas plantas de un mismo genotipo ubicadas en diferentes sectores de la parcela^[1]. De esta manera cada fruto fue considerado como una repetición biológica y analítica de un mismo cultivar.

Los frutos cosechados se trasladaron en hielo por una corta distancia hacia el laboratorio, donde se enjuagaron con agua, se retiró el pedúnculo de los frutos y fueron trozados groseramente, inmediatamente fueron congelados con nitrógeno líquido y conservados en freezer de -80°C en cajas individuales plásticas hasta el procesamiento de los mismos^[2].

Este ensayo fue realizado en la campaña 2008-2009, 2009-2010 y 2011-2012. La fecha de cosecha de los frutos se realizó durante los meses de febrero o marzo dependiendo de la madurez fisiológica de los frutos en los distintos años de ensayo.

Procesamiento de la muestra

Los frutos congelados que se encontraban en grandes trozos fueron procesados en un molinillo eléctrico a bajas temperaturas. Este fue enfriado con nitrógeno líquido en el momento de la molienda para evitar que las muestras se descongelaran. De esta forma se obtenía una muestra finamente molida que se guardó en tubos plásticos de polipropileno a -80°C.

Cultivares de Tomates

En los tres años de cosecha, se colectaron frutos maduros de diferentes cultivares que poseían diferencias de tipo morfológico (tipo cherry, peritas y redondos), color (rojo, amarillo, naranja y morado), y metabólico pertenecientes a diversos genotipos emparentados con la especie comestible *S. lycopersicum*. Además se colectaron frutos maduros de la especie *S. pimpinellifolium*, una especie silvestre de tomate relacionada con la especie comestible.

Cosecha 2009

En la primera cosecha realizada en los primeros días de marzo de 2009 se tomaron frutos maduros de 11 variedades de la especie comestible y de la especie silvestre *S. pimpinellifolium* (LA1589). En la Tabla 1 se muestran las diferentes variedades de tomates que se consideraron para el análisis de COVs. El análisis de datos sensoriales no fue realizado sobre las muestras LA1589, 3842 y 565.

Tabla 1: Cultivares de la Cosecha 2009.

Nº	Cultivar	Código	Especie	Tipo
1	LA1589	LA1589	<i>S. pimpinellifolium</i>	Cherry
2	CMP	CMP	<i>S. lycopersicum</i>	Cherry
3	C526	572	<i>S. lycopersicum</i>	Cherry
4	C369	569	<i>S. lycopersicum</i>	Perita
5	ALGR	3806	<i>S. lycopersicum</i>	Perita
6	C237	557	<i>S. lycopersicum</i>	Perita
7	C169	552	<i>S. lycopersicum</i>	Perita
8	C525	571	<i>S. lycopersicum</i>	Perita
9	M82	M82	<i>S. lycopersicum</i>	Perita
10	GPEA	GPEA	<i>S. lycopersicum</i>	Redondo
11	TOPA	3842	<i>S. lycopersicum</i>	Redondo
12	C352	565	<i>S. lycopersicum</i>	Redondo

Cosecha 2010

La segunda cosecha tuvo lugar en el mismo sitio de cultivo que la cosecha 2009. Durante la cosecha se colectaron 11 variedades diferentes de la especie comestible *S. lycopersicum* y también frutos de la especie silvestre *S. pimpinellifolium*. En este caso se agregaron algunas variedades de interés como BIGUA. Una variedad con frutos de tipo redondo considerado de *larga vida en góndola*, que posee la capacidad de mantener la firmeza de sus frutos por mayor tiempo, pero carece de las cualidades organolépticas esperadas en un fruto de tomate. Esta variedad debido a la baja aceptabilidad de sus frutos fue denominada como un cultivar de baja calidad.

Todos los genotipos colectados en esta cosecha, incluyendo el cultivar silvestre, fueron sometidos al panel de jueces para su análisis sensorial. En la Tabla 2 se muestran los cultivares analizados en la cosecha 2010.

Tabla 2. Cultivares de la Cosecha 2010.

N°	Cultivar	Código	Especie	Tipo
1	LA1589	LA1589	<i>S. pimpinellifolium</i>	Cherry
2	CMP	CMP	<i>S. lycopersicum</i>	Cherry
3	CheAmRed	CheAmRed	<i>S. lycopersicum</i>	Cherry
4	CheAmPer	CheAmPer	<i>S. lycopersicum</i>	Cherry
5	CheRedRoj	CheRedRoj	<i>S. lycopersicum</i>	Cherry
6	ALGR	3806	<i>S. lycopersicum</i>	Perita
7	C369	569	<i>S. lycopersicum</i>	Perita
8	C525	571	<i>S. lycopersicum</i>	Perita
9	PLAT	3836	<i>S. lycopersicum</i>	Redondo
10	CARC	3812	<i>S. lycopersicum</i>	Redondo
11	BIGUA	BIGUA	<i>S. lycopersicum</i>	Redondo
12	ELPIDA	ELPIDA	<i>S. lycopersicum</i>	Redondo

Cosecha 2012

La última cosecha analizada correspondió al año 2012, que tuvo lugar en el mismo sitio que las anteriores. En esta ocasión se colectaron frutos de 13 variedades diferentes de la especie *S. lycopersicum* y también de *S. pimpinellifolium*, conformando un total de 14 muestras de tomate diferentes. El análisis sensorial abarcó la totalidad de los frutos colectados. En la Tabla 3 se muestran los cultivares considerados en el análisis de la cosecha 2012.

Tabla 3. Cultivares de la Cosecha 2012.

N°	Cultivar	Código	Especie	Tipo
1	LA1589	LA1589	<i>S. pimpinellifolium</i>	Cherry
2	C526	572	<i>S. lycopersicum</i>	Cherry
3	CHPM	3815	<i>S. lycopersicum</i>	Cherry
4	C169	552	<i>S. lycopersicum</i>	Perita
5	C359	715	<i>S. lycopersicum</i>	Perita
6	C183	553	<i>S. lycopersicum</i>	Perita
7	C369	569	<i>S. lycopersicum</i>	Perita
8	C525	571	<i>S. lycopersicum</i>	Perita
9	M82	M82	<i>S. lycopersicum</i>	Perita
10	CZB	3819	<i>S. lycopersicum</i>	Redondo
11	PLAT	3836	<i>S. lycopersicum</i>	Redondo
12	PRIE	3837	<i>S. lycopersicum</i>	Redondo
13	BIGUA	BIGUA	<i>S. lycopersicum</i>	Redondo
14	EIPIDA	ELPIDA	<i>S. lycopersicum</i>	Redondo

Determinación de metabolitos volátiles del fruto del tomate por HS-SPME-GC/MS

Preparación de las muestras de frutos de tomate

El análisis de metabolitos volátiles de los frutos fue realizado con 1g de muestra molida congelada. Se pesó una cantidad cercana a un gramo en un vial de vidrio con tapa hermética a rosca de 10 mL. Se colocó en un baño de agua a 30°C durante 10 min. Luego se agregó 1 mL de solución EDTA/NaOH 100mM con un pH=7. Posteriormente se adicionó 2,2 g de CaCl₂, se homogeneizó con una varilla de vidrio y se agregó 15 µL de solución estándar de 2-metilciclohexanona de concentración 23 mg L⁻¹ (ppm) en metanol.

Una vez agregados todos los reactivos necesarios, se introdujo en un baño sonicador durante 15 min. Luego se tomó 1 mL de la porción del sobrenadante y se introdujo en otro vial de vidrio limpio con tapa a rosca hermética para efectuar la determinación de compuestos volátiles de la muestra^[3].

Análisis de compuestos orgánicos volátiles de frutos de tomate

El análisis de metabolitos volátiles fue realizado en un cromatógrafo de gases GC Varian 3800 acoplado a un detector de masas de trampa de iones Varian Saturn 2000. El proceso de extracción e inyección con SPME fue realizado en forma automática por un automuestreador Varian Combi PAL instalado en el equipo de análisis.

Los viales conteniendo las muestras de sobrenadante, primeramente fueron incubados a 50 °C durante 10 min con una agitación enérgica (500 RPM) para equilibrar térmicamente la muestra. Luego se llevó a cabo el proceso de extracción empleando una fibra de SPME de DVB/CAR/PDMS 50/30 µm de 1 cm de largo (fibra gris). Para la extracción, la fibra fue colocada en el espacio de cabeza del vial durante 35 min a 50 °C con suave agitación constante (350 RPM). Luego de la extracción la fibra fue introducida en el inyector del equipo durante un minuto para que la muestra se desorba en forma completa (*splitless*).

Para evitar cualquier problema de contaminación entre muestras, luego de realizar una inyección la fibra fue purgada durante 5 min a 250 °C con un flujo constante de nitrógeno en el módulo de purga (*bake out*) del equipo.

El cromatógrafo de gases operó con una temperatura de inyector de 250°C en forma constante. El flujo en columna fue de 1 mL min⁻¹ de forma constante. La columna cromatográfica utilizada fue una columna capilar Varian VF5-ms de 30 m x 0,25 mm diámetro interno x 0,25 µm de espesor de film.

El programa de temperatura del horno del cromatógrafo de gases fue optimizado debido a la gran cantidad de señales que pudieron adquirirse en las condiciones de análisis. En ciertas zonas del cromatograma podía observarse el

solapamiento de señales dificultando la identificación de los metabolitos extraídos. Utilizando ajustes y gradientes de temperatura fue posible separar algunas señales de interés en las zonas de co-elución del cromatograma.

El programa de temperatura optimizado del horno del cromatógrafo de gases se encuentra resumido en la Tabla 4.

Tabla 4: Programa de temperatura del horno del cromatógrafo de gases.

Temperatura (°C)	Velocidad (°C min ⁻¹)	Tiempo (min)	Tiempo Total (min)
35	0	5	5
45	3	0	8.33
50	1.5	1.5	13.17
68	3	2	21.17
131	3	1	43.17
250	10	2.93	58

La temperatura de la línea de transferencia fue de 250 °C, la trampa de iones de 100 °C y el *manifold* de 80 °C. El rango de masas adquirido por el equipo fue de 30-300 masa/carga (m/z), generado por ionización de impacto electrónico (EI) a 70 eV. El cromatograma fue obtenido en modo FULL SCAN (FS), barriendo las masas asignadas en el programa del equipo.

Sin embargo, a pesar de los intentos de mejorar la separación de las señales de los COVs extraídos, aun podía identificarse zonas de coelución en los cromatogramas.

Considerando las ventajas de la espectrometría de masas (EM) capaz de generar un perfil de fragmentación típico de cada compuesto analizado, fue posible asignar una relación m/z que permitió inequívocamente identificar cada uno de los compuestos que conforman las señales de interés.

Esta herramienta derivada del uso de la EM es conocida como Cromatograma de Ión Extraído (*EIC: Extracted Ion Chromatogram*)^[4]. El empleo de esta técnica, permitió la identificación y seguimiento de los COVs de interés mediante una m/z característica y un tiempo de retención (TR) definido a lo largo de todos los análisis realizados^[5, 6].

Mediante la implementación de *EIC* en las muestras de interés fue posible caracterizar 101 señales de interés. Entre las señales determinadas se encuentran algunos COVs que no ha podido ser identificados y fueron designados como UNK seguido de su relación m/z más característica, como por ejemplo UNK m/z 43.

En la Tabla 5 se muestran todas las señales de interés y sus iones característicos determinados en los análisis de COVs de tomates.

Tabla 5: Metabolitos Volátiles extraídos por HS-SPME-GC/MS

N°	TR	Nombre	Nombre corto	CAS	m/z	Código
-	17.294	2-metilciclohexanona	2mCICLOHEX	583-60-8	112	Sti
1	2.753	2-metilfurano	2mFURAN	534-22-5	82	M1
2	2.768	UNK m/z 43	UNK43		43	M2
3	3.571	3-metilbutanal	3mBUTAL	590-86-3	58	M3
4	3.996	1-penten-3-ona	1PENT3ONA	1577-03-3	55	M4
5	4.266	2-etil-furano	2eFURAN	3208-16-0	96	M5
6	4.947	metil butanoato	mBUTNATO	623-42-7	74	M6
7	5.691	3-metil-1-butanol	3mBUTOL	123-51-3	55	M7

Nº	TR	Nombre	Nombre corto	CAS	m/z	Código
8	6.065	UNK m/z 55	UNK55		55	M8
9	6.192	1,4-pentadieno	14PENTDIEN	591-93-5	68	M9
10	6.306	4-pentenal	4PENTENAL	2100-17-6	83	M10
11	6.514	tolueno	TOLUEN	108-88-3	91	M11
12	7.325	<i>cis</i> -3-hexenal	C3HEXENAL	6789-80-3	69	M12
13	7.406	hexanal	HEXANAL	66-25-1	56	M13
14	10.674	<i>cis</i> -2-hexenal	C2HEXENAL	16635-54-4	55	M14
15	11.258	<i>trans</i> -2-hexenal	T2HEXENAL	6728-26-3	55	M15
16	14.255	heptanal	HEPTANAL	111-77-7	70	M16
17	14.398	1-nitropentano	NITRPENTAN	628-05-7	55	M17
18	15.037	α -pineno	α PINENE	7785-70-8	93	M18
19	15.753	limoneno óxido	LIMONENOXI	203719-54-4	67	M19
20	15.800	UNK m/z 83	UNK83		83	M20
21	16.334	<i>p</i> -metoxitolueno	pmtoxTOLUEN	3494-45-9	122	M21
22	16.800	UNK m/z 93-1	UNK93-1		93	M22
23	17.700	UNK m/z 93-2	UNK93-2		93	M23
24	18.277	<i>trans</i> -2-heptenal	T2HEPTENAL	18829-55-5	55	M24
25	18.581	óxido geránico	OXGERAN	7392-19-0	139	M25
26	19.079	benzaldehído	BENZALDEH	100-57-7	105	M26
27	19.216	metil trimetoxi acetato	mtrimtoxACET	598-98-1	75	M27
28	20.009	6-metil-5-hepten-2-ona	MHO	110-93-0	108	M28
29	20.100	2-pentilfurano	2pFURAN	3777-69-3	81	M29
30	20.512	isoterpinoleno	ISOTERPIN	586-63-0	136	M30
31	20.713	UNK m/z 57-1	UNK57-1		57	M31
32	20.853	6-metil-5-hepten-2-ol	MHOL	1569-60-4	69	M32
33	21.192	octanal	OCTANL	124-13-0	81	M33
34	22.353	UNK m/z 105	UNK105		105	M34
35	22.843	limoneno	LIMONEN	138-86-3	68	M35
36	23.362	2-etil-1-hexanol	2eHEXANOL	104-76-7	83	M36
37	23.395	2-isobutiltiazol	2ISBUTIAZOL	18640-74-9	99	M37
38	24.568	2-octenal	2OCTENAL	2548-87-0	83	M38
39	24.800	fenilacetaldehído	PhACETALDEH	122-78-1	91	M39
40	25.832	<i>cis</i> -linalil óxido	<i>cis</i> LINALOX	11063-77-7	59	M40
41	26.697	terpinoleno	TERPINOLEN	586-65-9	136	M41
42	26.813	<i>trans</i> -linalil óxido	<i>trans</i> LINALOX	68780-91-6	59	M42
43	27.276	UNK m/z 58	UNK58		58	M43
44	27.373	2-metil-3-fenil-1-propeno	2m3PhPROPEN	3290-53-7	132	M44
45	27.700	guayacol	GUAYACOL	9009-62-5	124	M45
46	27.956	linalool	LINALOL	78-70-6	93	M46
47	28.296	2-nonen-1-ol	2NONENOL	31502-14-4	67	M47
48	28.524	2-metilacetofenona	2mACETFENON	577-16-2	119	M48
49	29.201	α -isoforona	α ISOFORON	78-59-1	82	M49
50	30.088	2-feniletanol	2PhETANOL	60-12-8	91	M50
51	30.426	alcanfor	ALCANFOR	8031-27-4	95	M51
52	30.587	3-metilheptilacetato	3mHepACET	72218-58-7	43	M52
53	30.864	UNK m/z 120	UNK120		120	M53
54	31.379	bencilnitrilo	BENZNITRIL	100-47-0	117	M54
55	31.857	bencilacetato	BENCACETAT	140-11-4	108	M55
56	32.335	UNK m/z 94	UNK94		94	M56
57	32.754	DMHEX	DMHEX	70786-44-6	137	M57
58	32.904	α -terpineol	α TERPOL	98-55-5	136	M58
59	33.182	decanal	DECANAL	112-31-2	83	M59
60	33.400	salicilato de metilo	SALICMET	119-36-8	152	M60
61	33.415	UNK m/z 119	UNK119		119	M61
62	34.637	<i>p</i> -ment-1-en-9-al	PMENT9AL	29548-14-9	94	M62
63	34.911	dimetilbenzaldehído	dmBENZALDEH	5779-94-2	133	M63
64	33.316	UNK m/z 57-2	UNK57-2		57	M64
65	35.707	β -citral	β CITRAL	5392-40-5	69	M65
66	36.159	carvona	CARVON	99-49-0	82	M66
67	36.641	2-feniletilacetato	2PhEtilACET	103-45-7	104	M67

N°	TR	Nombre	Nombre corto	CAS	m/z	Código
68	36.941	2-decenal	2DECENAL	3913-71-1	70	M68
69	37.239	α -citral	α CITRAL	96680-15-8	69	M69
70	38.238	2-undecanona	2UNDECONA	112-12-9	58	M70
71	38.579	2,4-decadienal	24DECADIENAL	25152-84-5	81	M71
72	38.856	2-undecanol	2UNDECOL	1663-30-1	45	M72
73	39.003	duraldehído	DURALDEH	5779-72-6	147	M73
74	39.373	UNK m/z 57-3	UNK57-3		57	M74
75	39.624	(3E)-4-metil-3-hepten-2-ona	4m3HEPTONA	22319-25-1	111	M75
76	40.570	UNK m/z 95	UNK95		95	M76
77	40.800	eugenol	EUGENOL	97-53-0	164	M77
78	41.337	TRIMCICL	TRIMCICL	16695-72-0	163	M78
79	41.911	UNK m/z 161	UNK161		161	M79
80	42.168	β -damascenona	β DAMASC	23696-85-7	69	M80
81	42.345	2-metil-2-octen-4-ona	2m2OCTNONA	19860-71-0	83	M81
82	42.781	UNK m/z 68	UNK68		68	M82
83	44.071	verdil acetato	VERDILACET	5413-60-5	66	M83
84	44.360	UNK m/z 147	UNK147		147	M84
85	44.923	geranil acetona	GEACETON	689-67-8	43	M85
86	45.297	2,5-ditertbutilbenzoquinona	25DTBQ	2460-77-7	177	M86
87	45.379	lilial	LILIAL	80-54-6	189	M87
88	45.684	UNK m/z 131	UNK131		131	M88
89	45.847	β -ionona	β IONON	14901-07-6	177	M89
90	45.960	β -ionona epóxido	β IONONEPOX	23267-57-4	123	M90
91	46.171	2-dodecanona	2DODECONA	6175-49-1	85	M91
92	46.284	1-fenil-1-propanol	1PhPROPANOL	93-54-9	107	M92
93	46.299	ar-himachalen2-ol	ARHIMA2OL	119660-66-1	203	M93
94	46.766	salicilato de propilo	SALICPROP	607-90-9	120	M94
95	46.864	UNK m/z 115	UNK115		115	M95
96	47.609	salicilato de isoamilo	SALICISOAMIL	87-20-7	120	M96
97	48.189	pseudoionona	PSIONONA	141-10-6	69	M97
98	48.880	β -metilionona	β mIONONA	127-43-5	191	M98
99	49.188	benzofenona	BENZFENON	119-61-9	182	M99
100	49.418	8-pentadecanona	8PENTONA	818-23-5	57	M100
101	50.638	α -hexilcinamaldehído	α HEXCINAMAL	101-86-0	129	M101

sti: 2-metilciclohexanona agregado como estándar interno

N° 25: 2,6,6-trimetoxi-2-viniltetrahidropirano

N° 57: 3,6-dimetil-2,3,3a,4,5,7a-hexahidrobencofurano

N° 78: (1E)-1-(3,5,5-trimetil-2-ciclohexen-1-ilideno)-2-propanona

Por conveniencia cada uno de los metabolitos fue renombrado por un nombre corto y un código para facilitar su manejo en los posteriores análisis.

Análisis de Datos

Las señales de interés fueron procesadas mediante del software Varian MS Workstation versión 6.6 e identificadas mediante la base de datos de espectros de masa NIST 2.0 Mass Spectra Search Program Library. Cada señal fue integrada de acuerdo a la relación masa/carga característica definida para cada compuesto en la Tabla 2 (m/z)^[5]. Cada valor de área integrada luego fue normalizada por el peso exacto de la muestra (alrededor de 1 g) y posteriormente este valor se normalizó con el valor del área integrada del estándar interno, 2-metilciclohexanona utilizando la relación masa/carga= 112. En la ecuación 1 se ejemplifica el proceso de normalización de áreas utilizado.

$$\text{Área Normalizada} = \left[\frac{\left(\frac{\text{Área}_{\text{ion}}}{\text{Peso}} \right)}{\text{Área}_{\text{Si}}} \right] \times 100 \quad (1)$$

Los datos obtenidos de la integración individual de todas las señales de interés y sus áreas normalizadas para cada cosecha fueron ordenados y tabulados como matrices de datos para ser utilizados en los diferentes softwares estadísticos. Las tablas de datos se encuentran en los Anexos Digitales Datos COVs Cosecha 2009-2010-2012.

Análisis Estadísticos

Los datos surgidos de los análisis de COVs de los cultivares en las diferentes cosechas generaron una gran cantidad de información que fue procesada y analizada mediante técnicas de estadísticas multivariadas y redes neuronales artificiales.

Las técnicas de estadística multivariada incluyeron Análisis de Componentes Principales (ACP) y Análisis de Conglomerados (AC) mediante el software estadístico Infostat (Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>).

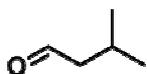
El estudio de redes neuronales fue realizado empleando el paquete de programación de la herramienta omeSOM* (versión 2.27.15, disponible en <http://sourcesinc.sourceforge.net/omesom/>) corriendo bajo el entorno del programa MATLAB (MATLAB 8.0 and Statistics Toolbox 8.1, The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, United States.) [7].

Los análisis de estadística comparativa univariada, gráficas de barras, los análisis de correlación y gráficas de *Heatmap* fueron realizados mediante el uso del programa Infostat, Microsoft Excel (2007), Statistica (StatSoft, Inc. (2007). STATISTICA: data analysis software system, version 8.0. www.statsoft.com) y Plotly en línea (<https://plot.ly/>)

Estructuras de los Compuestos Orgánicos Volátiles Determinados en los Frutos de Tomate



M1: 2-metilfurano



M3: 3-metilbutanal



M4: 1-penten-3-ona



M5: 2-etilfurano



M6: butanoato de metilo



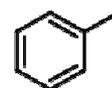
M7: 3-metil-1-butanol



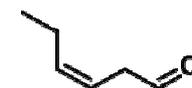
M9: 1,4-pentadieno



M10: 4-pentenal



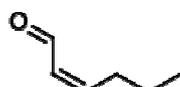
M11: tolueno



M12: *cis*-3-hexenal



M13: hexanal



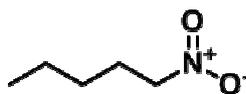
M14: *cis*-2-hexenal



M15: *trans*-2-hexenal



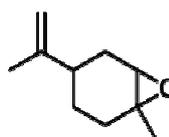
M16: heptanal



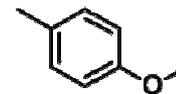
M17: 1-nitropentano



M18: α -pineno



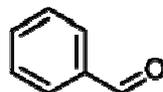
M19: limoneno óxido



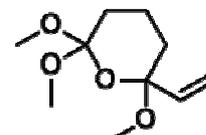
M21: *p*-metoxitolueno



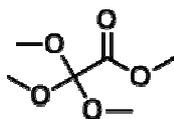
M24: *trans*-2-heptenal



M26: benzaldehido



M25: 2, 6, 6-trimetoxi-2-viniltetrahidropirano (óxido geránico)



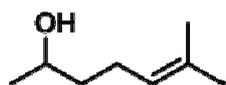
M27: metil trimetoxi acetato



M28: 6-metil-5-hepten-2-ona



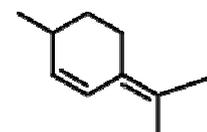
M29: 2-pentilfurano



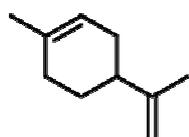
M32: 6-metil-5-hepten-2-ol



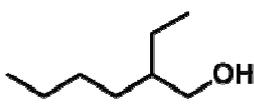
M33: octanal



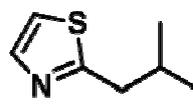
M30: 3-metil-6-(1-metil etilideno)-ciclohexano (isoterpinoleno)



M35: limoneno



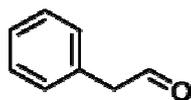
M36: 2-etil-1-hexanol



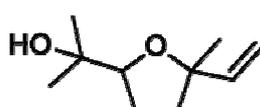
M37: 2-isobutiltiazol



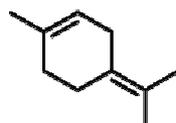
M38: 2-octenal



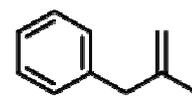
M39: fenilacetaldehído



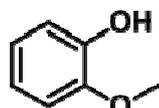
M40: linalil óxido



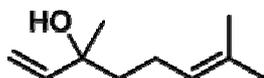
M41: terpinoleno



M44: 2-metil-3-fenil-1-propeno



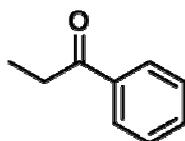
M45: guayacol



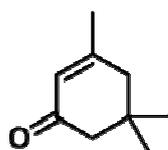
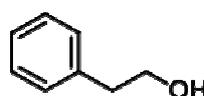
M46: linalool



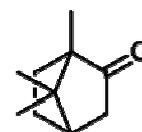
M47: 2-nonen-1-ol



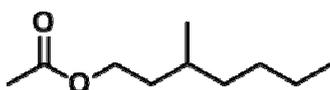
M48: 2-metilacetofenona

M49: α -isoforona

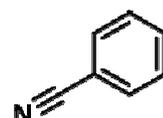
M50: 2-feniletanol



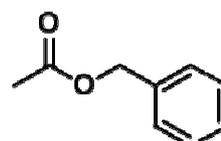
M51: alcanfor



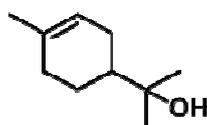
M52: 3-metilheptil acetato



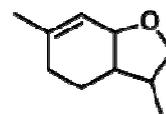
M54: bencilnitrilo



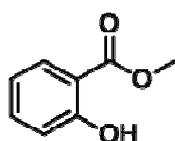
M55: bencil acetato

M58: α -terpineol

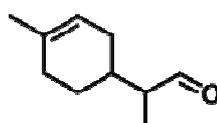
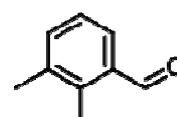
M59: decanal



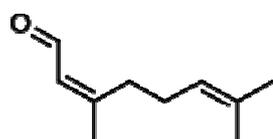
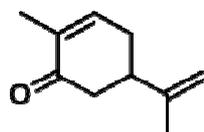
M57: 3, 6, dimetil-2, 3, 3a, 4, 5, 7-hexahidrobencofurano (DMHEX)



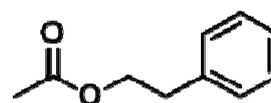
M60: salicilato de metilo

M62: *p*-ment-1-en-9-al

M63: dimetil benzaldehído

M65: β -citral

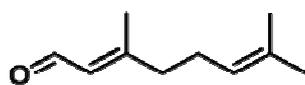
M66: carvona



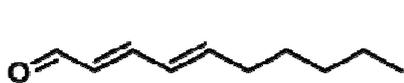
M67: 2-feniletilacetato



M68: 2-decenal

M69: α -citral

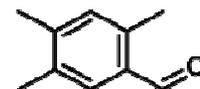
M70: 2-undecanona



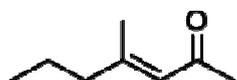
M71: 2,4-decadienal



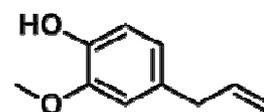
M72: 2-undecanol



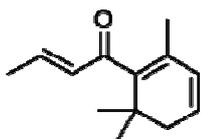
M73: duraldehído



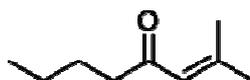
M75: (3E)-4-metil-3-hepten-2-ona



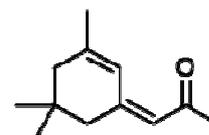
M77: eugenol



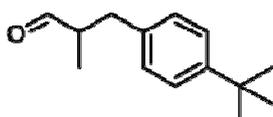
M80: β -damascenona



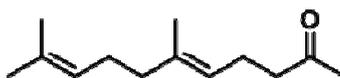
M81: 2-metil-2-octen-4-ona



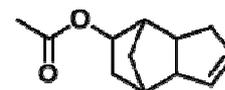
M78: 1-(3, 5, 5-trimetil-2-ciclohexen-1-ilideno)-2-propanona (TRIMCICL)



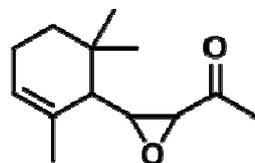
M87: lialial



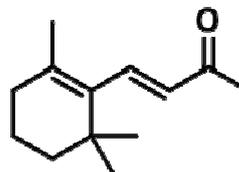
M85: geranil acetona



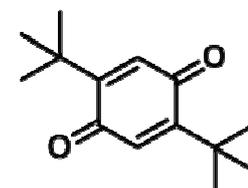
M83: 4,7-metano-1H-inden-6-ol, 3a, 4, 5, 6, 7, 7a, hexahidro acetato (verdil acetato)



M90: β -ionona epóxido



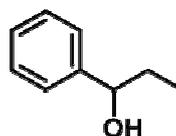
M89: β -ionona



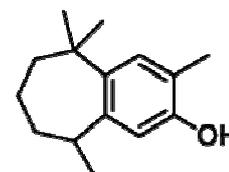
M86: 2,5-ditert-butil benzoquinona



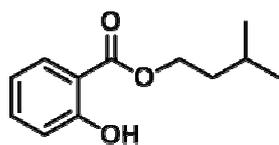
M91: 2-dodecanona



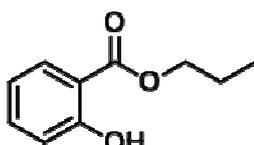
M92: 1-fenil-1-propanol



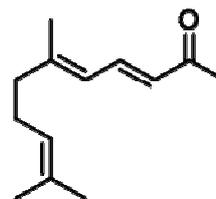
M93: ar-himachalen-2-ol



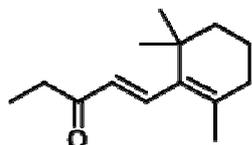
M96: salicilato de isoamilo



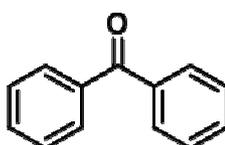
M94: salicilato de propilo



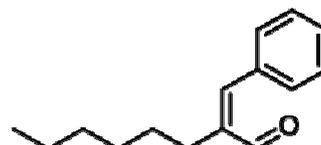
M97: pseudoionona



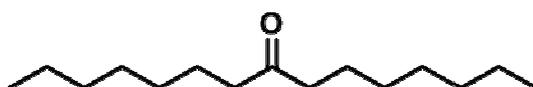
M98: β -metil ionona



M99: benzofenona



M101: α -hexil cinamaldeo



M100: 8-pentandecanona

Referencias

- [1] **Fukusaki E, Kobayashi A.** Plant metabolomics: potential for practical operation. *J. Biosci. Bioeng.* , 2005, 100:347-354.
- [2] **Cevallos-Cevallos JM, Reyes-De-Corcuera JI, Etxeberria E, Danyluk MD, Rodrick GE.** Metabolomic analysis in food science: a review. *Trends Food Sci.Technol.*, 2009, 20:557-566.
- [3] **Tikunov YM, Verstappen FWA, Hall RD.** Metabolomic Profiling of Natural Volatiles. Headspace Trapping: GC–MS. In *Metabolomics: Methods and Protocols*. Edited by Weckwerth W. New Jersey.: Humana Press; 2007.
- [4] **Hübschmann HJ:** *Handbook of GC/MS: Fundamentals and Applications*. Weinheim: WILEY Verlag 2009.
- [5] **Tikunov Y, Lommen A, de Vos CH, Verhoeven HA, Bino RJ, Hall RD, Bovy AG.** A novel approach for nontargeted data analysis for metabolomics. Large-scale profiling of tomato fruit volatiles. *Plant Physiol.*, 2005, 139:1125-1137.
- [6] **Zanor MI, Rambla JL, Chaib J, Steppa A, Medina A, Granell A, Fernie AR, Causse M.** Metabolic characterization of loci affecting sensory attributes in tomato allows an assessment of the influence of the levels of primary metabolites and volatile organic contents. *J. Exp. Bot.*, 2009, 60:2139-2154.
- [7] **Milone D, Stegmayer G, Kamenetzky L, Lopez M, Lee J, Giovannoni J, Carrari F.** *omeSOM: a software for clustering and visualization of transcriptional and metabolite data mined from interspecific crosses of crop plants. *BMC Bioinformatics*, 2010, 11:438.

Capítulo III

Extracción de Compuestos Orgánicos Volátiles del Fruto del Tomate por Microextracción en Fase Sólida

EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES DEL FRUTO DEL TOMATE POR MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

Optimización de la Extracción de Compuestos Orgánicos Volátiles

La información que fue mencionada en el Capítulo I ha tratado de reflejar los defectos y las virtudes de la microextracción en fase sólida como una técnica de extracción donde las ventajas sobrepasan ampliamente las falencias intrínsecas de la metodología. Por esta razón fue elegida la técnica de SPME para llevar adelante la determinación de compuestos orgánicos volátiles del fruto del tomate.

La elección de una metodología lleva asociada indefectiblemente la optimización y control de determinados parámetros analíticos que conforman el método de análisis^[1,2]. Para SPME existe una rigurosa parametrización del método que permite obtener un comportamiento reproducible y constante para una gran cantidad de muestras y de elevada complejidad como lo es el objeto de estudio de este trabajo de investigación^[3]. Los parámetros optimizados fueron:

- Elección del recubrimiento sorbente de la fibra de SPME
- Tiempo de extracción
- Temperatura de extracción
- Cantidad de Sales Inorgánicas
- Adición de solución quelante

Cada uno de los parámetros fue determinado utilizando una mezcla de diferentes frutos de tomate maduro conseguidos en un negocio comercial de la ciudad de Córdoba. Estos frutos fueron tratados y procesados de igual forma que las muestras reales de interés. De esta forma se obtuvo una gran cantidad de muestra para completar la optimización de cada uno de los parámetros con una mezcla homogénea de frutos (*tomate matriz*).

El equipo utilizado en la optimización fue el mismo que ha sido descrito en el Capítulo II: Materiales y Métodos, un cromatógrafo de gases GC Varian 3800 acoplado a un detector de masas de trampa de iones Varian Saturn 2000, contando con un automuestreador Combi PAL para SPME (Figura 1).

El método cromatográfico utilizado consistió en la inyección sin división de la muestra (*splitless*) a 250 °C utilizando un flujo en columna de He de 1 mL min⁻¹ en forma constante. La columna capilar utilizada fue una Varian VF5-ms de 30 m x 0,25 mm diámetro interno x 0,25 µm de espesor de film. El programa de temperatura del horno de la columna fue de 40 °C durante 5 min, luego un incremento de 7 °C min⁻¹ hasta 200 °C y posteriormente un incremento final de 20 °C min⁻¹ hasta 250 °C, manteniendo esta temperatura durante 5 min finales. La temperatura de la línea de transferencia fue de 250

°C, la trampa de iones de 100 °C y la del *manifold* de 80 °C. El rango de masas adquirido por el equipo fue de 30-300 m/z, generado por ionización de impacto electrónico (EI) a 70 eV. El cromatograma fue obtenido en modo FULL SCAN (FS), cubriendo las masas asignadas en el programa del equipo. Bajo estas condiciones cromatográficas se determinaron los mejores parámetros para la extracción de COVs de la matriz del fruto de tomate.



Figura 1. Automuestreador Varian Combi PAL para SPME

Recubrimiento sorbente de la fibra de SPME

La extracción de COVs del fruto del tomate o de otras matrices similares por SPME puede ser maximizada con el correcto uso de una fase sorbente que pueda extraer y concentrar con gran afinidad el elevado número de metabolitos volátiles presentes en la muestra. Debe tenerse en cuenta la diversa naturaleza química y las diferencias de volatilidad que presentan los analitos que se desean analizar. Por ello es necesario determinar el comportamiento de diferentes fibras recomendadas para este tipo de muestras. En las aplicaciones recomendadas del fabricante y en diversos trabajos publicados suelen utilizarse fibras de materiales mixtos como divinilbenceno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS - fibra de identificador gris), carboxen/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS - fibra de identificador celeste) o polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB - fibra de identificador rosa)^[4]. En esta sección se determinará la fibra con mejor eficiencia en la extracción de los COVs de tomate.

La determinación del recubrimiento de la fibra de SPME se efectuó utilizando una porción del material de frutos procesados. Se pesó 1 g de *tomate matriz* en un vial de vidrio de 10 mL con tapa a rosca y se dejó que tomara temperatura ambiente. Luego, utilizando el automuestreador se incubó durante 10 min a 30 °C con agitación constante para lograr el equilibrio térmico del sistema. Posteriormente se inició la extracción introduciendo la fibra en el vial con la muestra. La extracción desde el espacio de cabeza fue de 25 min a 30 °C con agitación constante y por último se inyectó en el equipo desorbiendo la fibra durante 2 min en el inyector sin división a 250 °C. Este procedimiento fue repetido individualmente tres veces con cada una de las fibras mencionadas.

Las condiciones de análisis expuestas se repetirán idénticamente en la optimización de cada uno de los diferentes parámetros descritos a continuación. En adelante, sólo se referirán las condiciones explícitas del parámetro a optimizar.

A partir de los cromatogramas obtenidos, se escogieron 12 señales correspondientes a metabolitos conocidos del tomate que se integraron y compararon con las mismas señales obtenidas con las otras fibras. Los COVs elegidos se encuentran normalmente en el fruto del tomate y abarcan distintos grupos funcionales y diferencias en la volatilidad. En la Tabla 1 se muestran los metabolitos volátiles elegidos junto con las áreas promedio y su desviación estándar. Al final de la tabla se calcula el coeficiente de variación porcentual promedio ($CV\% = (\text{desviación estándar}/\text{promedio}) \cdot 100$) como medida de la variabilidad de cada condición ensayada.

Tabla 1. Áreas promedio y desviación estándar de COVs extraídos con diferentes fibras de SPME.

Analito	Fibra Gris	Fibra Rosa	Fibra Celeste	s Gris	s Rosa	s Celeste
1-penten-3-ona	5342	4126	3585	933	1957	690
<i>cis</i> -3-hexenal	879752	1193527	978565	158863	95886	451661
<i>trans</i> -2-hexenal	921056	445347	229785	189887	85986	95013
1-hexanol	9735	3611	3257	4181	355	635
1-nitropentano	13525	7857	12566	2118	1552	2288
<i>trans</i> -2-heptenal	4173	3258	6010	418	1004	897
benzaldehído	44672	3211	15015	1207	6017	912
6-metil-5-hepten-2-ona	16407	12784	10876	1509	2848	2670
alcanfor	17962	18644	16987	3260	4683	4577
2-undecanona	56850	70273	89105	3256	5150	8491
geranil acetona	18529	5828	5294	1177	4379	1288
β -ionona	2955	1788	915	608	1015	1496
CV % Promedio				15	42	34

s: desviación estándar con n=3. En color se resaltan los máximos valores de área obtenidos para cada metabolito. Condiciones: 1 g muestra extraída durante 25 min a 30 °C con diferentes fibras de SPME.

En las Figuras 2 y 3 se grafican las áreas de algunos de los metabolitos volátiles obtenidas con los diferentes tipos de fibras ensayadas. En base de los resultados obtenidos puede observarse que los máximos valores de área encontrados corresponden en su mayoría a los cromatogramas obtenidos con la fibra gris de DVB/CAR/PDMS.

A su vez también puede observarse un efecto sobre la variabilidad, el coeficiente de variación porcentual promedio (CV%) para cada tipo de fibra fue 15 % para la fibra gris, 42 % para la fibra rosa y 34 % para la fibra celeste (Tabla 1).

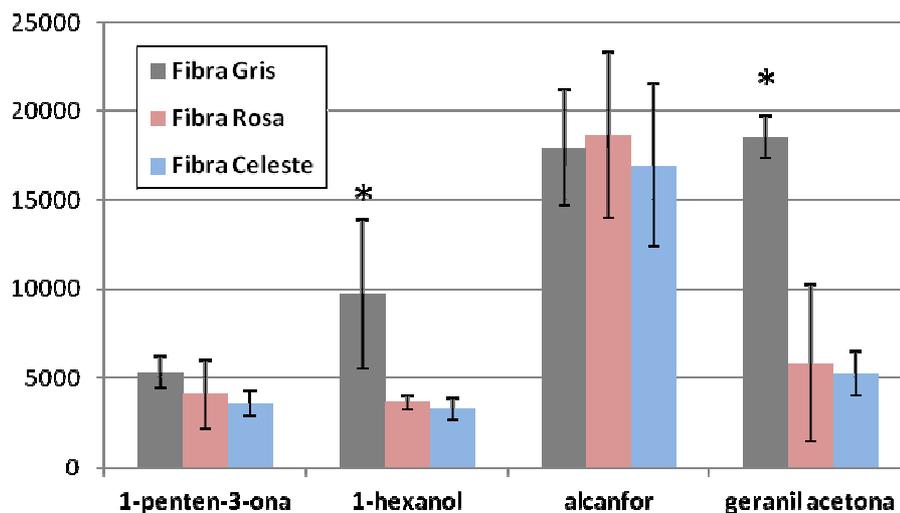


Figura 2. Áreas promedio de COVs extraídos mediante fibras de SPME de DVB/CAR/PDMS (gris), CAR/PDMS (celeste) y PDMS/DVB (rosa). Asteriscos indican resultados estadísticamente diferentes (ANOVA $\alpha=0,05$) para cada COVs en las distintas condiciones ensayadas.

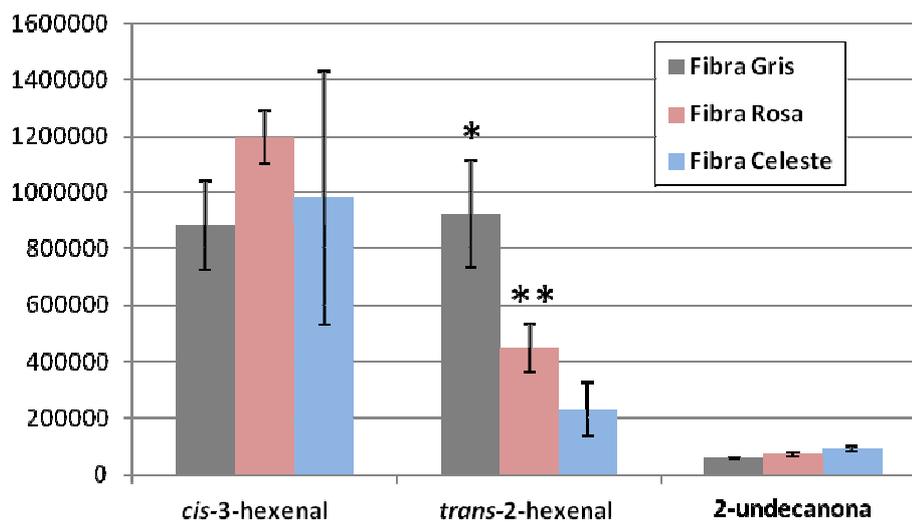


Figura 3. Áreas promedio de COVs extraídos mediante fibras de SPME de DVB/CAR/PDMS (gris), CAR/PDMS (celeste) y PDMS/DVB (rosa). Asteriscos indican resultados estadísticamente diferentes (ANOVA $\alpha=0,05$) para cada COVs en las distintas condiciones ensayadas.

Las Figuras 2 y 3 demuestran que las áreas obtenidas para los COVs ensayados con las distintas fibras de SPME no presentaron grandes diferencias. Sin embargo, en la mayoría de los casos utilizando la fibra gris se obtuvieron áreas ligeramente mayores. Cualquiera de ellas ofrecería un buen cromatograma facilitando la identificación e integración de las señales de interés. Teniendo en cuenta la desviación analítica encontrada en cada uno de los ensayos, la fibra trifásica (gris) es la que ofrece mejores resultados. Considerando la múltiple naturaleza de los metabolitos y la menor variabilidad analítica, la fibra gris de DVB/CAR/PDMS se escogió por su mayor capacidad de extracción^[5-7].

Tiempo de extracción

El tiempo de extracción utilizando la técnica de SPME tiene una gran importancia debido al efecto sobre la concentración de los analitos en la fase sorbente de la fibra. Se conoce que a medida que transcurre el tiempo en un sistema cerrado los analitos logran establecer una concentración de equilibrio entre todas las fases que componen dicho sistema. Dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de los analitos (volatilidad, peso molecular, hidrofobicidad, entre otras), podrán alcanzar esta situación de equilibrio en menor o mayor tiempo. Por ejemplo para el benceno, un compuesto de elevada presión de vapor, el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio está cercano a los 2 min, mientras que para otro compuesto de baja presión de vapor, un semivolátil como el fenantreno, el tiempo de equilibrio es de aproximadamente 70 min^[8].

Desde los inicios de la técnica de SPME se conocen las ventajas de trabajar en tiempos donde los COVs han llegado a la situación de equilibrio entre las fases involucradas en la extracción. No obstante, metodológicamente en algunas ocasiones donde se pretende analizar compuestos orgánicos semivolátiles, el tiempo requerido para el equilibrio supera ampliamente la practicidad, convirtiéndose en una gran desventaja. Para evitar este inconveniente en muchos casos se elige trabajar a tiempos menores a los estimados bajo la condición de equilibrio. Esta práctica permite ahorrar tiempo en el proceso de extracción pero a su vez tiene asociada una gran variación de la cantidad de masa extraída en pequeñas variaciones de tiempo. En la Figura 4 se ejemplifica la variación en la cantidad de masa retenida por la fibra de SPME durante tiempos de extracción crecientes. En la zona de no equilibrio se observa que pequeñas diferencias de tiempo poseen un gran efecto sobre la cantidad absorbida. Mientras que variaciones en la zona de equilibrio no producen un efecto significativo sobre la cantidad de masa extraída^[9].

La implementación del uso de automuestreadores para SPME fue un importante avance para esta metodología, debido a la exacta medición de los tiempos de extracción que permitieron disminuir la variación en las señales integradas respecto de la versión manual.

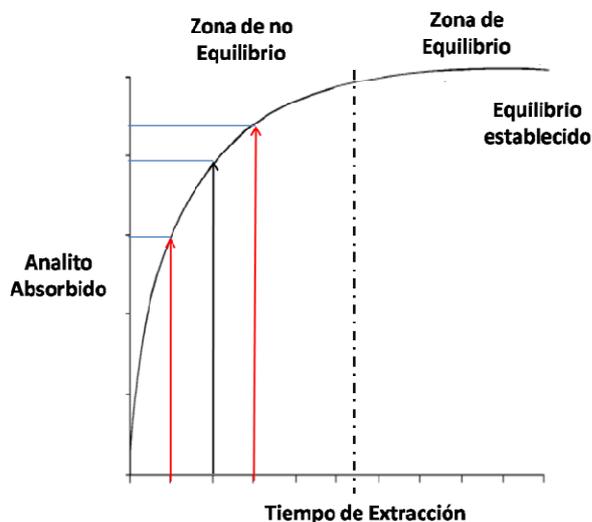


Figura 4. Esquema de la cinética de absorción en SPME

En el caso del fruto del tomate, los metabolitos volátiles cubren una amplia gama de compuestos con diferencias muy grandes en su estructura y por ende en su presión de vapor. Por ello es intuitivo pensar que muchos de estos COVs podrán alcanzar una condición de equilibrio a tiempos muy cortos, mientras que otros compuestos de mayor peso molecular tardarán minutos a horas en alcanzar esta situación. Por esta razón se optimizó el tiempo de extracción en forma automática para la determinación de metabolitos volátiles provenientes del tomate.

Para determinar el tiempo adecuado de extracción se utilizó un esquema de ensayos similar al anterior en forma automatizada. Posteriormente se inició la extracción de las muestras utilizando la fibra gris trifásica DVB/CAR/PDMS durante 30, 40 y 50 min a 30 °C con agitación constante. Por último se inyectó en el equipo a 250 °C. Cada tiempo de extracción fue repetido por triplicado de forma individual e independiente. Una vez logrados los cromatogramas se integraron las áreas de 14 señales que fueron comparadas en cada condición ensayada.

En la Tabla 2 se encuentran los metabolitos elegidos para optimizar el tiempo de extracción, su promedio, desviación estándar y el CV% promedio para cada condición ensayada.

Los mismos se encuentran ordenados de forma creciente de acuerdo al peso molecular. Esta propiedad tiene un efecto muy importante sobre la presión de vapor y volatilidad de los compuestos orgánicos. Como puede observarse en la Tabla 2, los mayores valores de área comienzan a obtenerse a medida que el tiempo de extracción se hace más extenso. Los primeros cinco COVs, de menor peso molecular, presentan valores más elevados de área a tiempos menores, por el contrario los COVs de elevado peso molecular como β -damascenona e isometilionona necesitan mayor tiempo de extracción para obtener señales con mayor relación señal/ruido.

Tabla 2. Áreas promedio y desviación estándar de los COVs extraídos a diferentes tiempos de extracción.

Analito	30 min	40 min	50 min	s		
				30 min	40 min	50 min
3-metilbutanal	13407	12475	12022	2209	2589	2471
pentanal	8317	13212	8776	121	967	2814
1-penten-3-ona	21422	18027	10268	1631	2356	2896
3-metil-1-butanol	10217	7512	5812	459	1382	2764
<i>cis</i> -3-hexenal	181000	1521000	530787	131093	190930	51093
heptanal	11443	18645	14450	109	4501	8855
benzaldehído	27308	39733	22410	15222	2749	575
6-metil-5-hepten-2-ona	34677	72514	53263	11863	1133	12762
octanal	18101	19981	13447	2003	2175	5878
<i>cis</i> -linalil óxido	22180	111504	29325	9064	31649	12046
alcanfor	78082	211183	185495	22569	20245	4661
2-undecanona	96737	267924	182554	3435	18822	136630
β -damascenona	319002	492768	539308	71939	8405	158603
isometilionona	69521	121730	194550	27735	13458	79625
CV % Promedio				20	12	33

s: desviación estándar con n=3. En color se resaltan los máximos valores de área obtenidos para cada metabolito.

Condiciones: 1 g muestra extraída con fibra de DVB/CAR/PDMS a 30 °C durante 30, 40 y 50 min.

En las Figuras 5 a 7 se grafica el comportamiento de algunos de los analitos volátiles en las diferentes condiciones de extracción ensayadas.

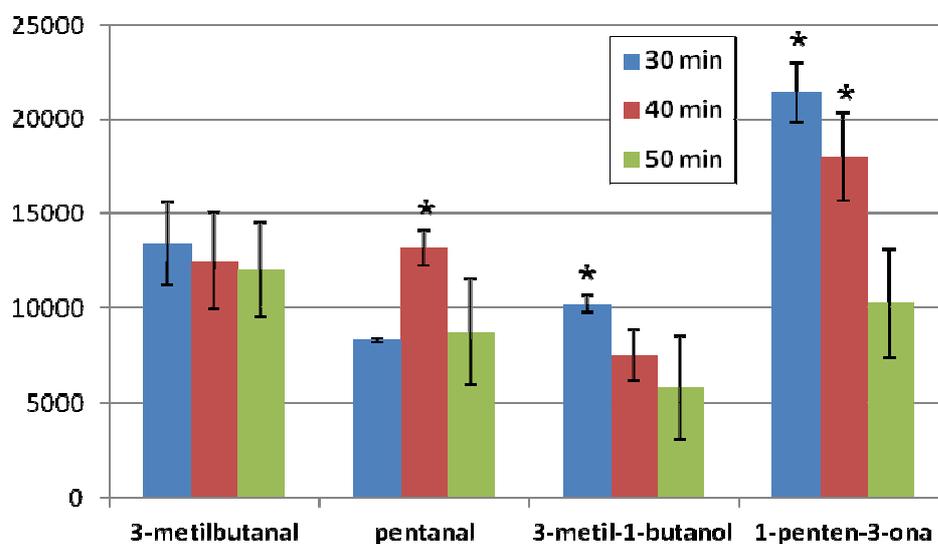


Figura 5. Áreas promedio de COVs obtenidas a diferentes tiempos de extracción (30, 40 y 50 min). Asteriscos indican resultados estadísticamente diferentes (ANOVA $\alpha=0,05$) para cada COVs en las distintas condiciones ensayadas.

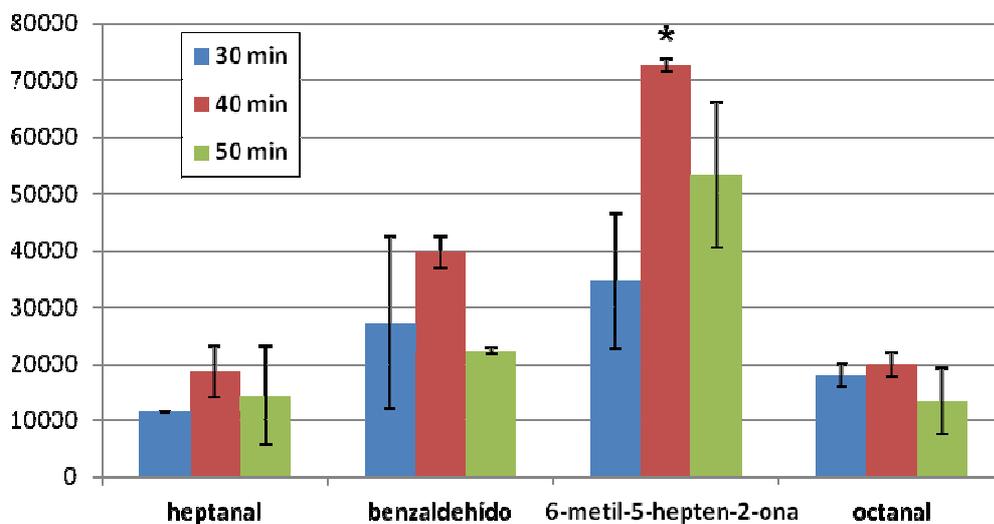


Figura 6. Áreas promedio de COVs obtenidas a diferentes tiempos de extracción (30, 40 y 50 min). Asteriscos indican resultados estadísticamente diferentes (ANOVA $\alpha=0,05$) para cada COVs en las distintas condiciones ensayadas.

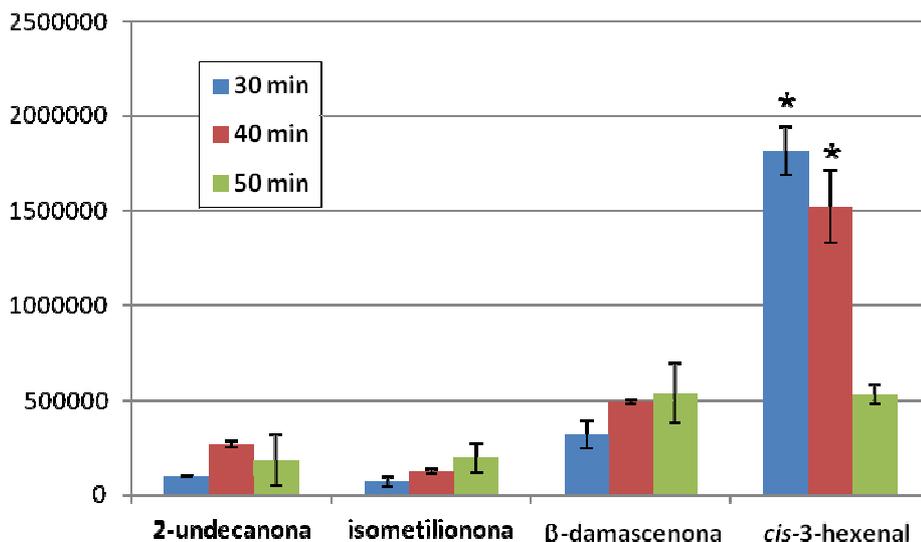


Figura 7. Áreas promedio de COVs obtenidas a diferentes tiempos de extracción (30, 40 y 50 min). Asteriscos indican resultados estadísticamente diferentes (ANOVA $\alpha=0,05$) para cada COVs en las distintas condiciones ensayadas.

El análisis de las gráficas anteriores permiten observar el comportamiento de los metabolitos de acuerdo a su volatilidad, en relación con el peso molecular. Por ejemplo, los COVs más volátiles como 3-metil-1-butanol, 3-metilbutanal, pentanal, 1-penten-3-ona y *cis*-3-hexenal presentan mayores señales al menor tiempo ensayado, mientras que los COVs de peso molecular medio como heptanal, benzaldehído, 6-metil-5-hepten-2-ona, octanal y 2-undecanona presentan su máximo de absorción en el tiempo medio y los COVs restantes necesitan aún más tiempo para conseguir su máximo nivel de extracción. A pesar de observarse una relación entre el tiempo de extracción y la señal de un compuesto orgánico, en la mayoría de los casos el aumento del tiempo trae aparejado una disminución de la señal. Esto permite observar que no resulta beneficioso extenderse a tiempos muy extensos de extracción.

La variabilidad aportada en cada condición también debe considerarse para poder juzgar el valor de este importante parámetro. Los respectivos coeficientes de variación promedio para cada condición fueron 20 % para 30 min, 12 % para 40 min y 33 % para 50 min (Tabla 2).

Considerando la extensa naturaleza química de los COVs en el perfil del fruto de tomate y los resultados hallados fue necesario valorar las ventajas y dificultades para todos los analitos de interés. En muchos casos los tiempos cortos de extracción ofrecen poca absorción, mientras que tiempos medios producen en la mayoría de los casos una excelente relación señal/ruido y baja dispersión. Sin embargo 40 min de absorción impacta en forma ineficiente sobre la gran cantidad de muestras y repeticiones como lo demanda este trabajo de investigación. Además se conoce que es posible reducir los tiempos de absorción utilizando automuestreadores sin pérdidas significativas en la determinación de los analitos de interés^[10]. Por ello se decidió tomar como tiempo de extracción 35 min considerando que en todos los casos generará poco impacto en la pérdida de la abundancia de las señales y un nivel de variabilidad aceptable para un método analítico basado en la determinación de múltiples compuesto orgánicos de interés.

Temperatura de extracción

El ajuste de la temperatura en la técnica de SPME, posee una gran relevancia en el comportamiento analítico del método de extracción de COVs. Este parámetro afecta principalmente la distribución de los analitos volátiles en las diferentes fases del sistema (fase acuosa, fase vapor en el espacio en cabeza y fase sorbente). Un incremento de la temperatura tendrá como efecto un mayor enriquecimiento de los analitos en el espacio en cabeza favoreciendo la captación por la fase sorbente de la fibra de SPME. Principalmente tendrá una mayor importancia sobre la distribución de los compuestos que presentan menor volatilidad en la matriz. Para esta clase de analitos orgánicos de mayor punto de ebullición, su extracción a temperaturas superiores a la temperatura ambiente promueve un menor tiempo para alcanzar la condición de equilibrio.

Para determinar la temperatura óptima de extracción se utilizó el mismo esquema de ensayos en forma automatizada. Una porción de 1 g de *tomate matriz* fue extraída con la fibra gris de SPME durante 35 min a diferentes temperaturas: 40 °C, 50 °C y 60 °C. Por último se introdujo en el inyector del equipo desorbiendo la fibra durante 2 min a 250 °C. Cada ensayo de temperatura de extracción fue repetido por triplicado de forma individual e independiente. Una vez logrados los cromatogramas se integraron las áreas de 14 señales de COVs que fueron comparadas en cada condición ensayada.

En la Tabla 3 se encuentran los metabolitos elegidos para optimizar la temperatura de extracción. Se encuentran ordenados de acuerdo al tiempo de retención (TR) obtenido en los cromatogramas.

A su vez este orden de elución se corresponde en gran forma con propiedades fisicoquímicas de los analitos como el Peso Molecular (PM), Temperatura de ebullición (Teb) y Presión de Vapor (PV), informados en la Tabla 4.

Tabla 3. Áreas promedio de COVs extraídos a diferentes temperaturas de extracción.

Analito	40 °C	50°C	60°C	^s 40°C	^s 50°C	^s 60°C
2-metilfurano	21881	17779	4439	1083	4298	2370
1-penten-3-ona	34498	28574	5397	12806	4648	3968
3-metil-1-butanol	40731	28230	25180	814	3744	8713
<i>cis</i> -3-hexenal	2202000	1660900	1551600	373339	253442	422885
<i>trans</i> -2-hexenal	1590000	1263680	1684000	932553	298489	134458
6-metil-5-hepten-2-ona	57350	65582	71806	10221	7387	19161
2-isobutiltiazol	21892	28095	19813	936	4125	9420
2-etil-1-hexanol	1272000	884245	754965	182434	103187	77195
fenilacetaldehído	28123	79447	72433	2381	1749	12822
<i>cis</i> -linalil óxido	82478	143575	163607	3270	15446	87208
α -terpineol	392982	408720	430612	17080	3181	48344
salicilato de metilo	127715	335102	545254	5479	43459	188766
β -damascenona	81974	229170	552274	60439	186650	65351
geranil acetona	22159	36338	40807	1184	17080	2913
CV % promedio				18	20	30

s: desviación estándar con n=3. En color se resaltan los máximos valores de área obtenidos para cada metabolito.

Condiciones: 1 g muestra extraída con fibra de DVB/CAR/PDMS durante 35 min a 40, 50 y 60 °C.

Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas de COVs utilizados durante la optimización de la temperatura de extracción.

Analito	Peso Molecular (uma)	Temp de ebullición (°C)	Presión de Vapor (mmHg)
2-metilfurano	82	66	176
1-penten-3-ona	84	70	32
3-metil-1-butanol	88	133	2.4
<i>cis</i> -3-hexenal	98	126	11.2
<i>trans</i> -2-hexenal	98	143	4.6
6-metil-5-hepten-2-ona	126	173	1.3
2-isobutiltiazol	141	180	1.1
2-etil-1-hexanol	130	186	0.21
fenilacetaldéhid	120	195	0.36
<i>cis</i> -linalil óxido	170	194	0.02
α -terpineol	154	219	0.03
salicilato de metilo	152	224	0.03
β -damascenona	190	275	0.02
geranil acetona	194	247	0.016

Puede observarse en la Tabla 3 y en las Figuras 8 a 10, que los COVs de menor PM, Teb y mayor PV presentan una mayor señal en las condiciones de menor temperatura. Por el contrario, los COVs que presentan estas propiedades en forma opuesta, generan señales de menor intensidad a bajas temperaturas y señales más importantes cuando la temperatura de extracción es más elevada. Esto demuestra el efecto positivo del incremento de la temperatura del sistema sobre los compuestos menos volátiles^[4]. Sin embargo, al aumentar la temperatura, los analitos de menor peso molecular demuestran una abrupta caída de la señal en estas condiciones^[11].

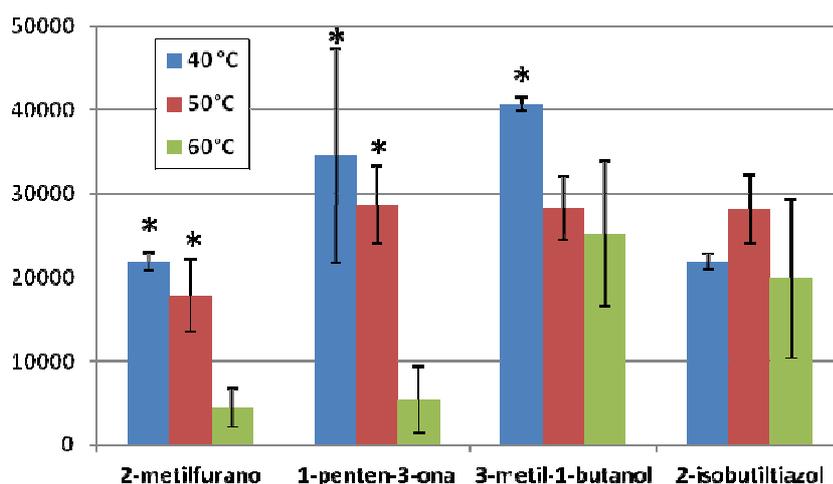


Figura 8. Áreas promedio de COVs obtenidas a diferentes temperaturas de extracción (40°C, 50°C y 60°C). Asteriscos indican resultados estadísticamente diferentes (ANOVA $\alpha=0,05$) para cada COVs en las distintas condiciones ensayadas.

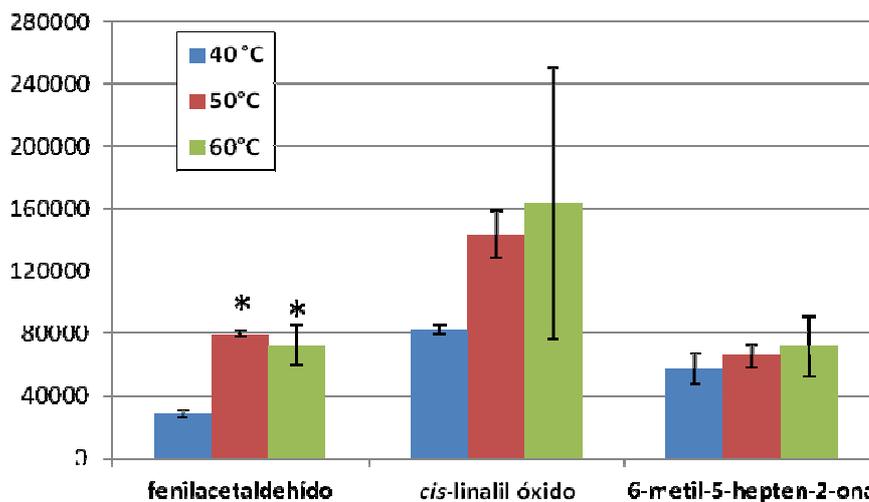


Figura 9. Áreas promedio de COVs obtenidas a diferentes tiempos de extracción (40°C, 50°C y 60°C). Asteriscos indican resultados estadísticamente diferentes (ANOVA $\alpha=0,05$) para cada COVs en las distintas condiciones ensayadas.

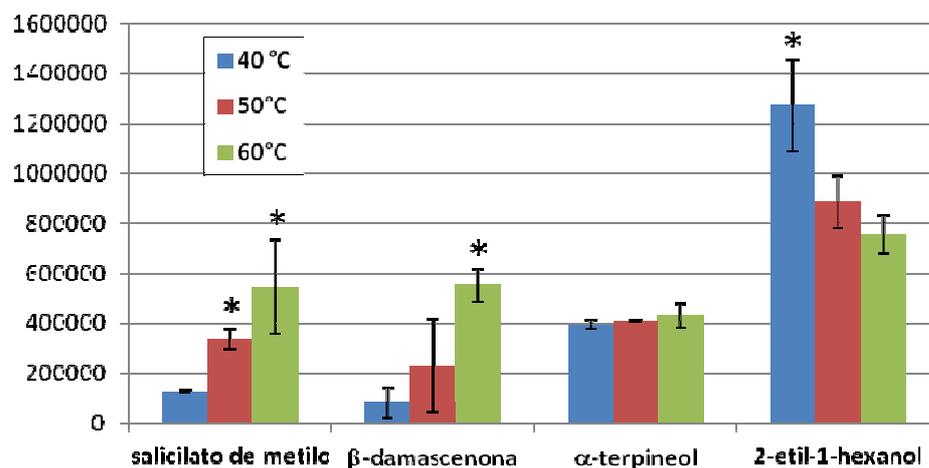


Figura 10. Áreas promedio de COVs obtenidas a diferentes tiempos de extracción (40°C, 50°C y 60°C). Asteriscos indican resultados estadísticamente diferentes (ANOVA $\alpha=0,05$) para cada COVs en las distintas condiciones ensayadas.

Otro punto a considerar para este parámetro es la variabilidad obtenida en cada condición ensayada. El Coeficiente de Variación Porcentual (CV%) fue 18 % a 40 °C, 20 % a 50 °C y 30 % a 60 °C (Tabla 3).

Por lo tanto, para juzgar correctamente la temperatura óptima de extracción debe tenerse en cuenta ciertos efectos. Por un lado, al elevar la temperatura del sistema donde ocurre la extracción se favorecen los COVs menos volátiles aumentando su presión de vapor, pero en detrimento de los COVs más volátiles que sufren una disminución pronunciada de sus señales. Por otro lado la variabilidad obtenida en las menores temperaturas de extracción presenta la menor dispersión con una mínima diferencia entre 40 °C y 50 °C.

Considerando los efectos expuestos se eligió una temperatura intermedia de 50 °C como temperatura de trabajo para la extracción de COVs del fruto del tomate.

Del mismo modo que para el tiempo de extracción, el uso de un equipo automático produce un estricto control de la temperatura de extracción y agitación

minimizando las variaciones que pudieran observarse al calentar el sistema en forma manual, por lo general realizado en un baño de agua sobre una placa de calentamiento.

La temperatura de extracción óptima para la extracción de COVs fue considerada a 50 °C con un tiempo de extracción de 35 min utilizando una fibra de SPME compuesta por DVB/CAR/PDMS.

Adición de Sales Inorgánicas

El análisis de COVs de matrices biológicas posee una elevada complejidad. Uno de los desafíos más importantes es obtener un perfil estable de analitos volátiles. Esto se debe principalmente al hecho de que muchos de los COVs más importantes son producidos enzimáticamente con la disrupción de los tejidos durante el masticamiento, triturado o procesado del fruto. Estos COVs inicialmente generados también pueden sufrir transformaciones por medio de reacciones enzimáticas secundarias que pueden alterar drásticamente el perfil de metabolitos volátiles del fruto. Como es el caso del *cis*-3-hexenal que por medio de una enzima con acción isomerasa produce el *trans*-2-hexenal, a expensas del anterior, a medida que transcurre el tiempo de disrupción de tejidos^[12]. Por esta razón es muy útil poder preservar inalterable el mayor tiempo posible el perfil de metabolitos antes y durante el tiempo de análisis.

El agregado de sales inorgánicas en matrices biológicas produce importantes efectos, por un lado promueve la precipitación de proteínas en el medio (precipitación salina o *salting out*) y además genera un cambio en los coeficientes de distribución, afectando la solubilidad de compuestos orgánicos disueltos en una matriz acuosa^[13]. En este último caso la modificación de la fuerza iónica del medio puede promover la salida hacia la fase aérea de compuestos orgánicos que poseen elevada presión de vapor.

La sal inorgánica comúnmente utilizada para promover una mayor concentración en el espacio en cabeza en soluciones acuosas es NaCl debido a la poca interferencia de los iones con los COVs disueltos^[14, 15]. Sin embargo en el caso de matrices más complejas donde se encuentran restos celulares y enzimas con acción remanente, como es el caso del tomate, suelen utilizarse sales que además de generar el efecto de *salting out*, producen un efecto inhibitorio sobre algunas enzimas que interactúan sobre algunos sustratos volátiles. En estos casos la sal comúnmente empleada es CaCl₂^[16, 17].

Para determinar el efecto del agregado de sales inorgánicas se realizó el mismo esquema de ensayos utilizado anteriormente considerando los parámetros óptimos logrados. Se tomó 1 g de *tomate matriz* y se adicionó 1 g de sal inorgánica a la muestra (excepto al control: sin sales) y se homogenizó con una varilla de vidrio. Seguidamente se inició la extracción utilizando la fibra gris trifásica a 50 °C con agitación constante durante 35 min. Por último se inyectó en el equipo a 250 °C. Cada ensayo con las dos sales inorgánicas fue repetido por triplicado de forma individual e independiente. Una vez logrados los cromatogramas se integraron las áreas de 15 señales que fueron comparadas en cada condición ensayada como se demuestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Áreas promedio y desviación estándar de COVs extraídos sin sales inorgánicas, con CaCl₂ y con NaCl.

Analito	s/sal	CaCl ₂	NaCl	s s/sal	s CaCl ₂	s NaCl
3-metilbutanal	199535	806993	994425	96741	93827	33508
1-penten-3-ona	90736	78834	82090	19054	9705	11350
3-metil-1-butanol	749999	1484933	75324	189510	364607	6340
<i>cis</i> -3-hexenal	1.79E+05	3.34E+06	2.72E+05	1.64E+05	1.08E+06	2.03E+05
<i>trans</i> -2-hexenal	135064	818307	2298024	98561	177160	374694
<i>trans</i> -2-heptenal	476988	1355719	878277	53271	708529	263674
6-metil-5-hepten-2-ona	152185	165182	196017	9751	13407	34220
2-isobutiltiazol	9126	44513	79675	1407	25764	9185
<i>cis</i> -linalil oxido	991014	1637591	713636	418947	137975	87597
linalool	422936	968921	299532	26415	110518	58418
2-feniletanol	12666	217774	79252	10801	17298	16442
bencilnitrilo	27715	40515	65804	5586	5180	4403
salicilato de metilo	513325	1202507	516238	98504	138316	162531
<i>p</i> -menten-9-al	305474	670010	242970	61284	91634	32811
β-ionona	12069	289175	119608	3651	5837	18330

s: desviación estándar con n=3. En color se resaltan los máximos valores de área obtenidos para cada metabolito. Condiciones: 1 g muestra extraída con fibra de DVB/CAR/PDMS durante 35 min a 50 °C con CaCl₂, NaCl y sin sales.

En las Figuras 11 y 12 se muestra la abundancia de las señales de COVs comparados entre los agregados de sales inorgánicas y el control (sin agregado de sales).

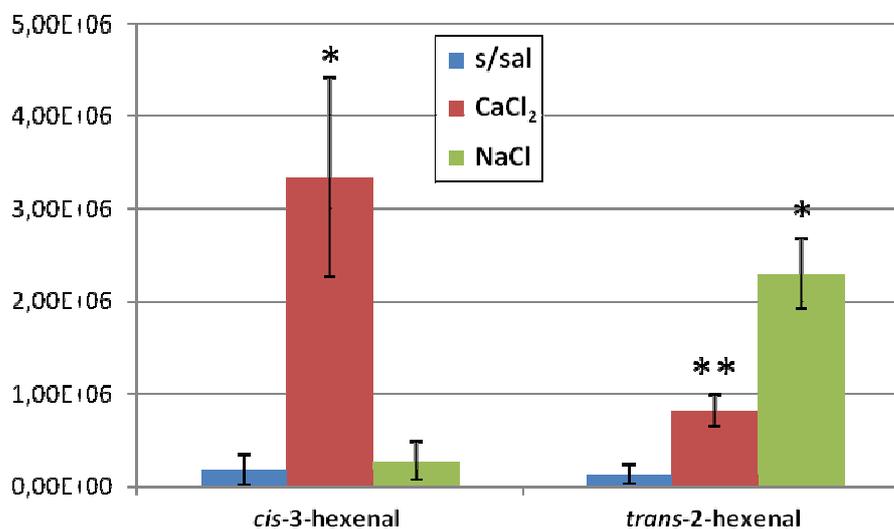


Figura 11. Áreas promedio de COVs obtenidas con el agregado de 1g de sal inorgánica. (NaCl, CaCl₂)

Asteriscos indican resultados estadísticamente diferentes (ANOVA $\alpha=0,05$) para cada COVs en las distintas condiciones ensayadas.

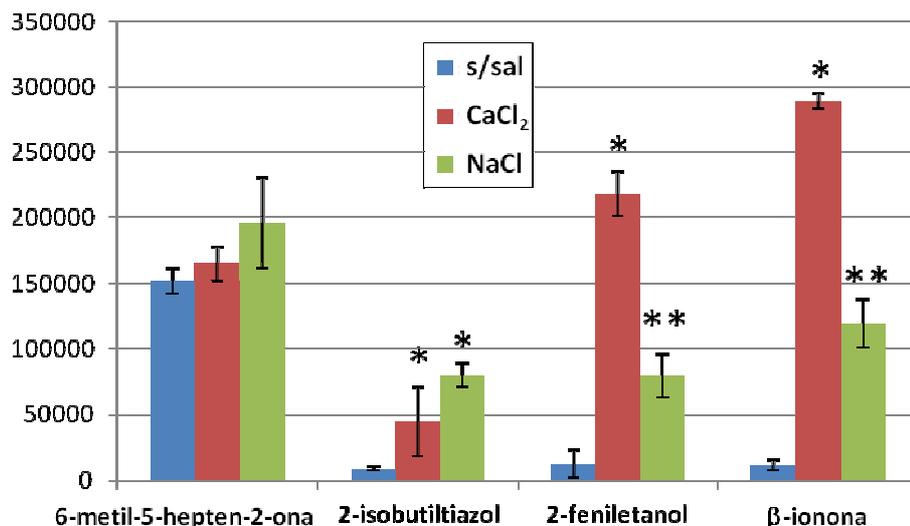


Figura 12. Áreas promedio de COVs obtenidas con el agregado de 1g de sal inorgánica. (NaCl, CaCl₂)

Asteriscos indican resultados estadísticamente diferentes (ANOVA $\alpha=0,05$) para cada COVs en las distintas condiciones ensayadas.

En la Figura 11 se observa el efecto que posee la inhibición enzimática sobre la cupla *cis*-3-hexenal/*trans*-2-hexenal. En el caso de NaCl y en ausencia de sales, la señal de *cis*-3-hexenal cae abruptamente a expensas del incremento del *trans*-2-hexenal respecto del agregado de la sal divalente.

Para el caso particular de 2-isobutiltiazol, uno de los metabolitos más estrechamente relacionados al aroma característico del tomate, se observa que se encuentra disminuído frente al agregado de CaCl₂. Bezman en 2003, observó un fenómeno similar sobre este analito frente al agregado de soluciones saturadas de CaCl₂ y otros cationes divalentes. La causa de este comportamiento se explica por la interacción entre iones Ca⁺² y compuestos con estructura tiazol para formar complejos estables que disminuyen su concentración en el espacio en cabeza^[18].

Puesto que los resultados logrados sobre la adición de sales inorgánicas demuestran la necesidad de utilizar CaCl₂ sobre NaCl para favorecer la concentración en el espacio en cabeza de los COVs y para estabilizar el perfil de metabolitos, es necesario también determinar cual es la mínima cantidad necesaria para cubrir estos requerimientos.

La optimización para determinar este parámetro se realizó bajo un esquema de ensayos similar a las condiciones previas utilizando cantidades crecientes de CaCl₂ en réplicas independientes. Las cantidades de sal de calcio utilizadas fueron 0,75 g, 1,5 g, 2,2 g y 3 g. Los resultados se ejemplifican en la Tabla 6 mostrando los promedios de áreas, las desviaciones estándar y los CV% promedio para cada condición ensayada.

Tabla 6. Áreas promedio y desviación estándar de COVs extraídos con diferente cantidad de CaCl₂.

Analito	CaCl ₂							
	0,75 g	1,5 g	2,2 g	3 g	s 0,75 g	s 1,5 g	s 2,2 g	s 3 g
3-metil-butanal	384408	457670	587817	617358	18173	84004	23143	134775
1-penten-3-ona	97810	134043	144303	47908	8809	18741	11740	9705
2-etilfurano	19163	48265	45241	28898	2287	27941	19740	9035
3-metil-butanol	27398	62463	75137	20656	4468	8461	13387	5037
<i>cis</i> -3-hexanal	4588217	4460004	4314342	5477767	1408217	2460004	1314320	1477675
hexanal	5017127	4674501	3218756	6142835	507127	667450	981875	1142835
<i>trans</i> -2-hexanal	6286942	5361745	5501033	7369341	1628942	1167451	350103	1693417
1-hexanol	162567	84929	75311	0	66782	39451	29441	0
<i>trans</i> -2-heptenal	406986	1346831	1063384	406436	21279	36701	321855	112835
6-metil-5-hepten-2-ona	157330	247290	373728	0	46840	70081	101572	0
2-isobutiltiazol	79954	61513	54513	11750	47510	39722	12006	2141
fenilacetaldehído	83972	91359	114076	95620	9233	13947	16848	25641
<i>cis</i> -linalil óxido	392355	999390	1402892	1821155	72975	132954	384995	200152
alcanfor	225823	123796	209818	343366	92173	14604	23320	134675
α -terpineol	272682	517095	335461	134975	57279	66701	128755	11435
<i>p</i> -ment-1-en-9-al	195148	674912	636093	216963	19428	86516	105108	76417
geranil acetona	22156	47346	29657	11840	1642	4651	8503	7341
CV% promedio					21	24	23	26

s: desviación estándar con n=3. En color se resaltan los máximos valores de área obtenidos para cada metabolito.

Condiciones: 1 g muestra extraída con fibra de DVB/CAR/PDMS durante 35 min a 50 °C con 0,75; 1,5; 2,2; 3 g de CaCl₂.

A partir de los valores observados en cada condición de ensayo (Tabla 6 y Figuras 12 y 13), puede observarse que los mayores niveles encontrados corresponden a los agregados en mayor cantidad de sal.

Sin embargo, cuando se utiliza 3 g de CaCl₂, algunos COVs dejan de ser detectados, como por ejemplo 6-metil-5-hepten-2-ona y 1-hexanol, o disminuyen considerablemente su señal en los cromatogramas, como es el caso de 1-penten-3-ona, 3-metil-1-butanol, 2-isobutiltiazol, α -terpineol, *p*-menten-9-al y geranil acetona. Esto puede deberse a que la cantidad de sal utilizada genera un cambio en el estado de agregación de la muestra, conformando una matriz de consistencia semisólida gelatinosa que podría dificultar la liberación de COVs al espacio en cabeza a pesar de la agitación constante (utilizando 2,2 g se observa un fenómeno similar pero obteniendo un líquido de consistencia muy viscosa). Se conoce que el cambio de la firmeza de la matriz puede afectar la liberación de COVs contenidos en ella^[19].

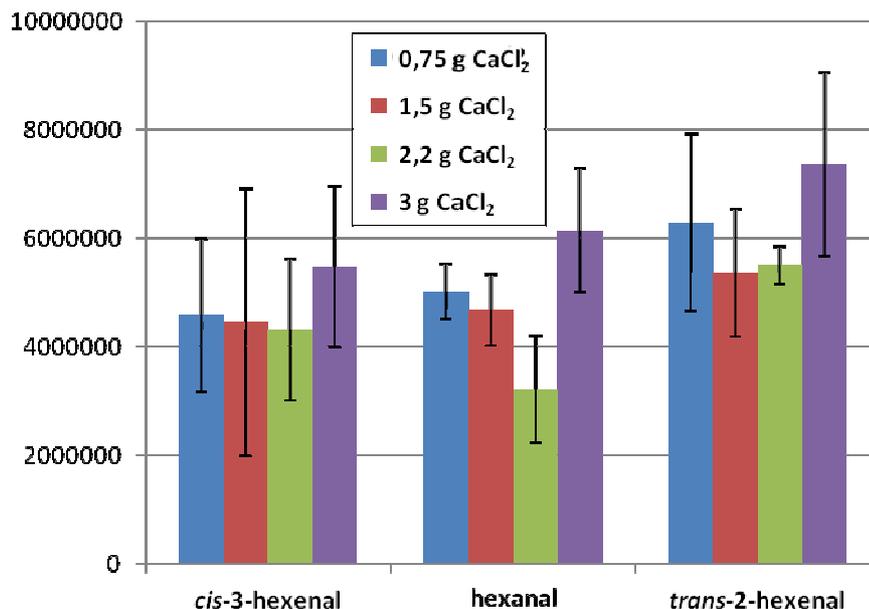


Figura 13. Áreas promedio de COVs obtenidas diferente cantidad de CaCl₂. Asteriscos indican resultados estadísticamente diferentes (ANOVA $\alpha=0,05$) para cada COVs en las distintas condiciones ensayadas.

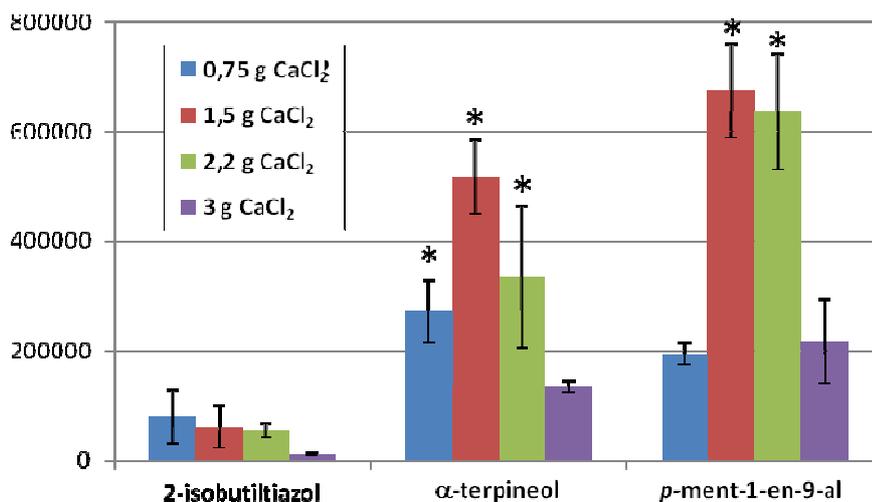


Figura 14. Áreas promedio de COVs obtenidas diferente cantidad de CaCl₂. Asteriscos indican resultados estadísticamente diferentes (ANOVA $\alpha=0,05$) para cada COVs en las distintas condiciones ensayadas.

Respecto de la variabilidad encontrada en este proceso de optimización pudo observarse que no hay marcadas diferencias, obteniéndose para las 3 mejores condiciones un CV% entre el 21 y 24 %. Por lo cual 1,5 g de CaCl₂ demostró el mejor rendimiento debido a que corresponde a la mínima cantidad de sal utilizada y no presenta mayores diferencias en la dispersión estadística con la utilización de 2,2 g.

Sin embargo, se conocen antecedentes de métodos de determinación de COVs que utilizan además de sales de calcio, otro aditivo: agentes acomplejantes^[20-23]. Debido al hecho de que muchas enzimas que pueden reaccionar secundariamente con compuestos volátiles de interés son dependientes de metales o estos forman parte de su estructura

activa, se introduce este tipo de aditivos para disminuir su acción por medio del secuestro de cationes al formar complejos estables.

Tikunov en 2005, informó la necesidad de agregar a la matriz del fruto el ácido aminotetraacético (EDTA) disuelto en una solución de carácter básico de NaOH^[21]. Este agregado provoca dos efectos, por un lado la inclusión de un agente quelante para disminuir el efecto de algunas metaloenzimas responsables de cambios sobre COVs de interés y por otro lado el aumento del pH de la matriz. Considerando el pH fisiológico del fruto (cerca a 4 – 4,5), una menor acidez pretende desfavorecer la acción enzimática natural, modificando el pH óptimo de catálisis enzimática de la matriz biológica. A su vez, se propone que el aporte del NaOH para elevar el pH del medio favorece la disminución de la oxidación no enzimática de determinados grupos funcionales lábiles presentes en la muestra^[10].

Por esta razón se optimizó el agregado de CaCl₂ utilizando una solución de NaOH conteniendo ácido aminotetraacético en una concentración 100 mM con un pH final de 7,5. Nuevamente se utilizaron las condiciones previas de ensayo utilizando dos cantidades diferentes de CaCl₂ sin el agregado de la solución de EDTA/NaOH y con el agregado de 1 mL de solución EDTA/NaOH.

En la Tabla 7 se ejemplifican las áreas promedio y la desviación estándar de las extracciones de COVs con y sin el agregado de solución EDTA/NaOH con 1,5 g y 2,2 g de CaCl₂.

Tabla 7. Áreas promedio y desviación estándar de COVs extraídos con 1,5 g y 2,2 g de CaCl₂ con y sin EDTA/NaOH.

Analito	CaCl ₂		CaCl ₂ - EDTA/NaOH		CaCl ₂		CaCl ₂ - EDTA/NaOH		Relación A/B
	1,5 g (A)	2,2 g	1,5 g	2,2 g (B)	s 1,5 g	s 2,2 g	s 1,5 g	s 2,2 g	
2-metilfuran	17251	15531	10751	<u>29712</u>	3612	4534	729	638	0,6
1-penten-3-ona	139203	158705	97526	<u>129240</u>	18741	11740	8180	9961	1,1
3-metilbutanol	68991	71938	57409	81064	9276	14774	2733	5739	0,9
<i>cis</i> -3-hexenal	5123774	4692072	6670194	7407521	2219741	1523644	1309137	696085	0,7
<i>trans</i> -2-hexenal	4974520	5478414	4085706	<u>4781914</u>	1351201	832189	770416	597953	1,0
1-nitro pentano	113969	49682	70045	<u>95637</u>	43827	3950	6095	16970	1,2
<i>trans</i> -2-heptenal	1283700	937242	816285	<u>1189062</u>	40284	296044	97249	81240	1,1
octanal	11842	15375	28241	36119	3571	1742	2704	3184	0,3
2-isobutiltiazol	68309	45627	119728	80410	36271	12877	11543	13687	0,8
2-fenil-etanol	217774	146648	113054	<u>182413</u>	46860	22601	18371	10761	1,2
bencilnitrilo	61327	80605	48732	<u>73108</u>	9237	6785	5136	8490	0,8
salicilato de metilo	1382514	1001542	1279514	1670521	241762	126738	97381	266604	0,8
2,4-decadienal	34007	49203	27960	<u>36795</u>	7038	8812	4612	5106	0,9
geranil acetona	51048	31702	30994	<u>47923</u>	4651	8503	2790	5228	1,1

s: desviación estándar con n=3. En color se resaltan los máximos valores de área obtenidos para cada metabolito.

Condiciones: 1 g muestra extraída con fibra de DVB/CAR/PDMS durante 35 min a 50 °C con 1,5 y 2,2 g de CaCl₂ con y sin solución de EDTA/NaOH 100mM pH=7.

En subrayado se resaltan los máximos valores entre las dos condiciones de interés utilizando EDTA/NaOH.

Relación A/B: Área promedio 1,5 g CaCl₂ / Área promedio 2,2 g CaCl₂-EDTA/NaOH.

En las Figuras 15 y 16 se grafican las áreas promedio de los analitos bajo las cuatro condiciones diferentes de preparación de muestra.

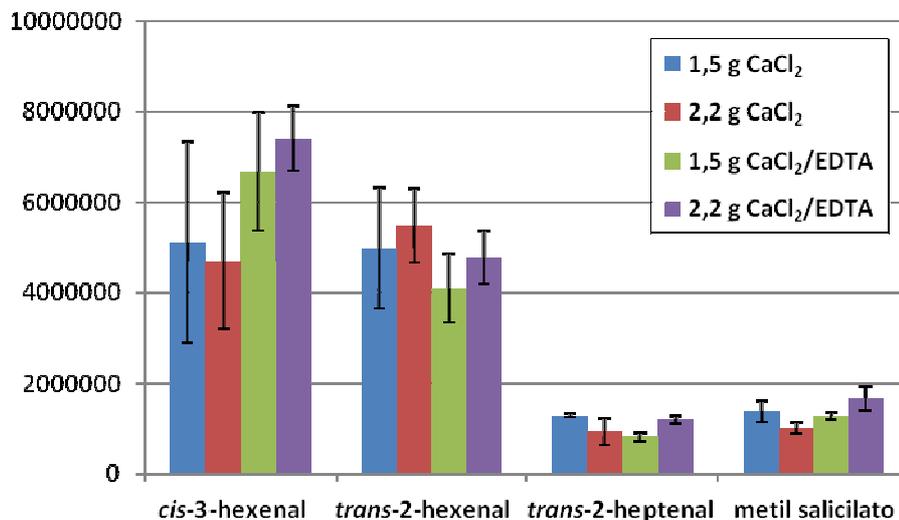


Figura 15. Áreas promedio de COVs obtenidas utilizando CaCl₂ y CaCl₂-EDTA/NaOH. Asteriscos indican resultados estadísticamente diferentes (ANOVA $\alpha=0,05$) para cada COVs en las distintas condiciones ensayadas.

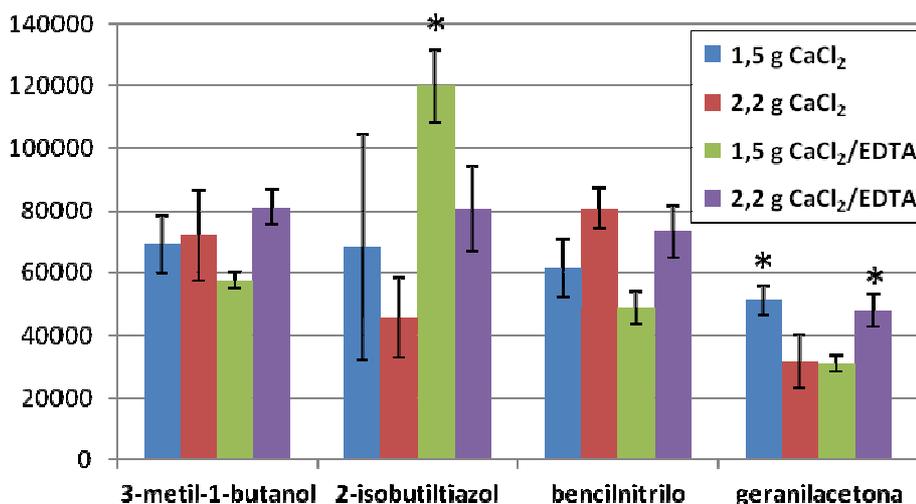


Figura 16. Áreas promedio de COVs obtenidas utilizando CaCl₂ y CaCl₂-EDTA/NaOH. Asteriscos indican resultados estadísticamente diferentes (ANOVA $\alpha=0,05$) para cada COVs en las distintas condiciones ensayadas.

Los resultados observados en la tabla y los gráficos demuestran que las señales obtenidas con el agregado de la solución de EDTA/NaOH, en general, son levemente menores que sin la adición de la solución complejante, excepto para *cis*-3-hexenal. Esto puede deberse al efecto de dilución de la matriz original ocasionado por un aumento de la fase acuosa y la consecuente disminución de la concentración de COVs en el nuevo volumen del espacio en cabeza. Por otro lado Cheong en 2011, postuló que la dilución de una matriz compleja conteniendo interferentes puede ser beneficiosa para promover la salida de COVs afectados por la propia naturaleza del medio^[11].

Por otro lado, comparando las condiciones 1,5 g y 2,2 g de CaCl₂ con EDTA/NaOH, se observó que para casi todos los COVs, excepto para 2-isobutiltiazol, las

mayores señales obtenidas en los cromatogramas fue utilizando la mayor cantidad de CaCl_2 , 2,2 g. Este tratamiento fue considerado el parámetro óptimo utilizando una solución de agente acomplejante, EDTA/NaOH pH=7.

En la columna Relación A/B se expone el cociente de las áreas promedio obtenidas con 1,5 g de CaCl_2 (A) y 2,2 g de CaCl_2 con EDTA/NaOH (B). Es importante comparar estos tratamientos debido a que fueron las mejores condiciones alcanzadas en los dos últimos ensayos realizados. Puede observarse que las áreas obtenidas fueron muy similares entre sí, teniendo una relación de áreas promedio cercana a uno en casi todos los casos, excepto para 2-metilfurano, *cis*-3-hexenal y octanal. En base a estos resultados puede observarse que no hubo mejoría en los niveles de áreas promedio de los COVs extraídos respecto de la mejor condición previa, 1,5 g CaCl_2 . Sin embargo, si fue posible encontrar diferencias notorias en la variabilidad de los resultados.

En la Tabla 8 se ejemplifican los CV% de los COVs relevados en las cuatro condiciones de extracción anteriores.

Tabla 8. Coeficientes de variación porcentual de las condiciones con CaCl_2 y CaCl_2 -EDTA/NaOH y relaciones de áreas promedios.

Analito	CaCl_2		CaCl_2 - EDTA/NaOH	
	CV% 1,5 g (A)	CV% 2,2 g	CV% 1,5 g	CV% 2,2 g (B)
2-metilfurano	21	15	7	4
1-penten-3-ona	13	7	8	8
3-metil-1-butanol	13	21	5	7
<i>cis</i> -3-hexenal	43	32	20	9
<i>trans</i> -2-hexenal	27	15	19	13
1-nitropentano	38	8	9	18
<i>trans</i> -2-heptenal	3	32	12	7
octanal	30	11	7	11
2-isobutiltiazol	53	28	10	17
2-feniletanol	22	15	16	6
bencilnitrilo	15	8	11	12
salicilato de metilo	17	13	8	16
2,4-decadienal	21	18	16	14
geranil acetona	9	27	9	11
CV% Promedio	23	18	11	11

CV%: coeficiente de variación porcentual.

A: Área promedio 1,5 g CaCl_2 . B: Área promedio 2,2 g CaCl_2 -EDTA/NaOH: las dos últimas condiciones optimizadas.

Los coeficientes de variación porcentual para cada tratamiento fueron: 23 % para 1,5 g de CaCl_2 , 18 % para 2,2 g CaCl_2 , 11 % para 1,5 g CaCl_2 -EDTA/NaOH y 11 % para 2,2 g CaCl_2 -EDTA/NaOH. Claramente, el agregado de la solución del agente quelante produce una reducción de la dispersión. Como fue mencionado antes, este efecto puede deberse a una disminución del metabolismo remanente en el material analizado producto de la interacción del CaCl_2 y el agente acomplejante, EDTA.

Estos resultados demuestran una diferencia mínima en las áreas de los COVs entre los dos ensayos, pero una gran ventaja respecto de la variabilidad analítica.

Diferentes estudios sobre la determinación de COVs con SPME en matrices vegetales y derivados han informado resultados afectados por la dispersión entre un 0,4 % y 14,7 %, mientras que en la extracción con solventes orgánicos pueden producirse variaciones entre el 19 % y hasta el 150 %^[21, 24, 25].

En conclusión, el agregado de EDTA disuelto en una solución de NaOH permite controlar la dispersión de los resultados en un método de determinación de COVs que presenta una matriz biológica de alta complejidad. Los datos surgentes de este protocolo de trabajo facilitarán el análisis multivariado de los mismos mediante diferentes técnicas estadísticas, como Análisis de Componentes Principales o Análisis de Conglomerados, permitiendo determinar diferencias y similitudes entre las muestras reales de tomates^[26].

Conclusiones

El método de extracción de COVs del fruto del tomate por medio de la técnica de microextracción en fase sólida (HS-SPME-GC/MS) ha permitido obtener un perfil de metabolitos volátiles en forma sencilla. En un principio los parámetros afectados en el proceso de extracción necesariamente debieron optimizarse rigurosamente para controlar en forma eficiente el método de determinación con carácter analítico. El proceso de optimización demandó gran cantidad de tiempo y ensayos ya que fueron necesarias muchas repeticiones analíticas. Además de los parámetros relacionados al proceso de extracción, han tenido que considerarse los procesos biológicos naturales que sufre la muestra que pueden generar cambios notorios en el perfil definitivo de los analitos de interés. Si bien, otros métodos de análisis de COVs por SPME^[4] y Análisis de Espacio de Cabeza Dinámico^[27, 28] han sido reportados previamente, la ventaja lograda en esta metodología de estudio es la utilización de un volumen de muestra mínimo.

En el proceso de optimización se consideró la complejidad de las diferentes moléculas volátiles presentes en el fruto, las limitaciones de la técnica de extracción y los procesos metabólicos que afectan la matriz. De este modo se logró diseñar un esquema de ensayos que permitió encontrar el parámetro más acorde para cada condición.

Finalmente, las condiciones definitivas del método de determinación de COVs presentó una temperatura óptima de 50 °C con un tiempo de extracción de 35 min utilizando una fibra de SPME compuesta por DVB/CAR/PDMS y el agregado de 2,2 g de CaCl₂-EDTA/NaOH a 1 g de muestra. Estos parámetros se utilizarán para el estudio de COVs en las muestras reales de interés.

Cabe mencionar que el esfuerzo de obtener un protocolo de trabajo estable dio origen a un método de análisis de metabolitos volátiles y semivolátiles con un desempeño analítico de baja variabilidad y adaptable a otras matrices similares de elevada complejidad biológica. Los resultados preliminares de una estancia laboral realizada en el Instituto Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) en la ciudad de Córdoba, Andalucía, España en los meses de abril y junio de 2012, demostraron que este protocolo de análisis puede adaptarse al estudio de fresas y arándanos con mínimos ajustes sobre los parámetros de extracción.

Referencias

- [1] **Jia M, Zhang QH, Min DB.** Optimization of Solid-Phase Microextraction Analysis for Headspace Flavor Compounds of Orange Juice. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, 46:2744-2747.
- [2] **ASTM.** ASTM D 6520-00: Standard Practice for the Solid Phase Micro Extraction (SPME) of Water and its Headspace for the Analysis of Volatile and Semi-Volatile Organic Compounds. pp. 1094-1099: ASTM International; 2000:1094-1099.
- [3] **Holt RU.** Mechanisms effecting analysis of volatile flavour components by solid-phase microextraction and gas chromatography. *J. Chromatogr. A*, 2001, 937:107-114.
- [4] **Figueira J, Câmara H, Pereira J, Câmara JS.** Evaluation of Volatile Metabolites as Markers in *Lycopersicon esculentum* L. Cultivars Discrimination by Multivariate Analysis of Headspace Solid Phase Microextraction and Mass Spectrometry Data. *Food Chem.*, 2014, 145:653-663.
- [5] **Sun SY, Jiangb WG, Zhao YP.** Characterization of the aroma-active compounds in five sweet cherry cultivars grown in Yantai (China). *Flavour Frag. J.*, 2010, 25:206-213.
- [6] **Cagliero C, Bicchi C, Cordero C, Rubiolo P, Sgorbini B, Liberto E.** Fast headspace-enantioselective GC–mass spectrometric-multivariate statistical method for routine authentication of flavoured fruit foods. *Food Chem.*, 2012, 132:1071-1079.
- [7] **Du X, Plotto A, Baldwin E, Rouseff R.** Evaluation of Volatiles from Two Subtropical Strawberry Cultivars Using GC Olfactometry, GC-MS Odor Activity Values, and Sensory Analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 2011, 59:12569-12577.
- [8] **Zhang Z, Pawliszyn J.** Headspace solid-phase microextraction. *Anal. Chem.*, 1993, 65:1843-1852.
- [9] **Arthur CL, Pawliszyn J.** Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. *Anal. Chem.*, 1990, 62:2145-2148.
- [10] **Tikunov YM, Verstappen FWA, Hall RD.** Metabolomic Profiling of Natural Volatiles. Headspace Trapping: GC–MS. *Metabolomics: Methods and Protocols*. Editado por Weckwerth W. New Jersey.: Humana Press; 2007.
- [11] **Cheong KW, Tan CP, Mirhosseini H, Chin ST, Che Man YB, Hamid NSA, Osman A, Basri M.** Optimization of equilibrium headspace analysis of volatile flavor compounds of malaysian soursop (*Annona muricata*): Comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry (GC×GC-TOFMS). *Food Chem.*, 2011, 125:1481-1489.
- [12] **Kazeniak SJ, Hall RM.** Flavor Chemistry of Tomato Volatiles. *J. Food Sci.*, 1970, 35:520-530.
- [13] **Yang X, Peppard T.** Solid-Phase Microextraction for Flavor Analysis. *J. Agr. Food Chem.*, 1994, 42:1925-1930.
- [14] **Steffen A, Pawliszyn J.** Analysis of Flavor Volatiles Using Headspace Solid-Phase Microextraction. *J. Agr. Food Chem.*, 1996, 44:2187-2193.
- [15] **Canuti V, Conversano M, Calzi ML, Heymann H, Matthews MA, Ebeler SE.** Headspace solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry for profiling free volatile compounds in Cabernet Sauvignon grapes and wines. *J. Chromatogr. A*, 2009, 1216:3012-3022.
- [16] **Buttery RG, Teranishi R, Ling LC.** Fresh tomato aroma volatiles: a quantitative study. *J. Agr. Food Chem.*, 1987, 35:540-544.
- [17] **Baldwin EA, Scott JW, Shewmaker CK, Schuch W.** Flavor Trivia and Tomato Aroma: Biochemistry and Possible Mechanisms for Control of Important Aroma Components. *Hort. Sci.*, 2000, 35:1013-1022.

- [18] **Bezman Y, Mayer F, Takeoka GR, Buttery RG, Ben-Oliel G, Rabinowitch HD, Naim M.** Differential Effects of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) Matrix on the Volatility of Important Aroma Compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51:722-726.
- [19] **Guinard JX, Marty C.** Time-intensity Measurement of Flavor Release from a Model Gel System: Effect of Gelling Agent Type and Concentration. *J. Food Sci.*, 1995, 60:727-730.
- [20] **Verhoeven HA, Jonker H, De Vos RCH, Hall RD.** Solid Phase Micro-Extraction GC-MS Analysis of Natural Volatile Components in Melon and Rice. *Plant Metabolomics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Editado por Hardy NW, Hall RD: Springer; 2012
- [21] **Tikunov Y, Lommen A, de Vos CH, Verhoeven HA, Bino RJ, Hall RD, Bovy AG.** A novel approach for nontargeted data analysis for metabolomics. Large-scale profiling of tomato fruit volatiles. *Plant Physiol.*, 2005, 139:1125-1137.
- [22] **Zanor MI, Rambla JL, Chaib J, Steppa A, Medina A, Granell A, Fernie AR, Causse M.** Metabolic characterization of loci affecting sensory attributes in tomato allows an assessment of the influence of the levels of primary metabolites and volatile organic contents. *J. Exp. Bot.*, 2009, 60:2139-2154.
- [23] **Tikunov YM, de Vos RCH, Gonzalez Paramas AM, Hall RD, Bovy AG.** A Role for Differential Glycoconjugation in the Emission of Phenylpropanoid Volatiles from Tomato Fruit Discovered Using a Metabolic Data Fusion Approach. *Plant Physiol.*, 2009, 152:55-70.
- [24] **Zhang Z-M, Li G-K.** A preliminary study of plant aroma profile characteristics by a combination sampling method coupled with GC-MS. *Microchem. J.*, 2007, 86:29-36.
- [25] **Vas G, Gál L, Harangi J, Dobo A, Vékey K.** Determination of Volatile Aroma Compounds of Blaufrankisch Wines Extracted by Solid-Phase Microextraction. *J. Chromatogr. Sci.*, 1998, 36:505-510.
- [26] **Dobson G, Shepherd T, Marshall R, Verrall SR, Conner S, Griffiths DW, McNicol JW, Stewart D, Davies HV.** Application of Metabolite and Flavor Volatile Profiling to Studies of Biodiversity in Solanum Species. *Concepts in Plant Metabolomics*. Editado por Nikolau BJ, Wurtele ES: Springer.; 2007: 259-268.
- [27] **Tieman DM, Zeigler M, Schmelz EA, Taylor MG, Bliss P, Kirst M, Klee HJ.** Identification of loci Affecting Flavour Volatile Emissions in Tomato Fruits. *J. Exp. Bot.*, 2006, 57:887-896.
- [28] **Goulet C, Mageroy MH, Lam NB, Floystad A, Tieman DM, Klee HJ.** Role of an esterase in flavor volatile variation within the tomato clade. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2012, 109:19009-19014.

Capítulo IV

Análisis Sensorial de los Frutos de Tomate

ANÁLISIS SENSORIAL DE LOS FRUTOS DE TOMATE

Evaluación Sensorial

El análisis sensorial es una apreciada herramienta que brinda información de estimado valor sobre un producto alimenticio. Este análisis es muy valorado por diferentes sectores dedicados a los alimentos, ofreciendo datos referidos a la calidad, aceptación, preferencia y otras características asociadas a la valoración sensorial^[1]. Toda esta información utilizada en forma rigurosa tiene un carácter científico que puede complementar investigaciones analíticas sobre un producto determinado.

Entre las variables sensoriales más importantes^[2] y regularmente empleadas pueden nombrarse a las siguientes:

- Olor: percepción por medio de los receptores olfativos ubicados en la nariz de sustancias volátiles liberadas por un alimento.
- Gusto: es la percepción en boca y a través de los sensores de la lengua de 5 categorías básicas: ácido, dulce, salado, umami y amargo.
- Color: es la luz reflejada por un alimento y constituye uno de los atributos más importantes.
- Textura: es la propiedad percibida cuando se genera una deformación al masticar o palpar un alimento.
- Aroma: consiste en la percepción de las sustancias olorosas luego de haberse colocado en boca, haciendo que el aire expirado pase las mismas hacia los sensores del olfato en la cavidad nasal.
- Sabor: es una de las propiedades sensoriales más complejas debido a que integra la percepción del olor, el aroma y el gusto.

La evaluación sensorial de un alimento o producto, en general, es llevada a cabo por un grupo de jueces que conforman el panel de catación. Los paneles sensoriales se dividen en tres tipos principales, paneles de expertos, paneles de jueces entrenados y paneles de jueces no entrenados. Los de carácter profesional ofrecen información muy confiable y detallada pero suelen tener un elevado costo en la contratación de sus servicios. Además de contar con un determinado plantel estable de jueces experimentados, es necesario antes de la sesión real de catación entrenar a los panelistas con alimentos modelo que tengan un rango de sabores y olores cercanos a las muestra de interés. Este proceso de entrenamiento puede llevar desde semanas hasta meses. La formación de un panel de catación entrenado es una ardua tarea que exige tiempo y compromiso por ambas partes, tanto por los jueces catadores como por las personas interesadas en los resultados de la evaluación^[3].

En el caso de esta tesis los panelistas fueron individuos no entrenados en el área, de diferente sexo, edad y condición de fumadores y no fumadores, pero todos coincidentes en consumir regularmente el fruto de tomate. Por esta razón la planilla

confeccionada contenía información simple y concisa que permitiera recuperar datos certeros acerca de los frutos ensayados.

La información obtenida posee mayormente un carácter de apreciación general en las características de *agradabilidad* o *desagradabilidad* en base a las variables cotejadas. Más precisamente en función a los datos obtenidos sobre el olor y el sabor fue posible obtener una tendencia sobre la magnitud de preferencia para cada cultivar^[4].

Seguidamente, los resultados recabados de las encuestas fueron traducidos en frecuencias y valores numéricos que pudieran analizarse individualmente e integrarse en posteriores análisis junto con los datos de metabolitos volátiles. Para el análisis pueden utilizarse diferentes tipos de gráficos, por ejemplo histogramas, gráficos radiales y gráficas de análisis multivariados que son los usualmente más empleados para visualizar y obtener conclusiones acerca de todo el conjunto de datos obtenidos^[5].

La evaluación sensorial de los frutos de tomate se efectuó durante la misma época de cosecha en cada año. Fue necesario obtener una cantidad suficiente de frutos para poder percibir todas las cualidades requeridas en el análisis. A su vez se enfatizó en presentar los frutos en condiciones óptimas y lo más similares a las de consumo habitual.

El proceso de catación fue dividido en tres secciones, una inspección visual del fruto entero, valoración visual de los frutos en mitades y una catación involucrando la ingesta de los frutos^[6].

En la primera etapa se tomaron varios frutos maduros de un mismo cultivar y se dispusieron para observar su morfología, tamaño, color de la piel y presencia de defectos (huecos, manchas). Seguidamente, frutos de la misma variedad fueron cortados en mitades para observar el aspecto que presentaban internamente. Se evaluó la coloración y cantidad de pulpa, cantidad de semillas y presencia de defectos. En última instancia, los frutos fueron rebanados en porciones más pequeñas donde fueron evaluadas las características organolépticas. Por último, fue determinado el olor, sabor, jugosidad, acidez, dulzura, textura de la pulpa y textura de la piel del fruto.

Esta secuencia se repitió con cada uno de los cultivares valorados. Las rondas de evaluación estaban acotadas a no más de 4 cultivares para evitar la fatiga de los panelistas. Entre los genotipos valorados se recomendó beber agua y comer un alimento neutro (galleta de agua) para ayudar a remover la sensación en boca de la muestra previa^[5].

Al inicio de la valoración fue entregada una planilla donde estaban estructurados en orden los pasos a seguir durante la catación, las variables de interés y opciones para comentarios.

Las variables poseían un formato de puntaje de tipo hedónico estructurado donde era necesario marcar la intensidad captada del carácter sensorial. Cada variable sensorial poseía 5 valores de intensidad que podían elegirse en base a la apreciación personal del panelista. Por ejemplo para el sabor, las categorías fueron:

- sabor no característico,
- sabor ligeramente no característico,
- sabor medianamente característico,
- sabor moderadamente característico,
- sabor característico.

Bajo el mismo formato fueron valoradas cada una de las variables de interés durante la catación. Sólo para textura de piel y textura de pulpa se consideró solamente dos categorías, textura adecuada o textura no adecuada. En la Figura 1 se expone el modelo de la ficha de valoración entregada a los jueces que fue utilizada en todas las sesiones de catación desde 2009 hasta el 2012.

En la cosecha 2012 se agregó una nueva sección que permitiera incorporar descriptores más definidos sobre el olor y sabor del fruto^[7]. Las categorías de estos descriptores generales fueron:

- característico a tomate.
- frutal
- floral
- herbáceo-1 (como ejemplo: pasto recién cortado)
- herbáceo-2 (como ejemplo: la planta/hoja de tomate)
- medicinal/artificial
- rancio
- mohoso/terroso
- tomate inmaduro
- otra categoría propuesta por el panelista

De esta manera además de obtener información sobre la preferencia de determinados cultivares, pudo tenerse una orientación acerca de los olores y sabores particulares que se desprendían de cada fruto. En forma general estos se dividen en notas descriptivas de carácter agradable y desagradable.

En la Tabla 1 se esquematizan las variables sensoriales de interés junto con las categorías propuestas que se evaluaron en todas las cosechas realizadas bajo este estudio por medio de la ficha sensorial descripta.

Nombre Edad: Fecha:

Instrucción general para completar la planilla: Por favor, indique a su juicio con una cruz en el casillero que corresponda la evaluación que le daría a la muestra.

MUESTRA N°:

PRUEBA N° 1: TOMATE ENTERO

ASPECTO GENERAL:

	Malo				Excelente
	<input type="checkbox"/>				

COLOR DE LA PIEL:

	Muy pálido				Muy intenso
	<input type="checkbox"/>				

FORMA:

	Irregular				Regular
	<input type="checkbox"/>				

PRUEBA N° 2: TOMATE EN MITADES

COLOR DE LA PULPA:

	Muy pálido				Muy intenso
	<input type="checkbox"/>				

RELACIÓN PULPA/SEMILLA:

	Escasa pulpa				Abundante pulpa
	<input type="checkbox"/>				

Figura 1. Planilla utilizada para la valoración sensorial de frutos de tomate.

DEFECTOS:

	SI	NO
Huecos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Coloración no típica	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Manchas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Otros	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> ¿Cuáles?.....

PRUEBA N° 3: OLOR EN TOMATE
 Huela el frasco que contiene los trozos de tomate de la variedad que está evaluando, y marque lo que ha detectado:

OLOR

	Indefinido	Lig. Indef.	Med. Indef.	Mod. Definido	Muy Definido
	<input type="checkbox"/>				

defina particularmente el tipo de olor que detecta:

1 característico a tomate	<input type="checkbox"/>
2 frutal	<input type="checkbox"/>
3 floral	<input type="checkbox"/>
4 herbáceo (pasto recién cortado)	<input type="checkbox"/>
5 herbáceo (planta de tomate)	<input type="checkbox"/>
6 medicinal/artificial	<input type="checkbox"/>
7 rancio	<input type="checkbox"/>
8 mohoso/terroso	<input type="checkbox"/>
9 tomate inmaduro	<input type="checkbox"/>
10 otro:	<input type="checkbox"/> ¿Cuál?.....

PRUEBA N° 4: TOMATE EN TROZOS

SABOR

	No característico	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Característico
Característico		<input type="checkbox"/>				

	No dulce	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Muy dulce
Dulce		<input type="checkbox"/>				

	No ácido	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Muy ácido
Ácido		<input type="checkbox"/>				

CONTINUACIÓN PRUEBA N° 4: TOMATE EN TROZOS
 Pruebe nuevamente la muestra y marque los sabores que ha detectado:

1 característico a tomate	<input type="checkbox"/>
2 frutal	<input type="checkbox"/>
3 floral	<input type="checkbox"/>
4 herbáceo (pasto recién cortado)	<input type="checkbox"/>
5 herbáceo (planta de tomate)	<input type="checkbox"/>
6 medicinal/artificial	<input type="checkbox"/>
7 rancio	<input type="checkbox"/>
8 mohoso/terroso	<input type="checkbox"/>
9 tomate inmaduro	<input type="checkbox"/>
10 otro:	<input type="checkbox"/> ¿Cuál?.....

Con respecto a la textura de la pulpa: ¿la considera adecuada? SI NO
 ¿Por qué?.....

Con respecto a la textura de la piel: ¿la considera adecuada? SI NO
 ¿Por qué?.....

JUGOSIDAD

	Muy seco	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Muy jugoso
		<input type="checkbox"/>				

COMENTARIOS.....

MUCHAS GRACIAS!

Figura 1. Planilla utilizada para la valoración sensorial de frutos de tomate (continuación).

Tabla 1. Variables Sensoriales

Variable Sensorial	N°	Nombre Variable	Nombre Corto
Valoración General	1	Valoración General-1	VG1
	2	Valoración General-2	VG2
	3	Valoración General-3	VG3
	4	Valoración General-4	VG4
	5	Valoración General-5	VG5
Color de Piel	6	Color de Piel-1	ColPi1
	7	Color de Piel-2	ColPi2
	8	Color de Piel-3	ColPi3
	9	Color de Piel-4	ColPi4
	10	Color de Piel-5	ColPi5
Forma de Fruto	11	Forma de Fruto-1	ForFr1
	12	Forma de Fruto-2	ForFr2
	13	Forma de Fruto-3	ForFr3
	14	Forma de Fruto-4	ForFr4
	15	Forma de Fruto-5	ForFr5
Color de Pulpa	16	Color de Pulpa-1	ColPu1
	17	Color de Pulpa-2	ColPu2
	18	Color de Pulpa-3	ColPu3
	19	Color de Pulpa-4	ColPu4
	20	Color de Pulpa-5	ColPu5
Cantidad de Pulpa	21	Cantidad de Pulpa-1	CanPu1
	22	Cantidad de Pulpa-2	CanPu2
	23	Cantidad de Pulpa-3	CanPu3
	24	Cantidad de Pulpa-4	CanPu4
	25	Cantidad de Pulpa-5	CanPu5
Olor Característico	26	Olor Característico-1	OI1
	27	Olor Característico-2	OI2
	28	Olor Característico-3	OI3
	29	Olor Característico-4	OI4
	30	Olor Característico-5	OI5
Sabor Característico	31	Sabor Característico-1	Sab1
	32	Sabor Característico-2	Sab2
	33	Sabor Característico-3	Sab3
	34	Sabor Característico-4	Sab4
	35	Sabor Característico-5	Sab5
Dulzura	36	Dulzura-1	Dulz1
	37	Dulzura-2	Dulz2
	38	Dulzura-3	Dulz3
	39	Dulzura-4	Dulz4
	40	Dulzura-5	Dulz5
Acidez	41	Acidez-1	Acid1
	42	Acidez-2	Acid2
	43	Acidez-3	Acid3
	44	Acidez-4	Acid4
	45	Acidez-5	Acid5
Jugosidad	46	Jugosidad-1	Jug1
	47	Jugosidad-2	Jug2
	48	Jugosidad-3	Jug3
	49	Jugosidad-4	Jug4
	50	Jugosidad-5	Jug5
Textura Pulpa	51	Textura Pulpa-1	TexPu1
	52	Textura Pulpa-5	TexPu5
Textura Piel	53	Textura Piel-1	TexPi1
	54	Textura Piel-5	TexPi5
Descriptorios de Sabor	1E	Sabor característico	SabToCar
	2E	Sabor frutal	SabFrut
	3E	Sabor floral	SabFlor
	4E	Sabor herbáceo pasto	SabHPast

Variable Sensorial	N°	Nombre Variable	Nombre Corto
	5E	Sabor herbáceo planta	SabHPlant
	6E	Sabor medicinal/artificial	SabMed
	7E	Sabor rancio	SabRanc
	8E	Sabor mohoso/terroso	SabMoho
	9E	Sabor a tomate inmaduro	SabToInma
	10E	Otro Sabor	SabOtro
Descriptores de Olor	11E	Olor característico	OlorToCar
	12E	Olor frutal	OlorFrut
	13E	Olor floral	OlorFlor
	14E	Olor herbáceo pasto	OlorHPast
	15E	Olor herbáceo planta	OlorHPlant
	16E	Olor medicinal/artificial	OlorMed
	17E	Olor rancio	OlorRanc
	18E	Olor mohoso/terroso	OlorMoho
	19E	Olor a tomate inmaduro	OlorToInma
	20E	Otro Olor	OlorOtro

Análisis de los Datos Sensoriales de las Cosechas de Tomate

Los datos sensoriales recogidos de las cosechas 2009, 2010 y 2012 se analizaron por diferentes técnicas estadísticas para obtener la información proveniente de los paneles de catación. Como fue descrito anteriormente, los datos se transformaron en frecuencias (número de panelistas que clasificaron de igual forma una variable sobre el número total de panelistas), de manera que estos datos numéricos permitan mediante análisis estadísticos y gráficos, obtener información acerca de las características sensoriales y la aceptabilidad que presentaba cada uno de los cultivares.

Entre los análisis empleados para esta sección se utilizaron los análisis multivariados^[8, 9] de Análisis de Componentes Principales (ACP) y Análisis de Conglomerados (AC), para obtener una representación gráfica que permita clasificar y agrupar los cultivares estudiados, observar asociaciones entre variables, entre cultivares y asociaciones variables/cultivares^[10].

Las características sensoriales de olor y sabor también fueron analizadas individualmente mediante el uso de gráficos radiales para determinar en forma simplificada la percepción de los panelistas y obtener una idea sobre su aceptabilidad. En este último caso fue necesario realizar un promedio de las 5 categorías diferentes que engloba cada variable sensorial^[9].

Para normalizar el proceso cada frecuencia se multiplicó por un factor determinado para cada categoría de acuerdo a la importancia en el desarrollo de la propiedad sensorial. Para todas las variables y a modo de ejemplo para el olor, se siguió un esquema idéntico al presentado a continuación:

- Frecuencia de olor no característico (O1) $\times 0.10$
- Frecuencia de olor ligeramente característico (O2) $\times 0.25$
- Frecuencia de olor medianamente característico (O3) $\times 0.50$
- Frecuencia de olor moderadamente característico (O4) $\times 0.75$
- Frecuencia de olor característico (O5) $\times 1.0$

Sobre el mismo plano puede ubicarse en la Figura 3 la localización de los cultivares.

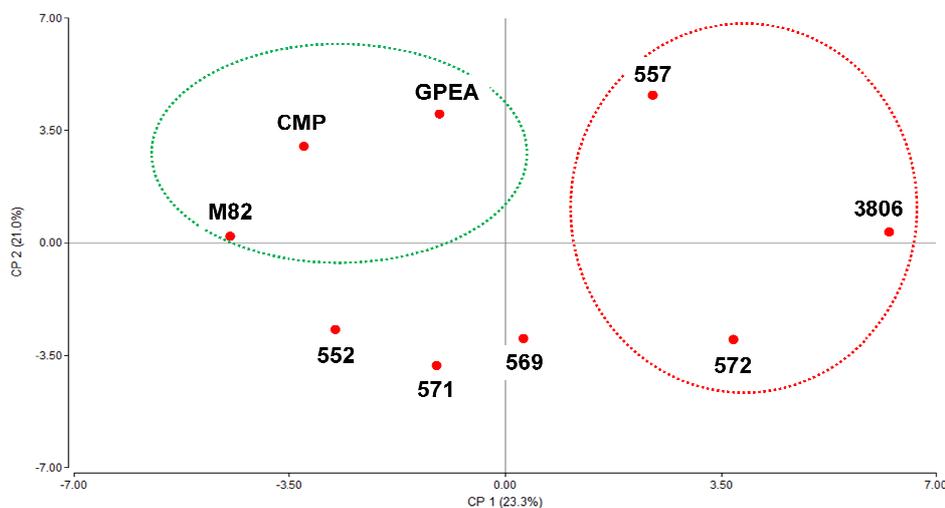


Figura 3. Análisis de Componentes Principales de las variables sensoriales de la cosecha 2009. Cultivares de la cosecha 2009.

La disposición de las variedades estudiadas sugiere una distribución a lo largo de todo el plano, presentando escasa cercanía entre las muestras y formando con poca consistencia asociaciones entre ellos.

Sin embargo, puede observarse sobre los valores positivos el eje CP1 que los cultivares 572, 557 y principalmente 3806, se asociaron fuertemente con las variables de mayor valoración (zona demarcada en rojo). Los cultivares se asociaron con Sabor-5, Acidez-5, Textura de Pulpa-5, Olor-5, Cantidad de Pulpa-5, Color de Pulpa-5, Textura de Piel-5, Dulzura-5 y Color de Piel-5. El otro eje CP2 permitió separar los cultivares 572 y 557 asociando el primero de ellos con las variables Jugosidad-5, Valoración General-5 y Color de Piel-1. En cambio la variedad 557 se asoció con mayor fuerza con Dulzura, Color de Piel y Sabor en su mayor calidad.

A su vez, los cultivares M82, CMP, GPEA se encuentran situados en la zona donde las variables sensoriales presentan su más baja categoría, sobre los valores negativos del eje CP1 (zona demarcada en verde). Entre las variables asociadas pueden nombrarse a Olor-1, Cantidad de Pulpa-1, Dulzura-1, Color de Pulpa-1, Textura de Pulpa-1, Sabor-1 y Textura de Piel-1.

Los demás cultivares que conformaron la cosecha, 552, 571 y 569 se encontraron en las inmediaciones de estos grupos mencionados y se asociaron con variables de calidad intermedia.

La asociación entre cultivares puede visualizarse también por medio de un AC esquematizado en la Figura 4. El gráfico permite identificar agrupaciones basadas en distancias euclídeas, donde la similitud entre dos individuos es proporcional a la distancia a la cual se unen entre sí formando un grupo. Las asociaciones de mayor fuerza se presentan en distancias inferiores al 50 % de la distancia máxima. En el caso de la cosecha 2009 pudo observarse que las asociaciones tomaron lugar en distancias mayores al 50 % informando asociaciones débiles entre las variedades ensayadas. La primera

asociación entre los cultivares, 571 y 569, surgió luego de la primera mitad de la máxima distancia. El resto de los grupos se conformaron a distancias aun mayores denotando una baja similitud entre las muestras analizadas bajo las variables sensoriales

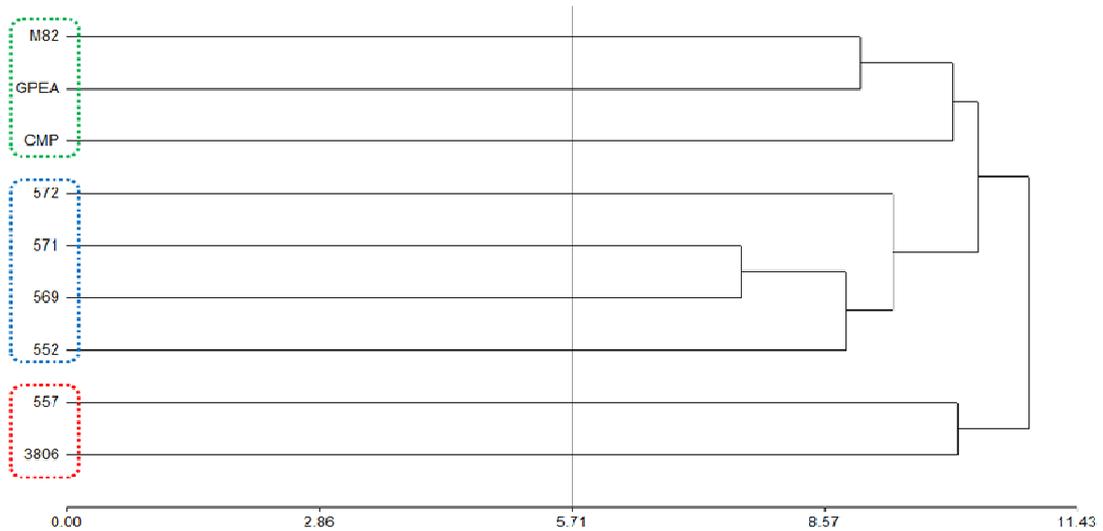


Figura 4. Análisis de Conglomerados de las variables sensoriales de la cosecha 2009. Cultivares de la cosecha 2009. (Algoritmo de Clasificación: Encadenamiento Promedio, Distancia: Euclídea).

Por otro lado, el análisis individual sobre el olor y sabor de los frutos fue simplificado en la representación de gráficos radiales en la Figura 5. De ellos puede observarse que para el olor, los frutos menos aceptados fueron 571, M82 y GPEA, por otra parte los más aceptados para esta característica fueron 3806, 557 y 572.

Bajo el mismo concepto fue tratado el sabor, encontrándose que los cultivares CMP, M82 y GPEA presentaron los menores valores de aceptación. En cambio los frutos catalogados como los más aceptados en base a su sabor fueron 572, 557 y 572.

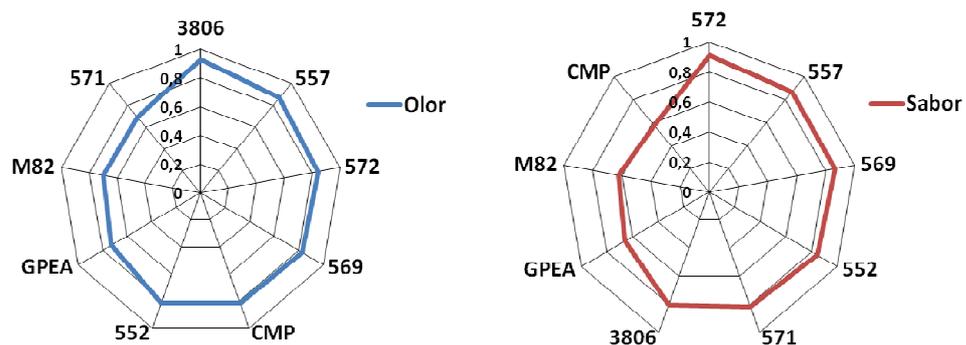


Figura 5. Promedios de olor y sabor de la cosecha 2009.

Cosecha 2010

El estudio de la cosecha 2010 se inició por medio de un ACP analizando la totalidad de los cultivares descriptos en el Capítulo II.

En la Figura 6 se grafica el plano bidimensional conformado por las dos componentes principales, CP1 y CP2, permitiendo explicar el 50,9 % de la variabilidad total de los datos. En el plano se observó una separación de las variables sensoriales de mayor y menor aceptación. En el eje CP1 pudo visualizarse la mayor separación de variables, las de mayor valoración (demarcadas en rojo) ubicadas en los valores negativos del eje y las variables de menor valoración (demarcadas en verde) situadas en el extremo opuesto del mismo eje. La componente vertical, CP2, presentó mayor polarización sobre las variables acidez y dulzura en sus extremos.

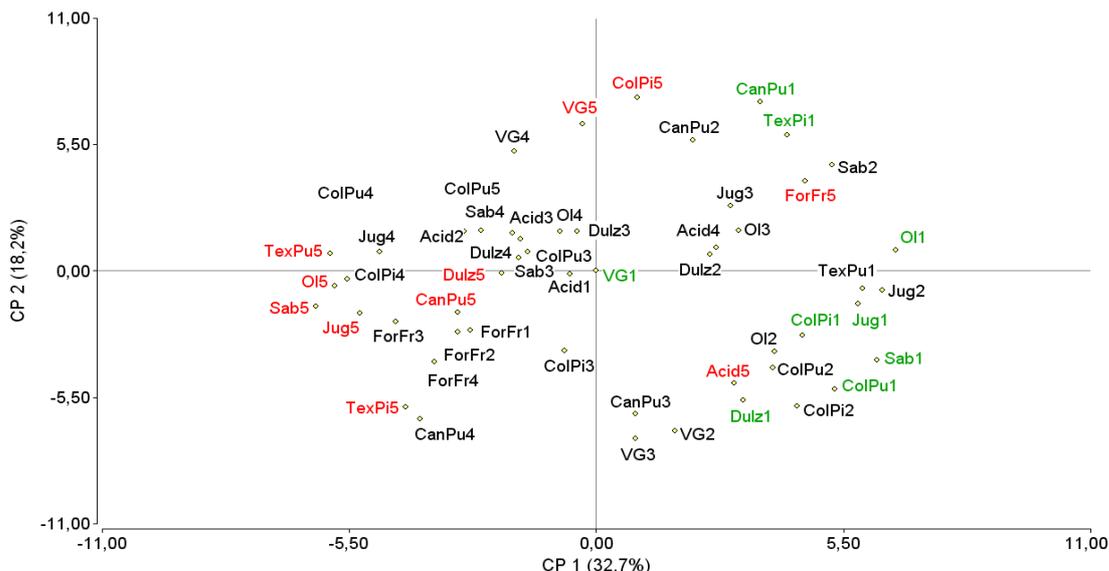


Figura 6. Análisis de Componentes Principales de las diferentes categorías de cada variable sensorial de la cosecha 2010. Las categorías de mayor aceptación se destacan en rojo y las categorías de menor aceptación se destacan en verde.

La distribución de los cultivares de la cosecha 2010 en el mismo plano bidimensional se grafica en la Figura 7.

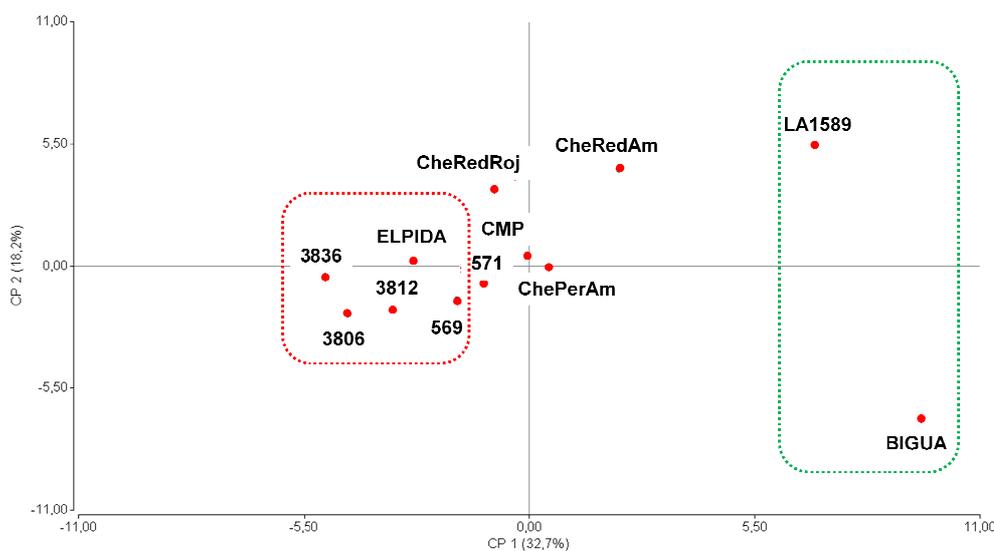


Figura 7. Análisis de Componentes Principales de las variables sensoriales de la cosecha 2010. Cultivares de la cosecha 2010.

La distribución de las variedades demostró que BIGUA y LA1589 (zona demarcada en verde) fueron las accesiones sensorialmente más diferentes en toda la cosecha. Estas variedades se ubicaron sobre los valores más distales del eje CP1, lejanas entre si y a su vez del resto de los demás cultivares.

En el sector de valores negativos del mismo eje se encuentran más cercanos entre ellos los cultivares 3836-3806-3812-ELPIDA-569-571 (zona demarcada en rojo). Mientras que cerca del origen de la gráfica se encuentra otro pequeño grupo de cultivares conformado por CMP-ChePerAm. Pudo observarse también que la variedad CheRedRoj se ubicó cercano al grupo más numeroso de variedades, mientras que CheRedAm se posicionó más aislado y más próximo de los cultivares BIGUA y LA1589.

La asociación entre variables y cultivares se denota fuertemente en la porción derecha de las gráficas, donde se ubica el grupo conformado por BIGUA y LA1589. Estas variedades se relacionan a las variables de menor calidad, Sabor-1, Olor-1, Color de Pulpa-1, Color de Piel-1, Jugosidad-1, Textura de Piel-1, Textura de Pulpa-1 y Cantidad de Pulpa-1. Las asociaciones observadas se explican debido a que la especie silvestre *S. pimpinellifolium* (LA1589) presenta características sensoriales muy alejadas del clásico olor y sabor característico del tomate. Sumado a lo anterior, el cultivar BIGUA es una variedad de tomate comestible de tipo redondo para consumo en fresco denominado "de larga vida" que tiene características sensoriales generales muy poco desarrolladas generando un bajo impacto sobre el consumidor. Por distintas circunstancias intrínsecas de estos dos frutos tan opuestos se observa una evidente asociación a las características negativas.

En las cercanías de este grupo también se encuentran Color de Piel-5, Forma de Fruto-5 y Valoración General-5, estas variables pueden explicarse más puntualmente al cultivar silvestre, debido a que presenta frutos pequeños, muy regulares y con un intenso color rojo influenciando la ubicación de las variables en la cercanía donde se sitúa LA1589. En la Figura 8 es posible observar las diferencias morfológicas contrastantes que poseen los frutos de estas especies.



Figura 8. Frutos de las variedades BIGUA y LA1589 (*S. pimpinellifolium*).

El grupo 3836-3806-3812-ELPIDA-569 y los cultivares 571 y CheRedRoj se encuentran en la sección de valores negativos del eje CP1, donde están ubicadas las mejores características esperadas para un tomate de buena calidad sensorial. El Grupo 3836-3806-3812-ELPIDA-569 está conformado por tres cultivares de frutos de tipo redondo (3836, 3812 y ELPIDA) y 3806-569 de tipo perita. En las cercanías de este grupo

están distribuidas en forma próxima las variables Jugosidad-5, Textura de Pulpa-5, Textura de Piel-5, Cantidad de Pulpa-5, Dulzura-5, Sabor-5 y Olor-5. Puede considerarse que la expresión de estas características en los frutos del Grupo 3836-3806-3812-ELPIDA-569 presenta la mejor combinación que puede ser detallada por los jueces del panel sensorial.

Un poco más alejado de este grupo de variables de buena calidad, se encuentran los cultivares 571 y CheRedRoj. La variedad 571 produce un fruto tipo perita y CheRedRoj un tomate pequeño de tipo cherry. A pesar de poseer diferencias morfológicas muy distintas entre sí, tienen en común determinadas características medias que se asocian a ellos. La mayoría de las categorías 3 y 4 de las variables sensoriales se encuentran muy próximas a estos genotipos.

Por último, los cultivares CMP, ChePerAm y CheRedAm, un poco más alejado, están ubicados muy próximos al origen de los ejes CP1 y CP2, en medio de las zonas donde se distribuyen los polos de variables de mayor y menor calidad. Todos los cultivares de este último grupo producen frutos de tipo cherry. Las variables más cercanas que acompañan este grupo son Coloración de Piel-5, Forma de Fruto-5 y Valoración General-5. Debido a que la morfología de los frutos es de tipo cherry, al igual que los frutos de *S. pimpinellifolium*, presentan un aspecto muy regular con una pareja e intensa coloración de piel, estas características de tipo visual en general impactan de forma directa sobre la variable valoración general. Además estos frutos se correlacionan con variables de mediana calidad como Dulzura-3, Acidez-4, Jugosidad-3, Olor-3 y Coloración de Pulpa-3, que sólo es posible evaluarlas al ingerir los frutos de las variedades.

El AC permite asociar los cultivares de acuerdo a la similitud que presentan. En primer caso se puede observar que sólo dos cultivares, ELPIDA y 3836, se asocian entre sí antes del 50% de la distancia máxima. Este comportamiento denota que no hay una marcada cercanía entre los cultivares de la cosecha de acuerdo a las variables analizadas.

Sin embargo, en las inmediaciones de este límite comienzan a conformarse los demás grupos de cultivares, que guardan una relación similar con las gráficas de ACP. El grupo de genotipos que se relacionaba con las mejores variables sensoriales presenta una tendencia a asociarse incluyendo las variedades 3806, CMP, 3812, CheRedRoj, 571, 569, ELPIDA y 3836. En el caso de los cultivares cherry de coloración amarilla, se asociaron entre sí ChePerAm y CheRedAm, denotando una gran cohesión para luego anexarse al grupo anterior de mayor tamaño. Es importante destacar también el agrupamiento tardío de los cultivares LA1589 y BIGUA a las restantes muestras debido a la gran diferencia sensorial sobre los demás cultivares de la cosecha.

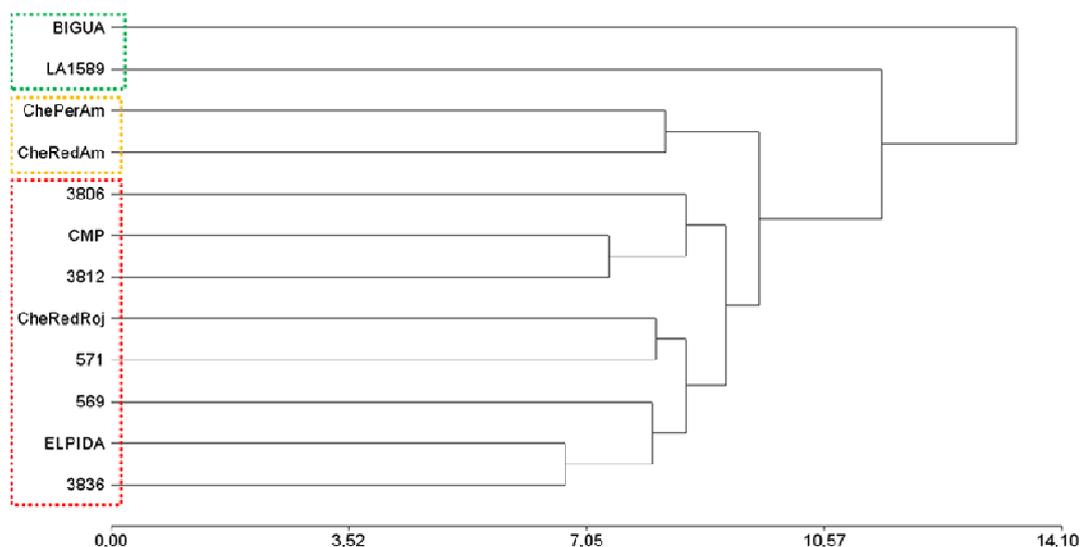


Figura 9. Análisis de Conglomerados de la cosecha 2010.
Cultivares de la cosecha 2010.

(Algoritmo de Clasificación: Encadenamiento Promedio, Distancia: Euclídea).

El estudio individual del Olor para la cosecha 2010 presenta como mejores exponentes los cultivares CheRedRoj, 569, 3812 y ELPIDA. Al contrario de ellos, los cultivares con menor apreciación en el olor fueron BIGUA, LA1589 y CMP, siendo los dos primeros los que más variables sensoriales negativas aglomeran en el plano bidimensional de componentes principales.

Para el sabor los cultivares de mejor aceptabilidad fueron 3836, 3806 y CMP sorpresivamente, ya que en la valoración olfativa fue catalogado como uno de los menos apreciados. Respecto de las variedades con menor aceptabilidad para el sabor, se encuentran BIGUA, LA1589 y los dos frutos cherrys con coloración amarilla, ChePerAm y CheRedAm.

En la Figura 10 se ejemplifican en los gráficos radiales los promedios de las variables olor y sabor de la cosecha 2010.

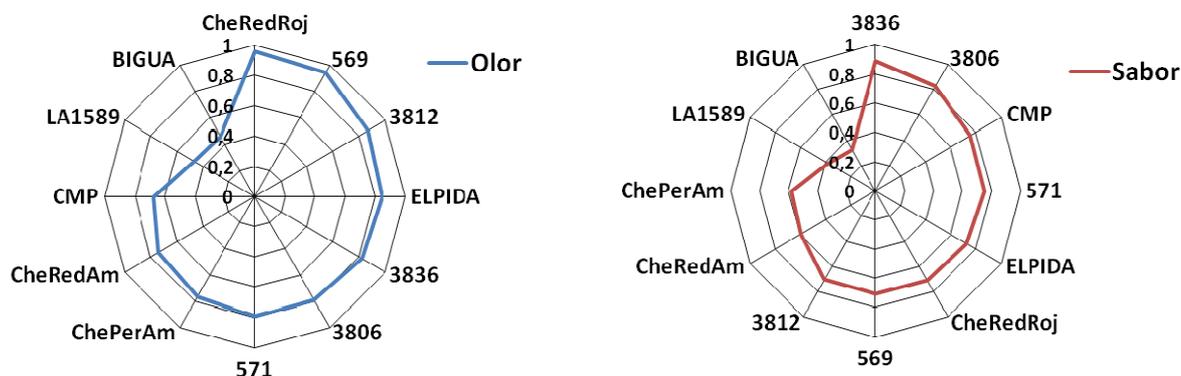


Figura 10. Promedios de olor y sabor de la cosecha 2010.

Cosecha 2012

Los cultivares de la cosecha 2012 se analizaron mediante las técnicas multivariadas descritas en base a las variables sensoriales que los caracterizaron. Los

análisis de ACP sobre la cosecha 2012 permitieron observar una sectorización de las variables sensoriales sobre el plano de los gráficos.

En la Figura 11 es posible observar que las dos primeras componentes, CP1 y CP2, cubrieron el 41 % de la variabilidad de los datos. En la primera de ellas, CP1, permitió separar las máximas (color rojo) y mínimas (color verde) categorías de las variables sabor, olor, textura de piel, textura de pulpa, jugosidad, dulzura y cantidad de pulpa. En la sección de los valores negativos del eje CP1, se ubicaron las categorías de mayor aceptación mientras que en el sector opuesto lo hicieron las categorías de menor calificación. Esto permite observar, al igual que en las cosechas anteriores que este grupo de variables de altas y bajas calificaciones tienden a asociarse entre ellas.

Sin embargo, pueden destacarse algunas excepciones particulares como el caso de las variables Forma de Fruto-5 y Color de Piel-5 que se encontraron a corta distancia del centroide que agrupa las variables sensoriales de menor calidad. También puede nombrarse la ubicación de las variables Forma de Fruto-1, Color de Pulpa-1, Valoración General-1 muy próximas al área del plano que conglera la mayoría de las variables de mayor apreciación. Estas últimas variables mencionadas tuvieron más influencia sobre el eje vertical CP2, exponiendo la mayor separación en las categorías de las variables color de piel y color de pulpa.

Un detalle que es importante resaltar es acerca de la valoración general. Esta variable se encuentra muy influenciada por otras de tipo visual como por ejemplo color de piel, color de pulpa y forma de fruto. Puede observarse que en la cercanía de los valores máximos y mínimos de valoración general se asocian las variables de tipo visual mencionadas en categorías similares.

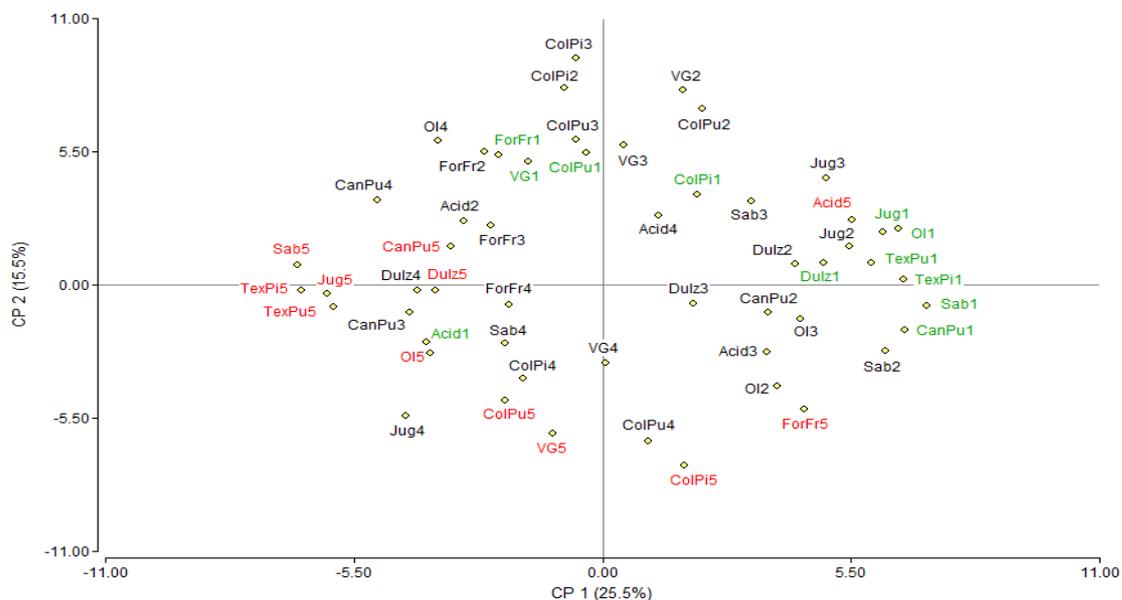


Figura 11. Análisis de Componentes Principales de las diferentes categorías de cada variable sensorial de la cosecha 2012. Las categorías de mayor aceptación se destacan en rojo y las categorías de menor aceptación se destacan en verde.

En cuanto a los cultivares que componen el análisis, en la Figura 12 puede visualizarse que en la sección izquierda del plano se encuentran aglomerados la mayoría de los cultivares, indiferentemente de su morfología (perita, redondo o cherry) y del lado

derecho del gráfico se encuentran las variedades de menor aceptación, el cultivar silvestre LA1589, BIGUA, 3815 y M82. De la misma manera que en el año 2010, la especie *S. pimpinellifolium*, LA1589, es la muestra de mayor contraste en la cosecha, e incluso para el pequeño grupo de frutos asociados a valores de baja calidad.

Metabólicamente la especie silvestre expresa un perfil de compuestos volátiles y no volátiles diferente a la especie domesticada^[11], produciendo un impacto sensorial poco aceptado. Coincidentemente con la cosecha previa, puede observarse el cultivar BIGUA ubicado entre los frutos asociados a los bajos puntajes sensoriales, agregándose M82 y 3815 en este caso.

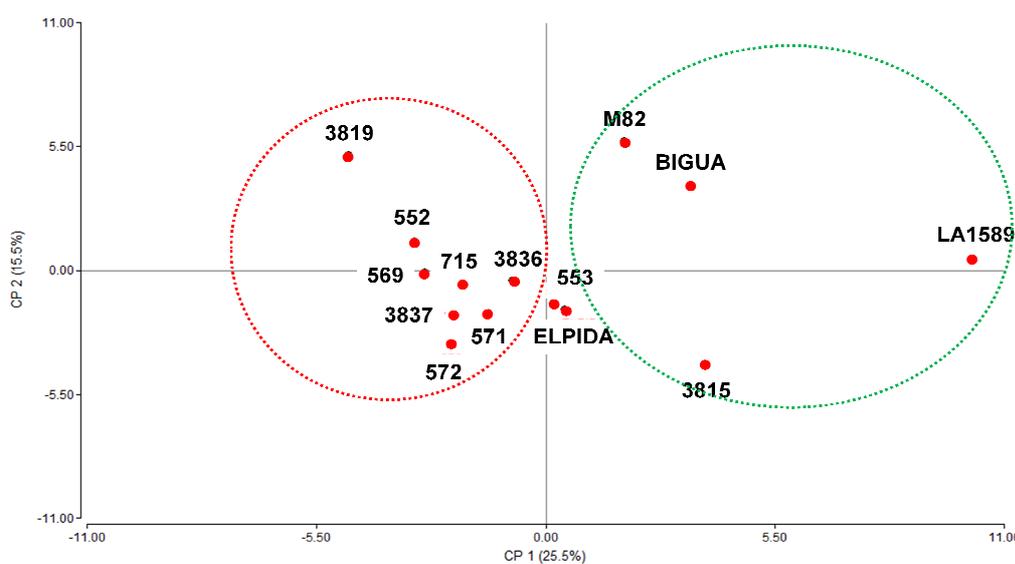


Figura 12. Análisis de Componentes Principales. Cultivares de la cosecha 2012.

Los cultivares 3815 y LA1589 de tipo cherry presentan un aspecto muy regular y coloración muy intensa, por lo cual condicionan la posición de estas variables (en su mayor categoría) en el espacio donde se encuentran ubicadas estas variedades. En el caso de Forma de Fruto-1, Color de Pulpa-1, se encuentran ubicados en una región del gráfico delimitada por 3819 (conocido como Corazón de Buey) y 3836. Los frutos tienen una morfología de tipo redondo, de aspecto grande, acostillado y forma poco definida, estas características visuales poseen una gran influencia en el aspecto general del fruto y consecuentemente sobre la baja puntuación de las variables en cuestión.

Precisamente sobre esta zona centro-izquierda de la gráfica se produce la mayor concentración de cultivares. Las variedades 552, 569, 715, 3837, 572, 571, 3836 y un poco más lejano 3819, sobre estos mismos recae la asociación de las variables sensoriales en su máxima condición. La combinación de estas variables en los frutos mencionados promueve las mejores sensaciones consideradas por los jueces del panel.

El AC permite observar algunas asociaciones entre las variedades estudiadas frutos que no se visualizan tan evidentemente en las gráficas de los ACP. En la Figura 13 se ejemplifica el dendrograma del análisis de conglomerados de la cosecha 2012.

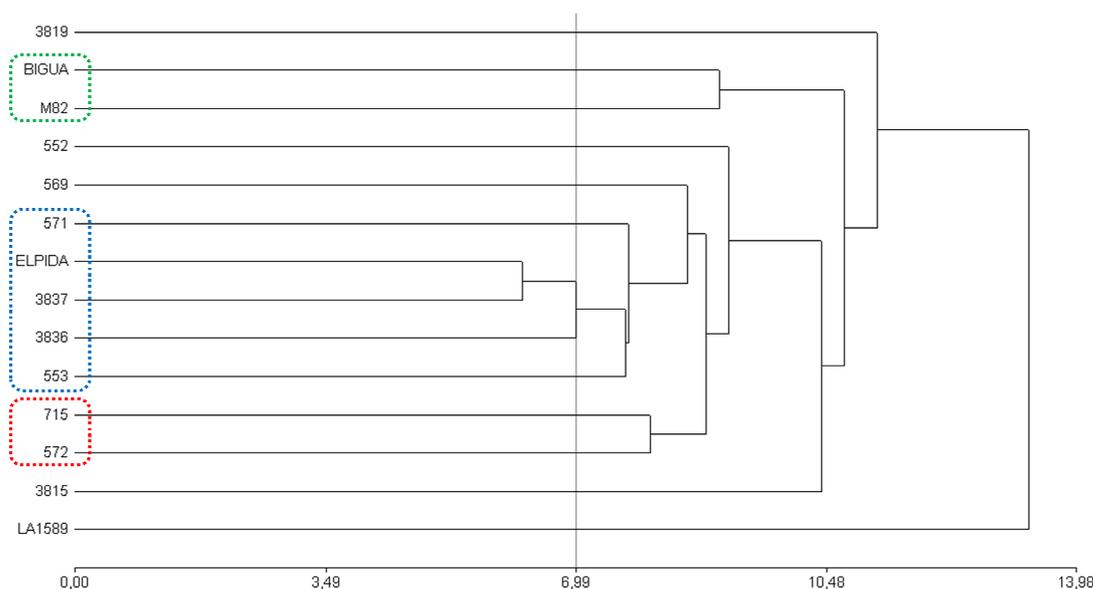


Figura 13. Análisis de Conglomerados de la cosecha 2012.

Cultivares de la cosecha 2012.

(Algoritmo de Clasificación: Encadenamiento Promedio, Distancia: Euclídea).

A partir del AC es posible remarcar que la primera asociación entre cultivares es entre ELPIDA y 3837, y en segundo lugar se asocia a este grupo el cultivar 3836, presentando todos estos frutos una morfología de tipo redondo. Seguidamente se asocian a este grupo dos cultivares de tipo perita, 571 y 553 pero a una distancia mayor.

Los demás conglomerados formados se encuentran a distancias superiores al 50 % de la distancia máxima. Puede observarse que el cultivar 569 se anexa al grupo anterior a una distancia cercana a la mitad de la distancia máxima denotando similitud en la apreciación sensorial de los frutos que componen el grupo. En el caso de los tomates de tipo cherry, las accesiones 572 y 715 también se encuentran agrupadas entre sí, pero no es el caso del tercer cultivar cherry 3815 que se asocia en forma más lejana con el grupo que aglomera la mayor cantidad de variedades.

El cultivar 552 no se asocia a ninguna otra variedad en particular, sino que se anexa al mismo grupo más heterogéneo conformado por diferentes tipos de frutos. Este comportamiento sugiere que las variedades 552 y 3815 presentan características sensoriales muy diferentes a los demás cultivares presentes en la cosecha. De la misma manera el grupo formado por BIGUA y M82 se agrupa a otros conglomerados en forma tardía denotando gran disparidad sobre los demás de acuerdo a las variables sensoriales analizadas.

Las muestras 3819 y LA1589 son los frutos más distantes entre sí y entre los demás cultivares, esto puede comprobarse debido a que en las gráficas de ACP se sitúan en los extremos más distales del mismo eje y en el gráfico de AC son los últimos dos cultivares que terminan asociándose al resto de las muestras. Esto evidencia una gran disparidad a nivel morfológico y organoléptico.

El olor y el sabor analizados en forma individual para este conjunto de cultivares se encuentran esquematizados en la Figura 14.

Respecto del olor, se puede apreciar que los cultivares tipo cherry 715 y 572 ofrecen los más altos estándares, seguido de M82, 552 y 3819. Sorprende encontrar la

variedad M82 entre los primeros elegidos en cuanto al olor debido a que su comportamiento en las demás cualidades organolépticas lo clasificaban como un fruto de media a baja aceptación. Sin embargo, la apreciación olfativa lo coloca dentro de los preferidos.

El sabor tiene los cultivares 3819, 552 y 569 entre los mejores frutos, siendo ninguno de ellos de tipo cherry como ocurrió con el olor. Los primeros 5 frutos elegidos corresponden a dos tomates redondo y tres de tipos perita.

Las muestras de frutos menos aceptadas coinciden en esta ocasión para el olor y el sabor, LA1589, BIGUA y ELPIDA conforman las últimas posiciones en los gráficos radiales acompañados por M82 en el sabor y 569 en el olor.

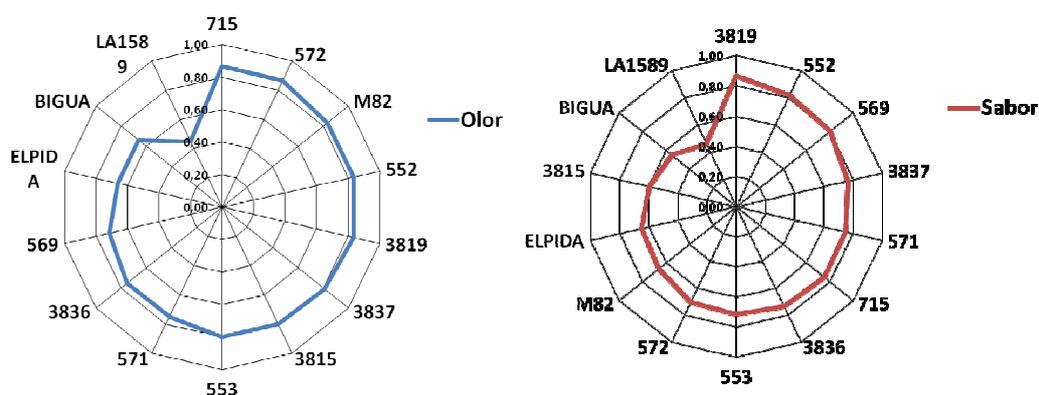


Figura 14. Promedios de olor y sabor de la cosecha 2012.

Los descriptores sensoriales de olor y sabor incorporados en la cosecha 2012 fueron analizados mediante ACP y graficados en la Figura 15.

Los resultados indicaron que los frutos de LA1589, ELPIDA, BIGUA, 571 y 569 conforman un grupo que se encuentra en buena correlación con descriptores de características negativas, como por ejemplo: sabor y olor a moho, herbáceo, tomate inmaduro, medicinal y rancio. En cambio sobre el mismo eje CP1 en el extremo opuesto se distribuyen las características más apreciadas, olor y sabor frutal, floral y característico a tomate junto con los cultivares que poseían una mayor valoración individual sobre el sabor-olor y por análisis estadístico multivariado.

Esta distribución en la gráfica de ACP de descriptores sensoriales con nuevas variables se asemeja a la distribución observada en los análisis previos utilizando las variables de rutina desde la cosecha 2009.

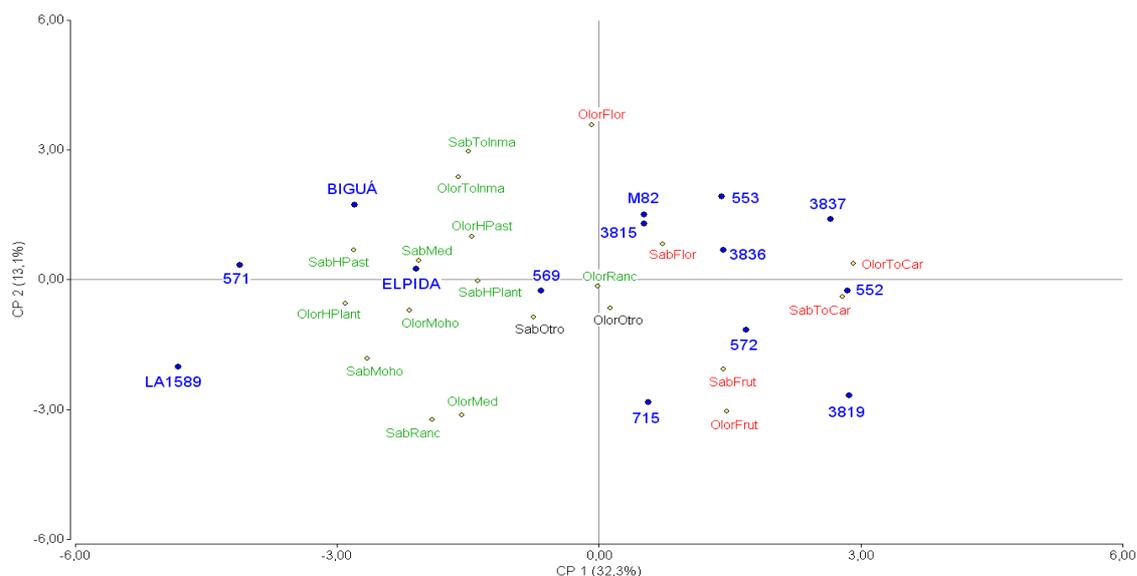


Figura 15. Análisis de Componentes Principales de los descriptores sensoriales de la cosecha 2012.

Un interesante dato surgió de la integración de la información obtenida en cada una de las cosechas respecto a la coloración de los frutos de tomate analizados.

Fue posible observar que existe una relación entre la aceptabilidad y la coloración de los frutos. Los panelistas eligieron en las diversas cosechas cultivares diferentes como frutos más aceptados, pero todos presentaban una coloración roja característica del fruto maduro^[12]. En cambio la presencia de coloración no típica, amarilla-naranja o morado en la piel y pulpa, generó un impacto negativo sobre la valoración del fruto.

Este criterio pudo ser observado en dos cosechas diferentes, incluyendo los cultivares GPEA y CMP en 2009 y Cherry Amarillo Perita (CheAmPer), Cherry Amarillo Redondo (CheAmRed) y CMP en 2010. En ambos años todos estos cultivares obtuvieron una baja puntuación general observada en los diferentes análisis realizados.

Al parecer el cambio de coloración roja típica del fruto posee un impacto negativo en el juicio sensorial de los consumidores penalizando las variables que contemplan esta cualidad^[13].

En la Figura 16 se ilustran los frutos de coloración exótica utilizados en las cosechas 2009 y 2010.



Figura 16. Cultivares de tomate de coloración exótica. De izquierda a derecha: GPEA, CheAmPer, CheAmRed y CMP.

Conclusiones

El análisis de los datos sensoriales sobre los frutos objeto de estudio en cada cosecha ha permitido identificar cuáles de estas variedades presentan aceptación o rechazo sobre los consumidores habituales. El análisis gráfico por medio de métodos estadísticos univariados y multivariados permitieron relacionar ciertas variables con cultivares en particular.

En base a los análisis realizados las variables químicas como olor, sabor, dulzura y las físicas como textura de la pulpa y piel, jugosidad y cantidad de pulpa fueron las variables que más diferencias aportaron en el análisis durante las tres cosechas estudiadas.

Los cultivares se agruparon en función de las variables antes mencionadas, evidenciando claramente grupos conteniendo variedades con buenas calificaciones separados de otras variedades con baja aceptación sensorial.

La variable sensorial valoración general del fruto no permitió diferenciar cultivares como criterio de calidad debido a que se encontró fuertemente influenciada por otras variables como color de pulpa, color de piel y forma del fruto. La valoración general presentó una mayor relación sobre las características visuales que las características aportadas por la degustación del fruto.

La coloración roja típica del fruto del tomate presentó una gran relevancia como parámetro de aceptabilidad en los cultivares estudiados por el plantel de jueces sensoriales.

El objetivo principal de este estudio fue caracterizar los cultivares en función del aroma y sabor de sus frutos.

En el año 2009, los cultivares más aceptados correspondieron a 572, 3806 y 557 mientras que los menos apreciados fueron M82, GPEA y CMP.

En la cosecha 2010 los frutos con mayor nivel de aceptación para el olor fueron CheRedRoj, 569, 3837 y para el sabor fueron 3836, 3806 y CMP. Por el contrario las variedades que causaron menor impresión positiva para las dos variables, fueron BIGUA y LA1589 coincidentemente y las dos variedades de cherrys amarillos, ChePerAm y CheRedAm.

Por último, en la cosecha 2012 se encontró que las variedades 715, 572, M82, 552 para el olor y 3819, 552 y 569 para el sabor fueron considerados como los mejores exponentes sensoriales. Por otro lado los cultivares LA1589, BIGUA y ELPIDA conformaron el grupo de los menos aceptados para las dos variables de mayor interés.

En base a los resultados obtenidos puede observarse que en general los cultivares menos aceptados expresaron las menores características de calidad en las dos variables sensoriales olor y sabor del fruto.

En forma general en base a los resultados obtenidos los cultivares de mayor y menor apreciación durante las cosechas estudiadas fueron:

Cultivares de mayor apreciación	Cultivares de menor apreciación
572 3806 569 CheRedRoj 715 3836 3812 3819	LA1589 BIGUA GPEA ELPIDA CMP CheAmPer CheAmRed

Referencias

- [1] **Drake MA.** Invited review: Sensory analysis of dairy foods. *J. Dairy Sci.*, 2007, 90:4925-4937.
- [2] **Silverthorne DU:** *Fisiología Humana. Un Enfoque Integrado.* 4ta. edn. Buenos Aires. Argentina: Ed. Médica Panamericana; 2008.
- [3] **Noble AC, Lesschaeve I.** Sensory Methods of Flavour Analysis. In *Food Flavour Technology.* Wiley-Blackwell; 2010: 296-318
- [4] **Drake MA, Civille GV.** Flavor Lexicon. *Compr. Rev. Food Sci. F.*, 2002, 2:33-40.
- [5] **Ennis JM, Rousseau B, Ennis DM.** Sensory Difference Tests as Measurement Instruments: a Review of Recent Advances. *J. Sens. Stud.*, 2014, 29:89-102.
- [6] **Baldwin EA, Goodner K, Plotto A.** Interaction of Volatiles, Sugars, and Acids on Perception of Tomato Aroma and Flavor Descriptors. *J. Food Sci.*, 2008, 73:S294-S307.
- [7] **Tandon KS, Baldwin EA, Scott JW, Shewfelt RL.** Linking Sensory Descriptors to Volatile and Nonvolatile Components of Fresh Tomato Flavor. *J. Food Sci.*, 2003, 68:2366-2371.
- [8] **Elmore JR, Heymann H, Johnson J, Hewett JE.** Preference mapping: relating acceptance of "creaminess" to a descriptive sensory map of a semi-solid. *Food Qual. Prefer.*, 1999, 10:465-475.
- [9] **Melgarejo P, Calin-Sanchez A, Carbonell-Barrachina AA, Martinez-Nicolas JJ, Legua P, Martinez R, Hernandez F.** Antioxidant activity, volatile composition and sensory profile of four new very-early apricots (*Prunus armeniaca* L.). *J. Sci. Food Agric.*, 2014, 94:85-94.
- [10] **Carli P, Arima S, Fogliano V, Tardella L, Frusciante L, Ercolano MR.** Use of network analysis to capture key traits affecting tomato organoleptic quality. *J. Exp. Bot.*, 2009, 60:3379-3386.
- [11] **Schauer N, Zamir D, Fernie AR.** Metabolic profiling of leaves and fruit of wild species tomato: a survey of the *Solanum lycopersicum* complex. *J. Exp. Bot.*, 2005, 56:297-307.
- [12] **Teka T.** Analysis of the Effect of Maturity Stage on the Postharvest Biochemical Quality Characteristics of Tomato (*Lycopersicon esculentum* MILL.) Fruit. *Int. Res. J. Pharm. App. Sci.*, 2013, 3:180-186.
- [13] **Saad AG, Jaiswal P, Jha SN.** Non-Destructive Quality Evaluation of Intact Tomato using VIS-NIR Spectroscopy. *Int. J. Adv. Res.*, 2014, 2:632-639.

Capítulo V

Metabolómica de los Compuestos Orgánicos Volátiles del Fruto del Tomate

METABOLÓMICA DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES DEL FRUTO DEL TOMATE

Perfiles de metabolitos volátiles en tomates

Los análisis metabolómicos provenientes de matrices vegetales y sus derivados alimenticios producen una generosa cantidad de información abarcando perfiles de numerosos tipos de compuestos naturales que pueden determinarse por distintas técnicas de análisis. Por lo general los metabolitos suelen clasificarse de acuerdo a su ubicación e importancia en una ruta metabólica conocida, como metabolitos primarios, intermediarios o secundarios. Otra posible clasificación se basa de acuerdo a las características fisicoquímicas de los compuestos que en términos generales pueden dividirse en metabolitos volátiles y no volátiles, hidrofílicos y lipofílicos.

El perfil de compuestos orgánicos volátiles del fruto del tomate es uno de los más abundantes debido a la gran diversidad de compuestos que pueden identificarse. Precisamente surge de su enorme heterogeneidad una elevada complejidad cuando son abordados estudios involucrando esta porción del metaboloma del tomate [1, 2].

Dentro de los metabolitos volátiles se encuentra una serie de compuestos que se destacan como "*metabolitos volátiles de impacto*", surgiendo este término a partir de su rol activo en la formación del aroma y sabor característico del fruto del tomate. Los COVs que forman este selecto grupo provienen de distintos orígenes metabólicos, como por ejemplo ácidos grasos, terpenos, aminoácidos y carotenoides. Los metabolitos de impacto poseen diferencias a nivel estructural y contienen distintos grupos funcionales, pero el requisito que todos ellos poseen es una concentración en el fruto superior a 1 ppb ($\mu\text{g kg}^{-1}$) y un nivel de detección para el olfato humano muy bajo (concentración umbral de detección). Uno de los ejemplos más notorios es la β -damascenona que se encuentran en concentraciones cercanas a 1 ppb y su mínima concentración detectable por el olfato humano es cercana a 0,002 ppb [3, 4].

Entre los COVs de impacto se encuentra la familia de los aldehídos de cadena corta derivados del metabolismo de ácidos grasos. Estos metabolitos son los más abundantes en el perfil de COVs, y son los responsables de contribuir al olor herbáceo que puede apreciarse en algunos frutos y sobre todo en las plantas debido a su alta concentración en las hojas[5].

A continuación se nombran los COVs denominados de impacto: *cis*-3-hexenal, β -ionona, hexanal, β -damascenona, 1-penten-3-ona, 2-metilbutanal, 3-metilbutanal, *trans*-2-hexenal, 2-isobutiltiazol, 1-nitro-2-feniletano, *trans*-2-heptenal, fenilacetaldehído, 6-metil-5-hepten-2-ona, *cis*-3-hexenol, 2-feniletanol, 3-metil-1-butanol, salicilato de metilo, geranil acetona, β -citral, 1-nitropentano, linalool, 1-penten-3-ol, *trans*-2-pentenal, pentanol, pseudoionona, isobutilnitrilo, hexanol y β -ionona epóxido[3].

Además de los metabolitos de impacto también es posible detectar una gran cantidad de otros COVs. Muchos de ellos no cuentan con información acerca de su rol e

importancia en el desarrollo de las características sensoriales del fruto. Por ello en los últimos años se ha tratado de ampliar la lista de los compuestos químicos con actividad real sobre el olor del tomate abarcando la mayor cantidad de metabolitos que pueden ser determinados a partir del análisis del fruto [6, 7].

Puntualmente en el desarrollo de la presente tesis y considerando la cantidad de variedades, las repeticiones biológicas/analíticas de cada cultivar y la enorme cantidad de metabolitos determinados, se obtuvo un extenso volumen de información que debió ser procesado y ordenado para permitir elucidar aspectos ligados al análisis de COVs y su relación con el aroma y sabor de los frutos del tomate.

El procesamiento de la información de metabolitos volátiles obtenido por HS-SPME-GC/MS fue descrito en el Capítulo II: Materiales y Métodos. Los resultados alcanzados a partir de los análisis de las cosechas 2009, 2010 y 2012 fueron obtenidos utilizando técnicas de análisis estadístico multivariado que permitieron ordenar y exponer diferencias y similitudes sobre un gran conjunto de datos.

Análisis de los Datos

La información obtenida en cada cosecha fue evaluada mediante las metodologías multivariadas de análisis: Análisis de Componentes Principales (ACP), Análisis de Conglomerados (AC) y Análisis por Redes Neuronales Artificiales (ARNeu).

Una mención especial es necesaria para introducir los ARNeu. Estos modelos han comenzado a implementarse en los últimos tiempos en la bioinformática cubriendo muchos aspectos requeridos por los analistas de base biológica^[8]. Tal es el caso del software omeSOM, una plataforma de análisis basada en mapas auto-organizativos bajo el modelo de redes neuronales artificiales^[9].

Inicialmente fue desarrollado para extraer información en forma gráfica y sencilla a partir de grandes cantidades de datos de expresión de genes y metabolitos. El software permite resaltar la co-expresión y co-acumulación de grupos y patrones de metabolitos y genes en los conglomerados formados en la capa de resultados. Uno de las mayores ventajas es la posibilidad de descubrir y señalar relaciones ocultas presentes entre la matriz de datos que por otras técnicas de análisis resulta muy dificultoso caracterizar ^[10, 11]. Debido a la alta plasticidad del software fue posible adaptar su uso a una estructura de información que involucrara otro tipo de datos, como por ejemplo los sensoriales.

El software fue diseñado por investigadores del Centro de Investigación en Señales, Sistemas e Inteligencia Artificial de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Hídricas de la Universidad Nacional del Litoral y se ofrece libremente para cualquier usuario en diferentes versiones.

La evaluación de los resultados en base a estas técnicas de análisis comentadas, permitió obtener asociaciones entre cultivares, metabolitos y datos sensoriales.

Análisis de los Compuestos Orgánicos Volátiles de la Cosecha 2009

La cosecha 2009 cuenta con 9 variedades distintas de tomate. A su vez tres frutos diferentes de estas variedades, considerados como réplicas y nombradas a modo de ejemplo como 552-1, 552-2 y 552-3, fueron analizados utilizando HS-SPME-GC/MS para la determinación de los perfiles de metabolitos volátiles correspondientes. Los datos obtenidos de los cromatogramas fueron normalizados por el peso de la muestra y un estándar interno, como fue descrito en el Capítulo II: Materiales y Métodos. Posteriormente a la normalización de los datos se analizaron por las diferentes técnicas estadísticas multivariadas.

Inicialmente es necesario realizar un análisis exploratorio de los datos para obtener un mayor conocimiento acerca de los cultivares y sus relaciones con los COVs analizados. El análisis de conglomerados (AC) permite visualizar el agrupamiento natural de las observaciones de acuerdo a la similitud compartida sobre las variables analizadas. En la Figura 1 se muestra el dendrograma obtenido del AC de la cosecha 2009.

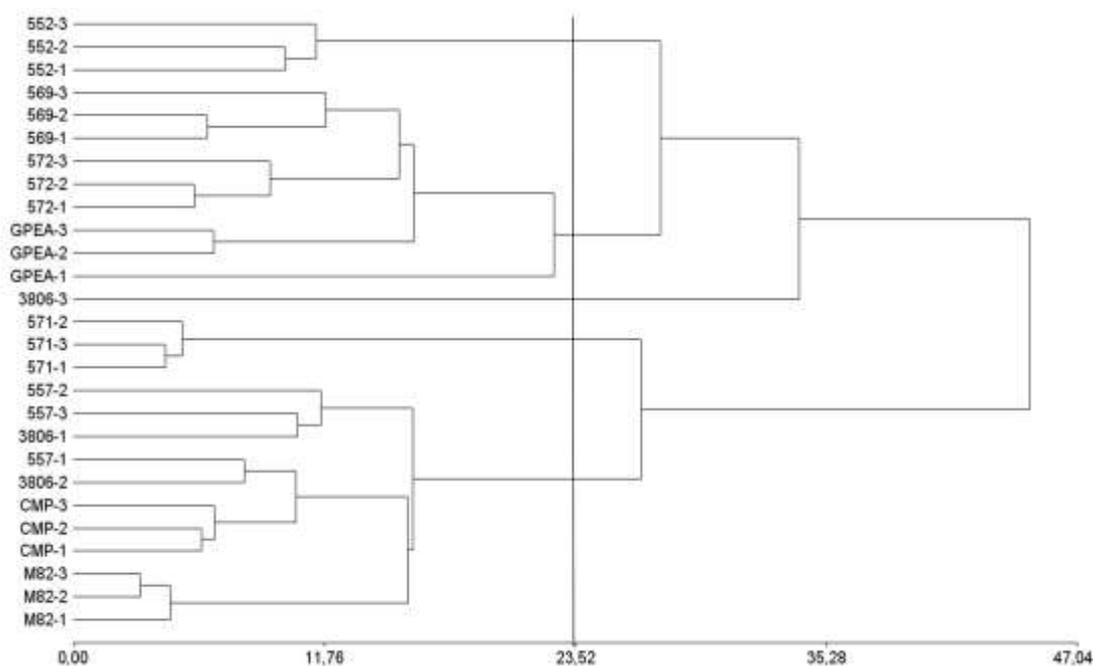


Figura 1. Análisis de Conglomerados de las variables metabólicas de la cosecha 2009.
Cultivares de la cosecha 2009.

(Algoritmo de Clasificación: Encadenamiento Promedio, Distancia: Gower).

La gráfica permite observar que la distribución de las réplicas de la mayoría de los cultivares presentaron muy buena cohesión. Las repeticiones se agruparon entre sí a una corta distancia del origen, señalando que la disparidad encontrada dentro de las réplicas de un mismo cultivar fue pequeña. Sólo las repeticiones pertenecientes a los cultivares 3806 y 557 demostraron mayor dispersión agrupándose antes a otros cultivares que a sus propias repeticiones.

Con mayor detalle la gráfica demuestra que a una referencia del 50 % de la distancia máxima quedaron conformados 2 grupos de cultivares conteniendo las

variedades 569, 572 en forma más próxima con GPEA y el otro conglomerado conteniendo a 557, 3806, CMP y M82. También fue posible observar que los cultivares 552 y 571 se mantuvieron separados del resto de los grupos mencionados al menos hasta el 50 % de la distancia máxima. Estos dos últimos cultivares fueron los que demostraron mayor diferencia en base a las variables metabólicas analizadas.

Posteriormente se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) con los mismos datos metabólicos y cultivares. En la Figura 2 se grafica el plano bidimensional del análisis de ACP de los cultivares de la cosecha 2009. La variabilidad total representada en la gráfica corresponde al 53,8%, aportando el eje CP1 en mayor proporción con el 32,5% y el eje CP2 con el 21,3%.

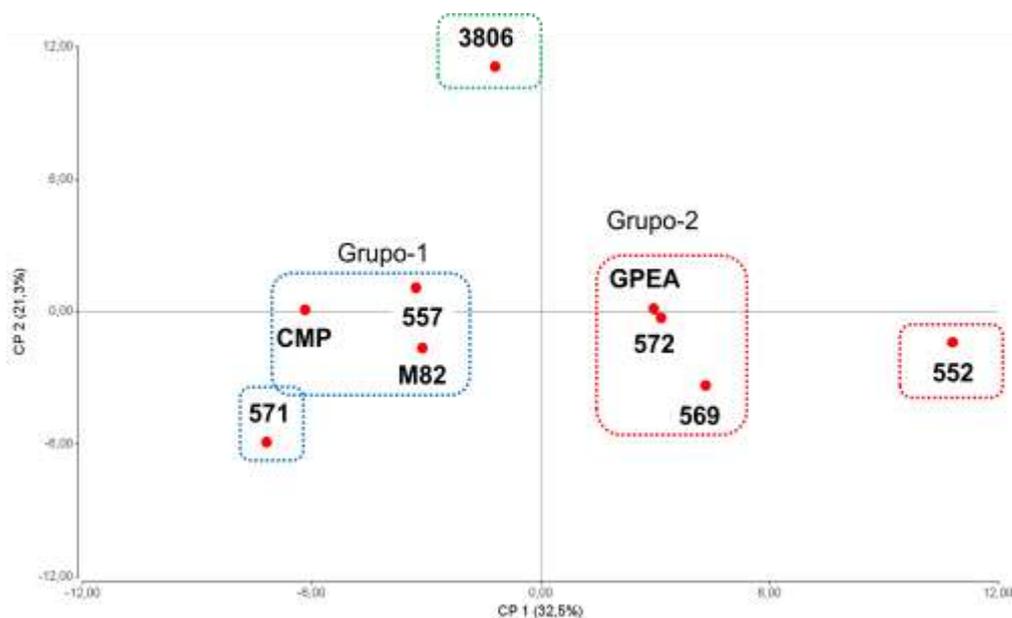


Figura 2. Análisis de Componentes Principales de los COVs de la cosecha 2009. Cultivares de la cosecha 2009.

A partir del gráfico de ACP puede observarse que los cultivares se mantuvieron agrupados casi de igual manera al análisis de AC. Los grupos conformados contuvieron a las variedades CMP, 557 y M82 en el Grupo 1 sobre la sección de valores negativos del eje CP1 y GPEA, 572 y 569 incluidos en el Grupo 2 sobre la sección opuesta del mismo eje.

Una vez determinada la agrupación entre cultivares debe considerarse la información sensorial disponible para estos frutos. Recordando los datos mencionados en el Capítulo IV: Análisis Sensorial de los Frutos de Tomate, los cultivares más apreciados en cuanto a su olor fueron 3806, 557, 572 y 569 mientras que las variedades menos valoradas fueron 571, M82 y GPEA.

Con esta información, de manera simplificada puede inferirse que la porción del plano donde se ubicó el Grupo-1, incluyendo los cultivares 571, M82 y CMP, contuvo en mayor medida las variedades de menor calidad sensorial. Por otro lado, la Grupo-2 que incluyó a los cultivares 572 y 569 puede considerarse como la sección de la gráfica donde se ubicaron en forma general las variedades con mejor aceptación.

A esta clasificación debe tenerse en cuenta que la variedad 3806, con una buena aceptación sensorial, pero con una mayor variabilidad metabólica entre sus réplicas, se separó completamente de los dos grupos conformados. También fueron una excepción las variedades 557 y GPEA. El primero de ellos calificado como un buen cultivar pero ubicado en la zona de menor calidad, y la variedad GPEA clasificado con características sensoriales bajas e incluido en la zona de los frutos más apreciados. A pesar del comportamiento de estos cultivares, fue posible observar una tendencia en la separación de las variedades en base a su calificación sensorial.

Conjuntamente con la distribución de variedades de tomates, pudo observarse en el mismo plano del ACP la distribución de las variables volátiles utilizadas en el análisis. En la Figura 3 se esquematiza esta información.

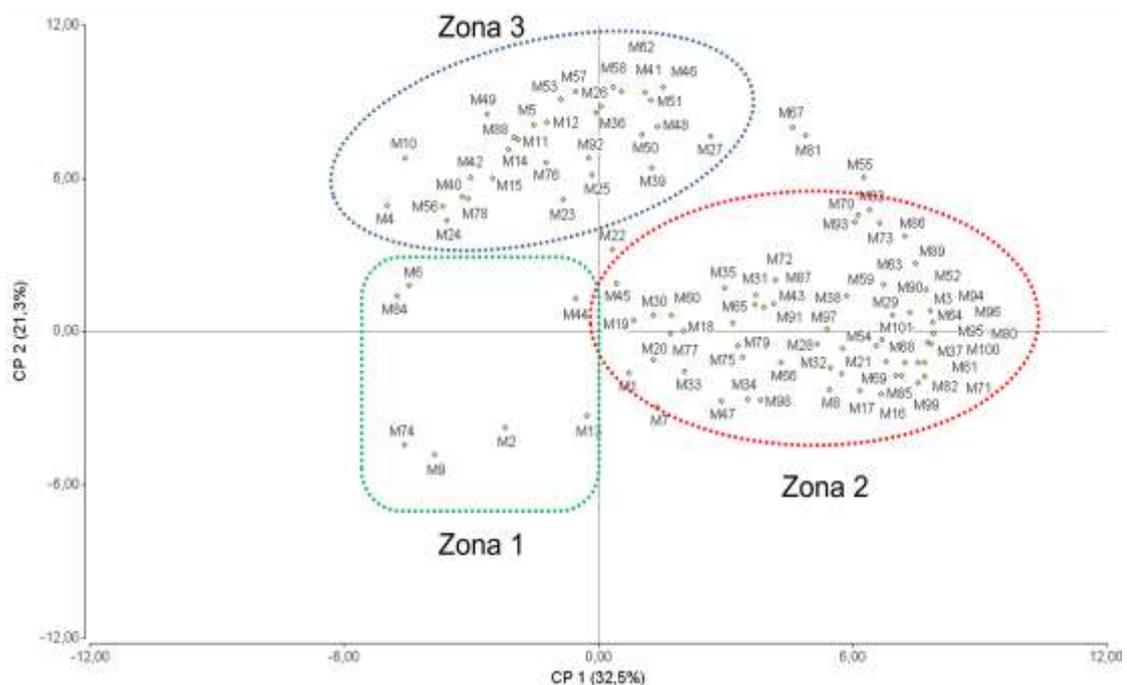


Figura 3. Análisis de Componentes Principales de los COVs de la cosecha 2009.

A partir de la distribución de las variables metabólicas pudo observarse que esquemáticamente se presentaron dos aglomeraciones de COVs más importantes, la Zona 2 y la Zona 3. En menor grado la Zona 1, muy cercana a ambos grupos de variables, involucró algunos pocos metabolitos volátiles.

La Zona 3 coincidió mayoritariamente con la posición del cultivar 3806, sin embargo la zona delimitada por las variables se extendió ampliamente sobre esa sección del plano. Sobre la Zona 2, que involucró una gran cantidad de COVs agrupados, presentó mayor relación con los cultivares GPEA, 572, 569 y 552. Por último la Zona 1 se correlacionó con los cultivares CMP, 557, M82 y 571.

Un análisis más esquemático de la distribución de COVs fue realizado teniendo en cuenta el origen metabólico de cada una de las variables. En la Figura 4 se encuentran graficados los compuestos volátiles de acuerdo a la vía metabólica de la cual derivan. Los COVs fueron clasificados en forma general como derivados de ácidos grasos (1: violeta),

aminoácidos no aromáticos (2: azul), aminoácidos aromáticos (3: celeste), terpenos (4: verde), carotenoides (5: amarillo) y de origen e identidad desconocida (6: rojo).

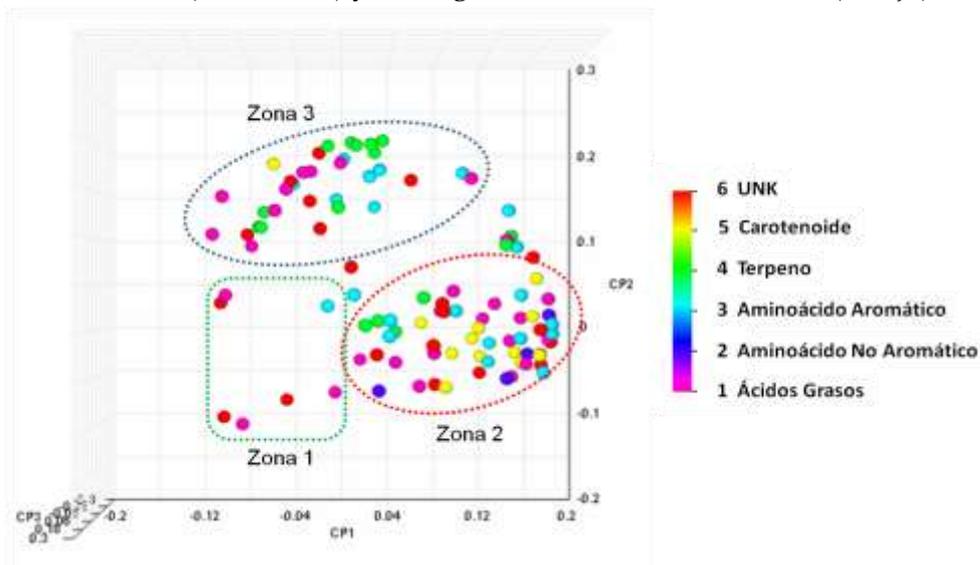


Figura 4. Distribución de COVs de acuerdo a su origen metabólico de la cosecha 2009.

Considerando las zonas delimitadas anteriormente puede observarse que en la Zona 3 hubo mayor aporte de los ácidos grasos (violeta) y terpenos (verde) coincidente con la variedad 3806. Por otro lado en la Zona 2 se observó mayor contribución de los aminoácidos, con y sin residuos aromáticos (celeste y azul), y los carotenoides (amarillos). Por último la Zona 1 como fue mencionado anteriormente posee muy pocos COVs asociados, con una leve predominancia de los derivados de ácidos grasos.

En las tablas siguientes se detallan los COVs incluidos dentro de cada una de las zonas demarcadas especificando el origen metabólico de cada uno de los compuestos. La clasificación metabólica corresponde a los cuatro orígenes diferentes mencionados previamente: ácidos grasos (AG), aminoácidos (AA), terpenoides (TER), carotenoides (CAR) y las señales sin identificar (UNK).

Tabla 1. COVs integrantes de la Zona 1 de la cosecha 2009.

Zona 1					
Código	Nombre	Origen	Código	Nombre	Origen
M2	UNK m/z 43	UNK	M44	2-metil-3-fenil-1-propeno	AA
M6	metil butanoato	AG	M74	UNK m/z 57-3	UNK
M9	1,4-pentadieno	AG	M84	UNK m/z 147	UNK
M13	hexanal	AG			

AA: aminoácidos, AG: ácidos grasos, TER: terpenos, CAR: Carotenoides y UNK: desconocidos.

En la Zona1 a pesar de contener pocos compuestos volátiles, hay una ligera predominancia de metabolitos derivados de los ácidos grasos aportando un 43 % de los COVs totales. Entre ellos se destaca el metabolito volátil de impacto hexanal [3, 12]. También en este sector de la gráfica se observaron algunas señales no identificadas (UNK) en un porcentaje similar a los derivados de ácidos grasos.

En la Zona 2 en el margen derecho de la gráfica se observó una mayor concentración de COVs. En la Tabla 2 se describen los metabolitos incluidos en esta zona.

Tabla 2. COVs integrantes de la Zona 2 de la cosecha 2009.

Zona 2					
Código	Nombre	Origen	Código	Nombre	Origen
M1	2-metilfurano	AG	M66	carvona	CAR
M3	3-metilbutanal	AA	M68	2-decenal	AG
M7	3-metil-1-butanol	AA	M69	α -citral	CAR
M16	heptanal	AG	M70	2-undecanona	AG
M17	1-nitropentano	AA	M71	2,4-decadienal	AG
M18	α -pineno	TER	M72	2-undecanol	AG
M19	limoneno óxido	TER	M73	duraldehído	AA
M20	UNK m/z 83	UNK	M75	(3E)-4-metil-3-hepten-2-ona	AG
M21	<i>p</i> -metoxitolueno	AA	M77	eugenol	AA
M28	6-metil-5-hepten-2-ona	CAR	M79	UNK m/z 161	UNK
M29	2-pentilfurano	AG	M8	UNK m/z 55	UNK
M30	isoterpinoleno	TER	M80	β -damascenona	CAR
M31	UNK m/z 57-1	UNK	M82	UNK m/z 68	UNK
M32	6-metil-5-hepten-2-ol	CAR	M83	verdil acetato	TER
M33	octanal	AG	M85	geranil acetona	CAR
M34	UNK m/z 105	UNK	M86	2,5-ditertbutilbenzoquinona	AA
M35	limoneno	TER	M87	lilial	AA
M37	2-isobutiltiazol	AA	M89	β -ionona	CAR
M38	2-octenal	AG	M90	β -ionona epóxido	CAR
M43	UNK m/z 58	UNK	M91	2-dodecanona	AG
M45	guayacol	AA	M93	arhimachalen-2-ol	TER
M47	2-nonen-1-ol	AG	M94	salicilato de propilo	AA
M52	3-metilheptilacetato	AG	M95	UNK m/z 115	UNK
M54	bencilnitrilo	AA	M96	salicilato de isoamilo	AA
M59	decanal	AG	M97	pseudoionona	CAR
M60	salicilato de metilo	AA	M98	β -metilionona	CAR
M61	UNK m/z 119	UNK	M99	benzofenona	AA
M63	dimetilbenzaldehído	AA	M100	8-pentadecanona	AG
M64	UNK m/z 57-2	UNK	M101	α -hexilcinamaldehído	AA
M65	β -citral	CAR			

AA: aminoácidos, AG: ácidos grasos, TER: terpenos, CAR: Carotenoides y UNK: desconocidos.

Esta zona aglomeró el mayor número de variables volátiles (59 metabolitos), conformada por un 30 % de derivados de aminoácidos, un 25 % de ácidos grasos, un 19 % de carotenoides y un 10 % de terpenos. Dentro de las variables agrupadas pueden remarcarse algunos pertenecientes a la serie de los metabolitos volátiles de impacto. Los mismos fueron 3-metil-1-butanol, 3-metilbutanal, 1-nitropentano, 6-metil-5-hepten-2-ona, 2-isobutiltiazol, salicilato de metilo, β -citral, β -damascenona, geranil acetona, β -ionona, β -ionona epóxido, pseudoionona. Interesantemente, los COVs de impacto en este grupo de metabolitos solo derivan de carotenoides y aminoácidos. Otro detalle relevante surge a partir de la presencia de 3-metil-1-butanol, 3-metilbutanal, 1-nitropentano y 2-isobutiltiazol que fueron los únicos COVs que no derivan de aminoácidos con residuos aromáticos en su estructura, los mismos provienen de aminoácidos ramificados como la leucina e isoleucina [13, 14].

Además en esta zona se encontraron otros metabolitos volátiles que son derivados directos de metabolitos de impacto, ejemplos de estos son heptanal, 6-metil-5-hepten-2-ol, bencilnitrilo, α -citral y β -metilionona. Sumados a estos COVs también pueden nombrarse otros metabolitos frecuentemente asociados al olor del fruto en los perfiles de metabolitos volátiles, como guayacol y eugenol.

La Zona 3 se ubicó en la zona central superior de la grafica conteniendo una gran cantidad de metabolitos volátiles. En la Tabla 3 se describen los COVs de la zona mencionada.

Tabla 3. COVs integrantes de la Zona 3 de la cosecha 2009.

Zona 3					
Código	Nombre	Origen	Código	Nombre	Origen
M4	1-penten-3-ona	AG	M46	linalool	TER
M5	2-etil-furano	AG	M48	2-metilacetofenona	AA
M10	4-pental	AG	M49	α -isoforona	CAR
M11	tolueno	AA	M50	2-feniletanol	AA
M12	<i>cis</i> -3-hexenal	AG	M51	alcanfor	TER
M14	<i>cis</i> -2-hexenal	AG	M53	UNK m/z 120	UNK
M15	<i>trans</i> -2-hexenal	AG	M55	bencil acetato	AA
M23	UNK m/z 93-2	UNK	M56	UNK m/z 94	UNK
M24	<i>trans</i> -2-heptenal	AG	M57	DMHEX	TER
M25	óxido geránico	TER	M58	α -terpineol	TER
M26	benzaldehído	AA	M62	<i>p</i> -ment-1-en-9-al	TER
M27	metil trimetoxi acetato	UNK	M67	2-feniletacetato	AA
M36	2-etil-1-hexanol	AG	M76	UNK m/z 95	UNK
M39	fenilacetaldehído	AA	M78	TRIMCICL	TER
M40	<i>cis</i> -linalil óxido	TER	M81	2-metil-2-octen-4-ona	AG
M41	terpinoleno	TER	M88	UNK m/z 131	UNK
M42	<i>trans</i> -linalil óxido	TER	M92	1-fenil-1-propanol	AA

AA: aminoácidos, AG: ácidos grasos, TER: terpenos, CAR: Carotenoides y UNK: desconocidos.

En la Zona 3 coincidiendo con el cultivar 3806, uno de las variedades más apreciadas en cuanto a su olor, se encontró una abundancia similar entre derivados volátiles de terpenos, ácidos grasos y aminoácidos aportando un 30 %, 26 % y 23 % respectivamente del total de COVs.

Los metabolitos de impacto presentes en este grupo fueron 1-penten-3-ona, *cis*-3-hexenal, *trans*-2-hexenal, *trans*-2-heptenal, fenilacetaldehído, 2-feniletanol y linalool. En este caso, los COVs de impacto más abundantes correspondieron a los derivados de ácidos grasos. Es conocido que estos metabolitos contribuyen mayormente a expresar características herbáceas y frescas en el fruto del tomate^[4].

Otros COVs relacionados en estudios metabolómicos sobre el fruto del tomate también se encontraron en este grupo de variables, como por ejemplo benzaldehído, *cis*-linalil óxido y *trans*-linalil óxido^[6].

Los análisis multivariados clásicos utilizados han permitido definir la agrupación de cultivares en base a sus similitudes y diferencias metabólicas conservando así también una clasificación ligada a sus características sensoriales. También fue posible asignar grupos de COVs a determinados cultivares o grupos de cultivares proporcionando información acerca de las vías metabólicas que dan origen a los COVs asociados.

Análisis por Redes Neuronales Artificiales de la Cosecha 2009

En forma complementaria a estos análisis se empleó el ARNeu que brindó información más depurada sobre las variables metabólicas que se asocian específicamente a variables sensoriales de interés, como el olor y sabor característico.

Los análisis basados en ARNeu permiten delimitar la búsqueda de asociaciones en forma específica a una variable de interés (metabólica o sensorial) dentro del extenso paquete de datos analizados. Los resultados de estos análisis enfatizan la co-expresión de variables con un patrón similar aglomerando en grupos definidos las observaciones consideradas. En el caso puntual de esta tesis utilizando conjuntamente los datos de COVs y la información sensorial de los cultivares fue posible relacionar directamente los metabolitos volátiles asociados específicamente a las variables organolépticas de mayor interés.

Los datos metabólicos y sensoriales de la cosecha 2009 fueron analizados mediante el software *omeSOM utilizando un esquema de conglomerados neuronales de 7 neuronas por capa en forma especular, permitiendo observar de esta manera las correlaciones invertidas entre las variables en las gráficas de resultados.

En la Figura 5, se grafica la capa final de resultados identificando los números correspondientes a las neuronas de mayor relevancia en el mapa neuronal de salida.

Las variables sensoriales de mayor interés, olor característico y sabor característico, se situaron en las neuronas N° 4 y N° 22 respectivamente del mapa de resultados. Dentro de cada una de estas neuronas se aglomeraron conjuntamente con el olor y el sabor otras variables (sensoriales y/o metabólicas) presentando un patrón de expresión similar entre todas ellas. De esta manera los metabolitos y otras características organolépticas dentro de la neurona forman el conglomerado que denota la mayor correlación respecto a las variables de importancia.

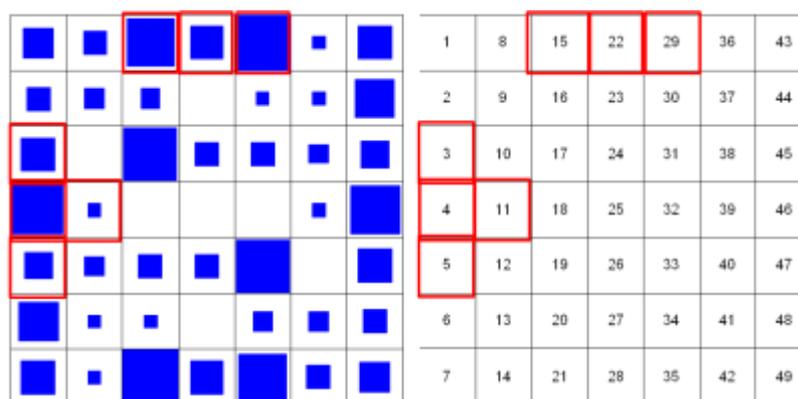


Figura 5. Mapa Neuronal de Resultados del análisis de COVs por ARNeu de la cosecha 2009.

En la Figura 6 se grafican los detalles del interior de la neurona N° 4 que contiene la variable sensorial olor característico y otras variables metabólicas y sensoriales relacionadas.

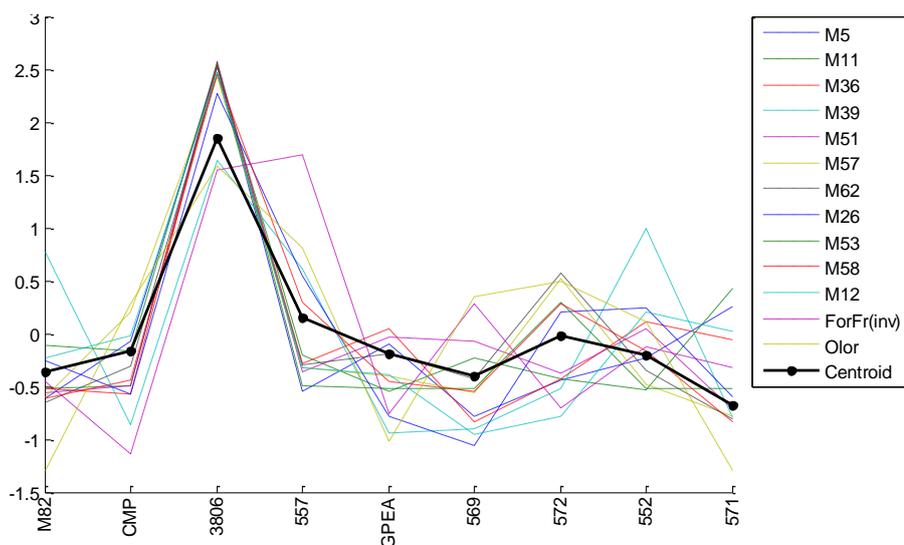


Figura 6. Detalle de la Neurona 4 del análisis de ARNeu de la cosecha 2009.

Las variables incluidas en la neurona N° 4 presentaron la mayor correlación con el olor característico, exponiendo un perfil de expresión similar al determinado por la variable de interés. En la Figura 7, se esquematiza el comportamiento de la variable olor característico en los cultivares de la cosecha 2009.

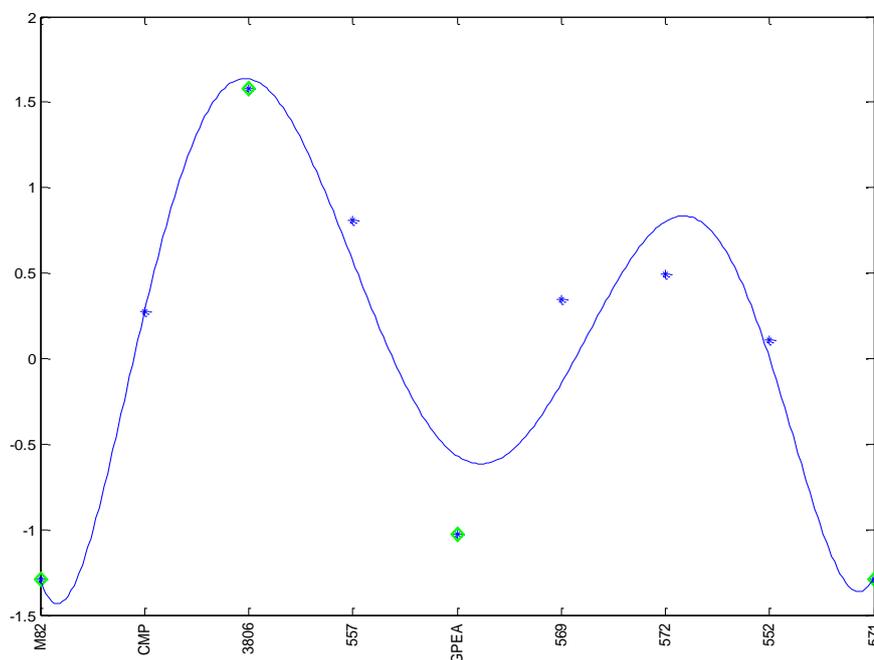


Figura 7. Esquema del perfil de la variable Olor Característico en la cosecha 2009.

En la Tabla 4 se enumeran las variables que conformaron la neurona N° 4 informando también en cada metabolito cuál fue su ubicación (*n*) en las zonas delimitadas en los análisis de ACP.

Tabla 4. Variables integrantes de la Neurona 4 del ARNeu de la cosecha 2009.

Olor Característico (Neurona 4)							
N	V	Código	Nombre (n)	N	V	Código	Nombre (n)
4	0	M5	2-etil-furano (3)	4	0	M53	UNK m/z 120 (3)
4	0	M11	tolueno (3)	4	0	M57	DMHEX (3)
4	0	M12	cis-3-hexenal (3)	4	0	M58	α -terpineol (3)
4	0	M26	benzaldehído (3)	4	0	M62	<i>p</i> -ment-1-en-9-al (3)
4	0	M36	2-etil-1-hexanol (3)	4	0	Sens	For. Fruto (inv)
4	0	M39	fenilacetaldehído (3)	4	0	Sens	Olor
4	0	M51	alcanfor (3)				

N: número de neurona. V: vecindad. Sens: variable sensorial.

(n): ubicación del COVs en las zonas descritas del análisis de ACP.

Puede observarse que todas las variables metabólicas asociadas con mayor fortaleza al olor característico se encontraron incluidas en la Zona 3 de los gráficos de ACP (Figura 3). Debe considerarse también que el cultivar 3806, siendo el mejor exponente sensorial en cuanto a su olor, fue la variedad que se asoció en mayor medida con los COVs contenidos en la Zona 3.

Complementariamente a la neurona N° 4, los conglomerados más próximos, en la vecindad +1, se ubicaron en las neuronas N° 3, N° 5 y N° 11 (Figura 5). Dentro de estas neuronas se asociaron otras variables que presentaron perfiles de expresión similar respecto al olor característico. En las Figuras 8 y 9 se grafican los detalles de las neuronas N° 3 y N° 5 (el detalle de la neurona N° 11 se encuentra en la Figura 6 del Anexo Digital ARNeu).

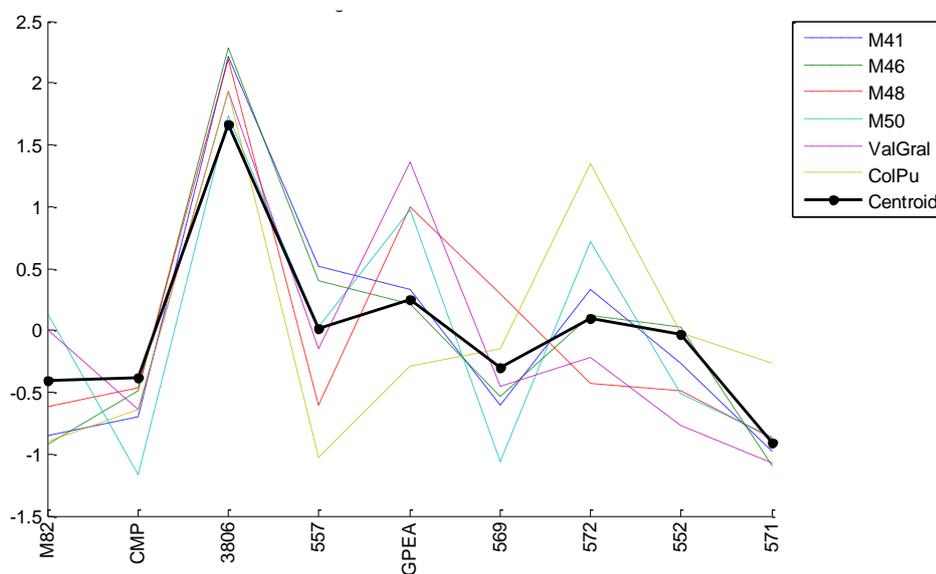


Figura 8. Detalle de la Neurona 3 del análisis de ARNeu de la cosecha 2009.

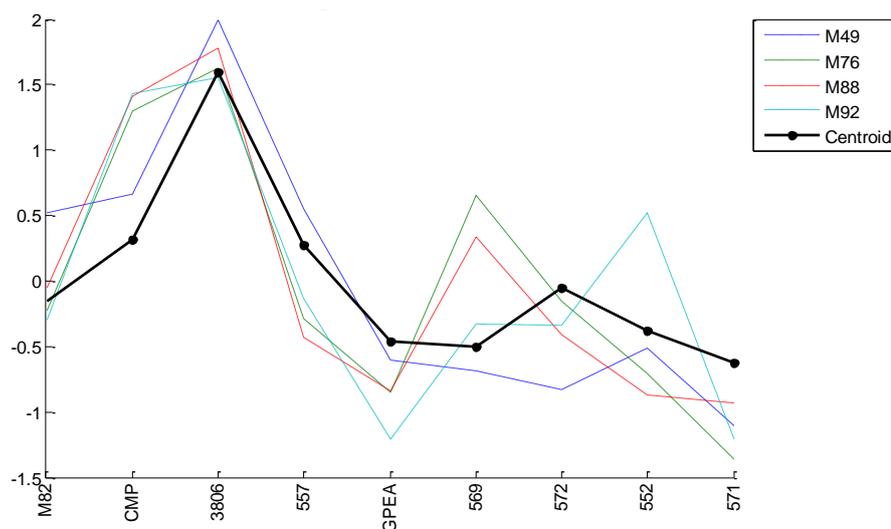


Figura 9. Detalle de la Neurona 5 del análisis de ARNeu de la cosecha 2009.

En la Tabla 5 se enumeran las variables encontradas en las neuronas con una vecindad +1, N° 3, 5 y 11, respecto de la neurona N° 4, conteniendo el olor característico.

Tabla 5. Variables integrantes de las neuronas vecinas a la Neurona 4 del ARNeu de la cosecha 2009.

Olor Característico (Neurona 4)							
N	V	Código	Nombre (n)	N	V	Código	Nombre (n)
3	1	M41	terpinoleno (3)	3	1	M50	2-feniletanol (3)
3	1	M46	linalool (3)	3	1	Sens	Val. Gral.
3	1	M48	2-metilacetofenona (3)	3	1	Sens	Col. Pulpa
5	1	M49	α -isoforona (3)	5	1	M92	1-fenil-1-propanol (3)
5	1	M76	UNK m/z 95 (3)	11	1	M25	óxido geránico (3)
5	1	M88	UNK m/z 131 (3)				

N: número de neurona. V: vecindad. Sens: variable sensorial
(n): ubicación del COVs en las zonas descriptas del análisis de ACP.

Nuevamente puede observarse que todos los COVs asociados en la vecindad +1 al olor característico pertenecieron a la Zona 3 de los gráficos de ACP.

En cuanto a las variables que pudieron asociarse al olor característico, se pueden destacar los metabolitos de impacto^[12, 15], *cis*-3-hexenal y fenilacetaldehído en la misma neurona N° 4 y 2-feniletanol y linalool en las neuronas de la vecindad +1. También fue posible observar otros COVs que hasta el momento no han sido asociados como posibles contribuyentes al olor del tomate. Entre ellos puede mencionarse a 2-etilfurano, tolueno, 2-etil-1-hexanol, alcanfor, α -terpineol, *p*-ment-1-en-9-al, DMHEX: 3,6-dimetil-2, 3, 3a, 4, 5, 7a-hexahidrobenzofurano, 1-fenil-1-propanol y óxido geránico. También pueden mencionarse a los compuestos volátiles no identificados (UNK) que formaron parte de este grupo relacionado con el olor del fruto, estas señales fueron UNK m/z 120, UNK m/z 95 y UNK m/z 131.

Además, el olor característico también se relacionó con otras variables sensoriales como valoración general, color de pulpa en forma directa y forma del fruto en modo invertido.

Los COVs integrantes de este grupo de neuronas relacionadas al olor característico presentaron perfiles muy similares al descrito por la variable sensorial de

interés. Esta información permite desprender la idea de que los metabolitos señalados, teniendo una correlación directa o inversa con el olor, podrían estar involucrados en el desarrollo de esta característica organoléptica de interés. El hecho de que pertenezcan a la zona de influencia dominada por el cultivar que mayor calidad presentó por su olor, 3806, refuerza aun más esta hipótesis.

El mismo análisis fue realizado también para el sabor característico. Esta variable se ubicó más alejada de la neurona conteniendo el olor característico, precisamente en la neurona N° 22 teniendo como vecinas más próximas a las neuronas N° 15 y N° 29 (Figura 5). En la Figura 10 puede observarse el detalle de la neurona N° 22 conteniendo el sabor característico y en la Figura 11 el perfil de la variable en los cultivares ensayados del 2009.

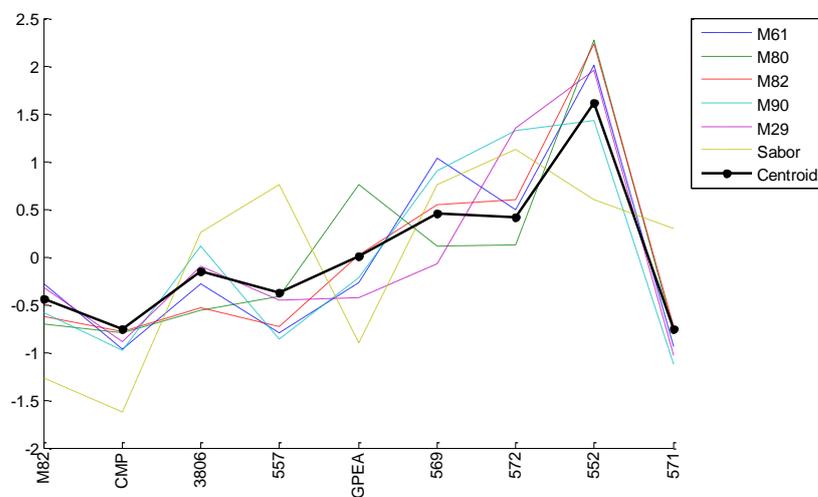


Figura 10. Detalle de la Neurona 22 del análisis de ARNeu de la cosecha 2009.

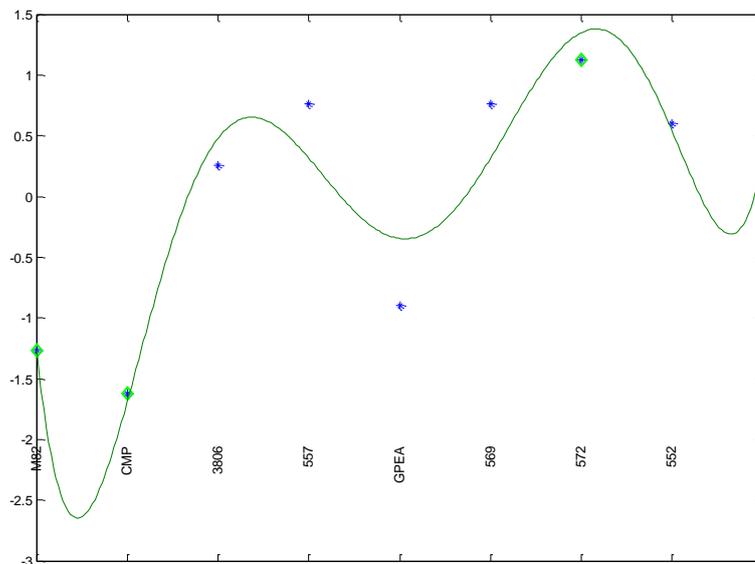


Figura 11. Esquema del perfil de la variable Sabor Característico en la cosecha 2009.

En el caso del olor y sabor característico, puede observarse en las Figuras 7 y 11, que el patrón expresado por las dos variables sensoriales ofrece una gran similitud y

coinciden en los máximos exponentes, siendo las variedades 3806, 557, 569 y 572 conjuntamente.

En la Tabla 6, se ejemplifican las variables que se encontraron formando parte del aglomerado de la neurona N° 22. Se especifica también para cada metabolito volátil en que zona fue ubicado en los análisis de distribución de COVs de ACP.

Tabla 6. Variables integrantes de la Neurona N° 22 del ARNeu de la cosecha 2009.

Sabor Característico (Neurona 22)							
N	V	Código	Nombre (n)	N	V	Código	Nombre (n)
22	0	M29	2-pentilfurano (2)	22	0	M82	UNK m/z 68 (2)
22	0	M61	UNK m/z 119 (2)	22	0	M90	β -ionona epóxido (2)
22	0	M80	β -damascenona (2)	22	0	Sens	Sabor

N: número de neurona. V: vecindad. Sens: variable sensorial

(n): ubicación del COVs en las zonas descriptas del análisis de ACP.

En este caso se obtuvo menor cantidad de variables íntimamente correlacionadas al sabor del fruto. Sin embargo, en las neuronas más próximas, N° 15 y N° 29, se concentró una gran cantidad de variables de tipo metabólico con perfiles similares. En las Figuras 12 y 13 se grafican los perfiles expresados por las variables incluidas en las neuronas mencionadas.

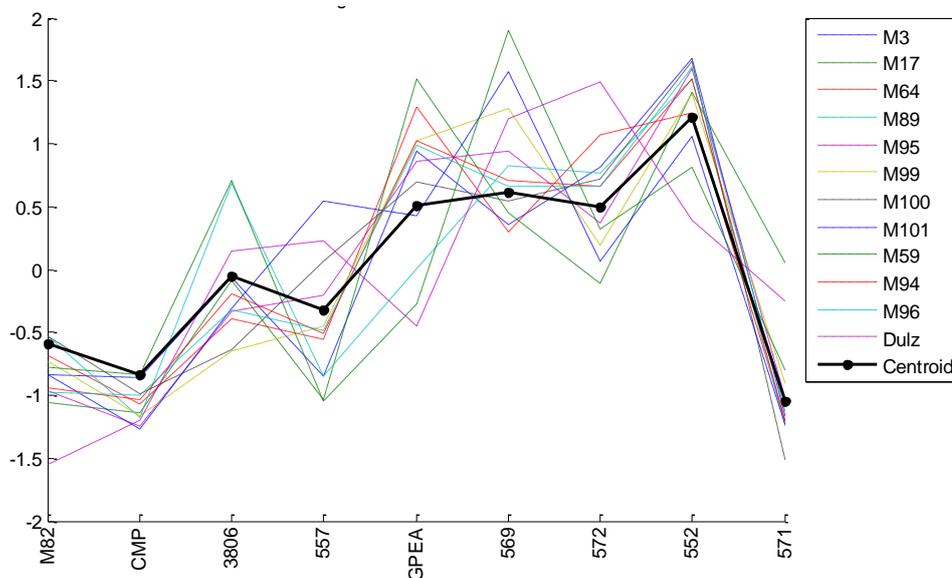


Figura 12. Detalle de la Neurona 15 del análisis de ARNeu de la cosecha 2009.

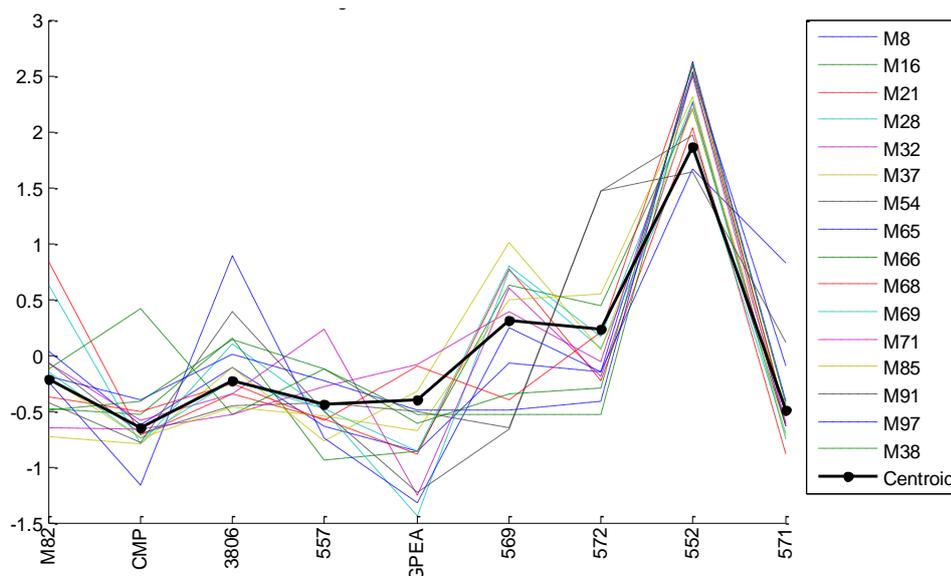


Figura 13. Detalle de la Neurona 29 del análisis de ARNeu de la cosecha 2009.

La suma de las variables sensoriales y metabólicas en la zona de influencia del sabor característico contó con 33 asociaciones, mayormente encontradas en las neuronas vecinas. En la Tabla 7 se enumeran las variables encontradas en esta última sección mencionada.

Tabla 7. Variables integrantes de las neuronas vecinas a la Neurona 22 del ARNeu de la cosecha 2009.

Sabor Característico (Neurona 22)							
N	V	Código	Nombre (n)	N	V	Código	Nombre (n)
15	1	M3	3-metilbutanal (2)	15	1	M95	UNK m/z 115 (2)
15	1	M17	1-nitropentano (2)	15	1	M96	salicilato de isoamilo (2)
15	1	M59	decanal (2)	15	1	M99	benzofenona (2)
15	1	M64	UNK m/z 57-2 (2)	15	1	M100	8-pentadecanona (2)
15	1	M89	β -ionona (2)	15	1	M101	α -hexilcinamaldehído (2)
15	1	M94	salicilato de propilo (2)	15	1	Sens	Dulzura
29	1	M8	UNK m/z 55 (2)	29	1	M65	β -citral (2)
29	1	M16	heptanal (2)	29	1	M66	carvona (2)
29	1	M21	<i>p</i> -metoxitolueno (2)	29	1	M68	2-decenal (2)
29	1	M28	6-metil-5-hepten-2-ona (2)	29	1	M69	α -citral (2)
29	1	M32	6-metil-5-hepten-2-ol (2)	29	1	M71	2,4-decadienal (2)
29	1	M37	2-isobutiltiazol (2)	29	1	M85	geranil acetona (2)
29	1	M38	2-octenal (2)	29	1	M91	2-dodecanona (2)
29	1	M54	bencilnitrilo (2)	29	1	M97	pseudoionona (2)

N: número de neurona. V: vecindad. Sens: variable sensorial
(n): ubicación del COVs en las zonas descritas del análisis de ACP.

Las variables pertenecientes al conglomerado del sabor característico se ubicaron exclusivamente en la Zona 2 del análisis de ACP (Figura 3). Precisamente en esa zona se asociaron los cultivares 572, 569, 552 y GPEA (Figura 2) destacándose los tres primeros como algunas de las variedades de mayor calidad en base a su sabor.

Entre las variables metabólicas asociadas se encontró una buena proporción de metabolitos de impacto, entre ellos puede nombrarse a β -damascenona, β -ionona epóxido, 3-metilbutanal, 1-nitropentano, β -ionona, 6-metil-5-hepten-2-ona, 2-

isobutiltiazol, β -citral, geranil acetona y pseudoionona. Merece destacarse también que la mayoría de estos importantes COVs pertenecen a derivados del metabolismo de carotenoides. Otros metabolitos que pueden resaltarse fueron heptanal, 6-metil-5-hepten-2-ol, α -citral, salicilato de propilo, salicilato de isoamilo y bencilnitrilo debido a que por su estructura son considerados derivados directos de metabolitos volátiles de impacto.

Además en estas neuronas se encontraron COVs sin identificar (UNK) y otros metabolitos que no han sido asociados a las características sensoriales del tomate y que presentaron correlación con el sabor característico. Pueden nombrarse a 2-pentilfurano, decanal, *p*-metoxitolueno, 2-octenal, benzofenona, 8-pentadecanona, α -hexil cinamaldehído, carvona, 2-decenal y 2-dodecanona. Los COVs sin identificar fueron UNK m/z 119, UNK m/z 68, UNK m/z 57-2, UNK m/z 55 y UNK m/z 115.

Otro dato interesante corresponde a la asociación de la variable sensorial dulzura con el sabor característico. No es extraño que estas dos características sean complementarias debido al aporte de los azúcares y su importancia en la degustación del fruto. La dulzura es considerada como un importante parámetro de calidad junto con el aroma y la acidez^[16].

La información obtenida por los ARNeu permitió remarcar cuales metabolitos se asociaron diferencialmente con el olor y sabor característico del fruto. En forma detallada fue posible identificar cada uno de los compuestos volátiles asociados en las zonas de COVs (Zona 2 y 3) donde se situaron los mejores exponentes sensoriales de la cosecha.

Análisis Específico de los Compuestos Orgánicos Volátiles de la Cosecha 2009

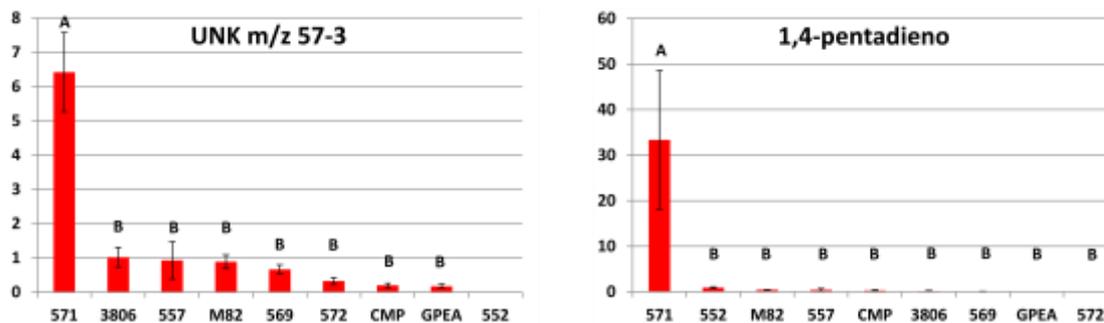
El análisis particular de algunos metabolitos volátiles, basado en la información obtenida en los análisis de ACP y ARNeu, permite identificar relaciones específicas entre cultivares y grupos de cultivares y determinados compuestos volátiles. A continuación se detallarán algunos ejemplos de estos casos.

En la Zona 1 del gráfico de ACP (Figura 3), se encontraron pocos metabolitos volátiles asociados a una región influenciada por las variedades M82, CMP, 557 y 571 (Grupo-1), que presentaron mayormente características sensoriales poco apreciadas.

Los metabolitos incluidos en esta sección fueron metil butanoato, 1,4-pentadieno, hexanal y 2-metil-3-fenil-1-propeno, presentando un mayor aporte de los derivados de ácidos grasos. Dentro de los COVs aglomerados en esta zona, ningún metabolito se correlacionó con el olor y sabor mediante los resultados de ARNeu.

Estas variables fueron evaluadas por medio del Análisis de Varianza (ANAVA, con un nivel de significancia de $\alpha=0,05$) demostrando que presentaron diferencias significativas entre los cultivares. Por medio de un test de comparación *a posteriori* (DGC, Infostat) se identificó cuales variedades fueron las responsables de las diferencias encontradas. En las Figuras 13 y 14 se grafican comparativamente los niveles de los COVs encontrados en la Zona 1. El eje vertical de los gráficos de ANAVA de este y los posteriores análisis corresponde al área normalizada del metabolito graficado.

En el Anexo Digital ANAVA-2009 se encuentran los resultados de los análisis de varianza para cada uno de los metabolitos mencionados que no se encuentren graficados a continuación.



Figuras 13 y 14. Niveles de COVs de la Zona 1 de la cosecha 2009.

Letras diferentes demuestran niveles de significancia distintos para el análisis de varianza ($\alpha=0.05$).

Las dos variables UNK m/z 57-3 y 1,4-pentadieno demostraron niveles significativamente diferentes en la variedad 571 en forma específica. Un caso similar ocurre con UNK m/z 43 expresando un nivel superior estadísticamente significativo en 571 sobre el resto de las variedades (Figura 1 Anexo Digital ANAVA-2009). A pesar de no contar con información sensorial del 1,4-pentadieno y no conocer la identidad de las señales UNK m/z 57-3 y UNK m/z 43, el perfil observado sugiere que estos COVs podrían estar relacionados con las características poco apreciadas que presentó este cultivar por parte de los jueces sensoriales.

Los demás COVs de la Zona 1 metil butanoato, 2-metil-3-fenil-1-propeno y UNK m/z 147 presentaron niveles más elevados en las variedades del Grupo-1 aunque más parejos entre todos los cultivares de la cosecha (Figuras 5-25-44 de Anexo Digital ANAVA-2009).

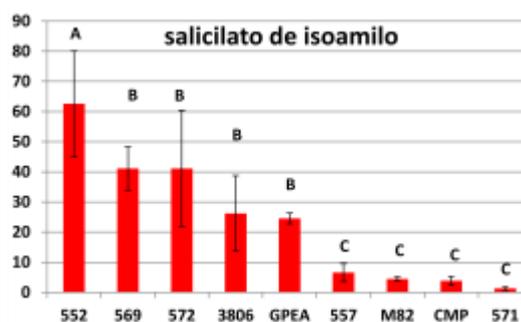
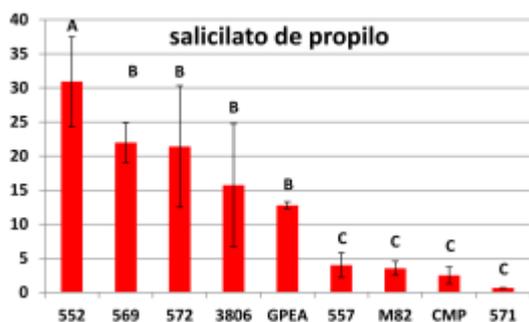
En forma particular, el único metabolito de impacto de este grupo fue hexanal (Figura 10 de Anexo Digital ANAVA-2009). Respecto de este derivado de ácidos grasos, se observó una abundancia similar entre todas las variedades, excepto para los cultivares 552 y 571. Interessantemente, los niveles más elevados de este COVs se presentaron en estas variedades con media y baja aceptación sobre su olor. Las características sensoriales de este metabolito están asociadas a notas de tipo herbáceo y tomate inmaduro cuando se presentan en concentraciones elevadas^[17]. En base a esta información y los niveles encontrados podría sugerirse que este compuesto contribuiría en forma negativa sobre el desarrollo del aroma característico del fruto.

En la Zona 2, se observó una gran acumulación de metabolitos con mayor aporte de derivados de aminoácidos, ácidos grasos y carotenoides. Relacionados a esta sección se ubicaron los cultivares del Grupo-2, teniendo como mejores exponentes sensoriales a 572, 569 y 552 mientras que GPEA fue el menos aceptado. Debe considerarse que los COVs pertenecientes a la Zona 2 fueron las variables que más fuertemente se asociaron al sabor característico mediante ARNeu (Tablas 6 y 7).

La distribución de COVs obtenida en la Figura 3 permitió identificar en los extremos de la Zona 2 los metabolitos que contribuyeron con mayor fortaleza a la diferenciación metabólica de los cultivares asociados a esta región. Los metabolitos fueron salicilato de propilo, salicilato de isoamilo, 3-metilbutanal, α -hexil cinamaldehído,

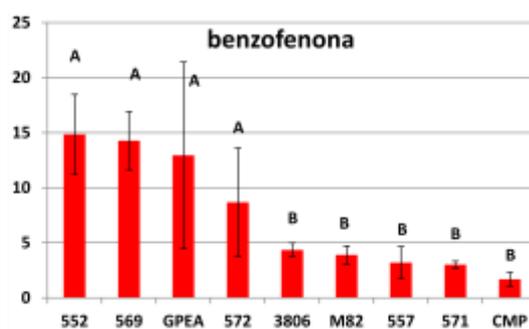
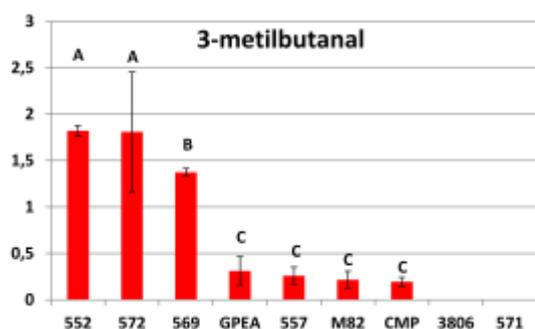
3-metilheptilacetato, benzofenona, β -damascenona, β -ionona y β -ionona epóxido. Sobre estos COVs merece distinguirse los tres últimos, derivados de carotenoides, que forman parte de los metabolitos de impacto^[2, 12]. Es destacable el hecho de que todos ellos fueron relacionados exclusivamente al sabor característico mediante el análisis por ARNeu.

En las Figuras 11 a 16 y Figuras 31-46-47-54 del Anexo Digital ANAVA 2009 se grafican comparativamente los niveles de los COVs mencionados.



Figuras 11 y 12. Niveles de COVs de la Zona 2 de la cosecha 2009.

Letras diferentes demuestran niveles de significancia distintos para el análisis de varianza ($\alpha=0.05$).



Figuras 13 y 14. Niveles de COVs de la Zona 2 de la cosecha 2009.

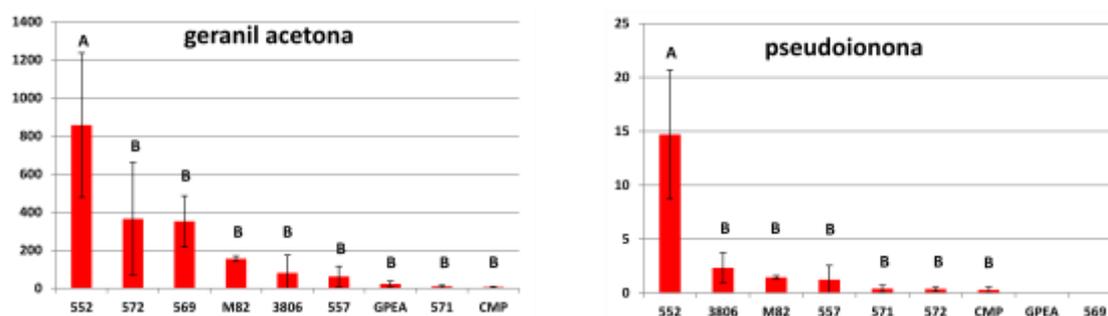
Letras diferentes demuestran niveles de significancia distintos para el análisis de varianza ($\alpha=0.05$).

Los COVs graficados en las anteriores figuras fueron algunos de los responsables de acentuar con mayor firmeza la diferenciación metabólica de los cultivares del Grupo-2 del resto de la cosecha. Además todos ellos fueron relacionados exclusivamente al sabor característico mediante el análisis por ARNeu. Puede observarse que los mayores niveles de abundancia con diferencias significativas se expresaron en los cultivares del Grupo-2, 552, 569, 572, GPEA y ocasionalmente en 3806. Todo estos cultivares, excepto GPEA, presentaron buenas características sensoriales. Un comportamiento similar se observó en los metabolitos α -hexil cinamaldehído, 3-metilheptil acetato, β -ionona y β -ionona epóxido expresándose en mayor abundancia en los cultivares mencionados del Grupo-2 (Figuras 31-46-47-54 del Anexo Digital ANAVA 2009).

El metabolito de impacto salicilato de metilo, considerado uno de los más importantes compuestos volátiles ^[12, 18], presentó un perfil distintivo en los cultivares de la cosecha. Este metabolito presentó el máximo nivel de expresión en GPEA, un cultivar poco apreciado, seguido de los cultivares 557, 569 y 3806, los más aceptados de la cosecha (Figura 36 del Anexo Digital ANAVA). Es conocido que este compuesto aporta notas de tipo mentolado, fenólico, balsámico en elevadas concentraciones y

características dulces y aromáticas en menor proporción^[17, 19]. Este comportamiento permite inferir acerca de la importancia de determinados compuestos químicos que pueden favorecer o perjudicar la apreciación sensorial de acuerdo a la concentración presente en la matriz. La abundante expresión de salicilato de metilo podría favorecer las características poco apreciadas en los frutos de la variedad GPEA.

El cultivar 552 presentó asociación con una gran cantidad de importantes compuestos debido a los elevados niveles que expresó en sus frutos. Particularmente los derivados de carotenoides 6-metil-5-hepten-2-ona, 6-metil-5-hepten-2-ol, β -citral, carvona, α -citral, β -damascenona, geranil acetona, β -ionona, β -ionona epóxido y pseudoionona presentaron los niveles más altos en este cultivar. En las Figuras 15 y 16 de esta sección y las Figuras 17-18-38-39-41-43-45-46-47-51 del Anexo Digital ANAVA 2009 se grafican los niveles de los COVs mencionados.



Figuras 15 y 16. Niveles de COVs de la Zona 2 de la cosecha 2009.

Letras diferentes demuestran niveles de significancia distintos para el análisis de varianza ($\alpha=0.05$).

Es conocido que muchos de estos compuestos volátiles derivados del metabolismo de carotenoides son considerados de impacto^[12] y promueven características sensoriales que benefician el desarrollo del olor y sabor característico del tomate. En forma general, las notas que aportan estos COVs son de tipo frutal, floral, tropical y dulce^[17]. Todos estos metabolitos formaron parte del conglomerado más cercano al sabor característico y se expresaron en un fruto con una buena valoración sensorial, 552, esto permite afirmar la gran importancia de estos COVs en el incremento de los caracteres sensoriales más apreciados en el fruto del tomate.

Además de estos derivados de carotenoides este cultivar también presentó niveles más abundantes de otros COVs de impacto derivados de leucina e isoleucina como 3-metilbutanal, 3-metil-1-butanol, nitropentano y 2-isobutiltiazol^[13, 14] (Figuras 2-6-13-20 del Anexo Digital ANAVA 2009).

En la Zona 2, merece destacarse como novedoso una serie de compuestos volátiles que se asociaron a los cultivares de buena calidad y al sabor característico que no han sido relacionados al fruto del tomate hasta el momento. En primer lugar puede nombrarse a una serie de derivados de ácidos grasos de cadena larga (8 a 12 átomos de carbono) que aportan notas de tipo herbáceo, fresco, oleoso como 2-octenal, 2-decenal y 2-dodecanona^[17, 20]. La estructura carbonada de estos COVs sugiere un origen a partir de ácidos grasos de cadena larga que no han sido extensamente clivados por acción de enzimas lipooxigenasas (LOX) e hidroperoxiliasas (HPL) localizadas en la ruta biosintética^[5]. También pueden nombrarse a compuestos que contiene un grupo

aromático en su estructura como benzofenona, salicilato de propilo, salicilato de isoamilo y *p*-metoxitolueno que aportan notas de tipo floral y frutal. Por último 2-pentilfurano, un derivado de ácidos grasos, aportando notas de tipo terroso, dulce y caramelo^[17]. En base a las características sensoriales de los COVs mencionados, estos podrían combinarse armónicamente junto con otros metabolitos para favorecer el desarrollo de buenas características en el fruto del tomate.

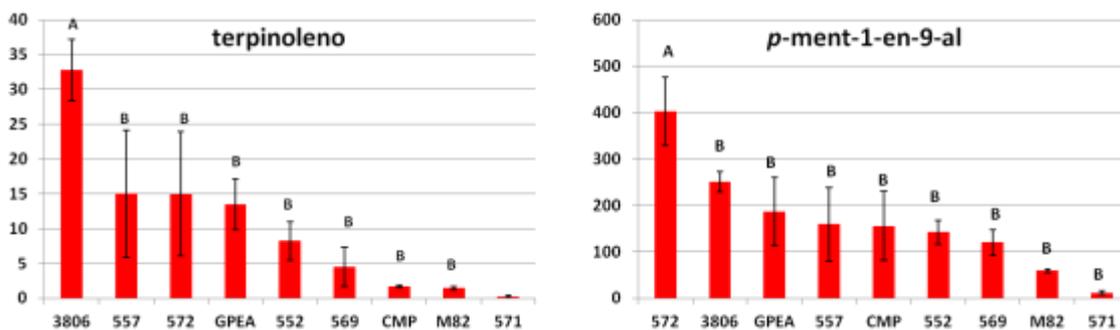
Por último los metabolitos volátiles más cercanos al olor característico, determinados mediante ARNeu (Tablas 4 y 5), se ubicaron en la Zona 3 del gráfico de ACP (Figura 3). La variedad 3806 con la mejor clasificación sensorial sobre el olor coincidió con la misma región del plano de la zona mencionada (Figura 2).

Algunas correlaciones de interés pudieron observarse entre este cultivar de tipo perita y los COVs de la Zona 3. Primeramente deben destacarse los metabolitos volátiles de impacto, estos fueron *cis*-3-hexenal, fenilacetaldehído, 2-feniletanol y linalool. Es por demás conocido que estos compuestos aportan notas generales de tipos herbáceo, floral y cítrico respectivamente que suman a desarrollar el aroma característico del fruto ^[2, 12]. Los niveles de estos COVs pueden observarse en las Figuras 9-21-27-29 del Anexo Digital ANAVA 2009. Los metabolitos mencionados presentaron en forma general una mayor abundancia en la variedad 3806 y los cultivares de mejor calidad sensorial.

Seguidamente otros compuestos volátiles que no han sido asociados al olor y sabor del fruto del tomate presentaron relación con esta importante variable sensorial. Pueden nombrarse por ejemplo a 2-etil-1-hexanol, tolueno, alcanfor, DMHEX, *p*-ment-1-en-9-al, terpinoleno, 2-metilacetofenona, 1-fenil-1-propanol y óxido geránico. A su vez, también fue posible observar otros COVs que han sido relevados previamente en estudios de perfilado de COVs de tomate pero no cuentan con ensayos que confirmen su acción sobre el olor del tomate. Estos COVs fueron 2-etilfurano, benzaldehído y α -terpineol.

Considerando los COVs mencionados, fue posible observar la presencia de diversos terpenoides. Es conocido que por lo general estos derivados representan un bajo porcentaje de abundancia en los frutos y poseen mayor representación en otras partes aéreas de la planta^[21], a pesar de ello su presencia se hizo evidente en los frutos analizados de la variedad 3806. Estos COVs aportan notas de tipo floral, especiado y cítrico y pueden ser relacionados con frutos como naranjas^[22], uvas^[23], frutillas^[24], uva espina^[25] y peras^[26]. Pueden nombrarse a *p*-ment-1-en-9-al, óxido geránico, alcanfor, α -terpineol y terpinoleno ubicados en la Zona 3 y en el conglomerado del olor característico.

En las Figuras 17 y 18 se exponen los niveles de algunos de los derivados terpénicos de la Zona 3. En ellos puede observarse que los COVs expresaron los niveles más abundantes en los cultivares más destacados sensorialmente, terpinoleno en 3806 y *p*-ment-1-en-9-al en 572. Otros terpenoides como óxido geránico, terpinoleno, alcanfor y α -terpineol presentaron un comportamiento similar aunque con menores diferencias entre las variedades (Figuras 16-23-30-35 del Anexo Digital ANAVA 2009).



Figuras 17 y 18. Niveles de COVs de la Zona 3 de la cosecha 2009.

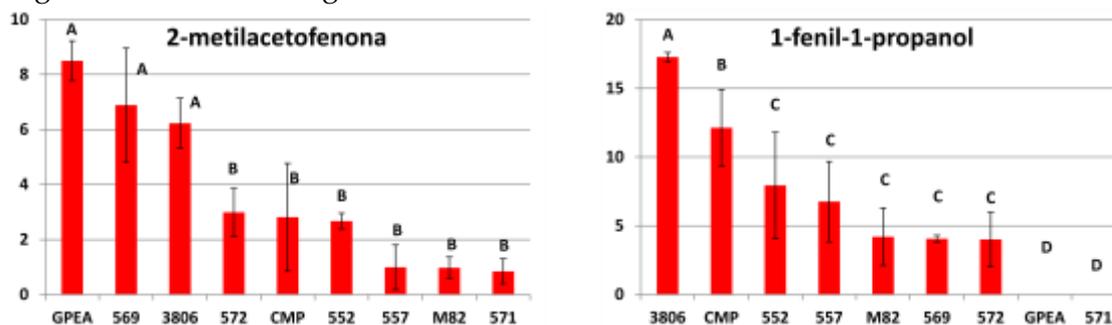
Letras diferentes demuestran niveles de significancia distintos para el análisis de varianza ($\alpha=0.05$).

Otros metabolitos volátiles que no han sido relacionados hasta el momento con el olor del fruto del tomate fueron los derivados de aminoácidos aromáticos 2-metilacetofenona, 1-fenil-1-propanol, 2-feniletil acetato y bencil acetato. Estos COVs fueron identificados también formando parte de los COVs de otros frutos y flores ornamentales como mangos^[27], frambuesas^[28], jazmines^[29] y petunias^[30], entre otros.

Los derivados volátiles conteniendo un anillo aromático principalmente derivan del metabolismo de la fenilalanina, siendo el fenilacetaldehído y 2-feniletanol los exponentes más importantes con influencia sobre la apreciación sensorial. Por lo general este tipo de compuestos aportan matices florales, dulces y balsámicos^[17] en concentraciones bajas a moderadas y características desagradables cuando se presentan en niveles muy elevados en los frutos.

Los ésteres acéticos, bencil acetato y 2-feniletil acetato, presentan una controversia respecto a su comportamiento. Es conocido su aporte positivo en frutos y flores, como fue mencionado, pero además en tomates de tipo silvestre son señalados como responsables de contribuir a una apreciación sensorial poco agradable^[31]. Estos casos se presentan en especies silvestres de tomate, como por ejemplo *S. pennellii* o *S. pimpinellifolium* que poseen una producción exagerada de estos, y otros COVs, y poseen un apreciación sensorial muy desagradable ^[32].

Particularmente los metabolitos 2-metilacetofenona, 2-feniletil acetato y 1-fenil-1-propanol, además de poseer características sensoriales de tipo floral, se correlacionaron con el cultivar 3806 expresando sus máximos niveles. Además fue posible observar una correlación con otras variedades de buena calidad organoléptica como 569, 572 y 552, con diferencias estadísticamente significativas. En las Figuras 19 y 20 y Figura 40 del Anexo Digital ANAVA 2009 se grafican los niveles de estos COVs.



Figuras 19 y 20. Niveles de COVs de la Zona 3 de la cosecha 2009.

Letras diferentes demuestran niveles de significancia distintos para el análisis de varianza ($\alpha=0.05$).

A este comportamiento debe considerarse también el benzaldehído graficado anteriormente (Figura 18), derivado de la misma ruta metabólica, asociado al olor característico y expresado en mayor abundancia en el cultivar 3806.

En resumen, en la Zona 3 fue posible determinar mediante ARNeu los COVs detallados como los más influyentes sobre el olor característico del fruto del tomate. Mayoritariamente los COVs remarcados demostraron niveles estadísticamente significativos en el cultivar 3806 o en otros cultivares que fueron señalados con buenas características organolépticas.

Conclusiones de la Cosecha 2009

El análisis de la cosecha de tomates del año 2009 fue llevado a cabo utilizando técnicas de análisis multivariado con distintos enfoques. A partir del análisis de AC y ACP fue posible sectorizar 3 grupos diferentes de cultivares con características metabólicas de COVs distintas. Estos grupos determinados también mantuvieron, en general, una relación de acuerdo a la clasificación sensorial de los cultivares.

El Grupo-1 de cultivares conteniendo a M82, CMP, 571 y 557 fue clasificado como la zona de menor calidad sensorial asociando poca cantidad de COVs con un origen metabólico predominantemente de ácidos grasos.

El análisis de ARNeu permitió detallar los metabolitos volátiles que se asociaron con mayor fortaleza con el olor y sabor característico del tomate en forma específica. El olor característico presentó correlación con los metabolitos incluidos en la Zona 3 y el sabor característico se asoció a los COVs de la Zona 2.

La Zona 3 posee una gran influencia del cultivar 3806, expresando en sus frutos el mejor olor de toda la cosecha. Esta región tuvo mayor aporte de las vías metabólicas de ácidos grasos, aminoácidos y terpenos.

La Zona 2 se relacionó con los cultivares del Grupo-2, 572, 569, 552 y GPEA. Los metabolitos más abundantes de esta región provienen de las vías de los carotenoides, aminoácidos y en menor medida los ácidos grasos. En este grupo de cultivares las variedades 572, 569 y 552 fueron los mejores exponentes sensoriales. Particularmente el genotipo 552 contuvo los mayores niveles de los derivados volátiles de carotenoides y aminoácidos de la Zona 2.

Análisis de los Compuestos Orgánicos Volátiles de la Cosecha 2010

La cosecha realizada en marzo de 2010 abarcó 12 variedades distintas de tomate, de los cuales se utilizaron tres réplicas biológicas para determinar el perfil de metabolitos volátiles. En esta cosecha además de las variedades de tomates comestibles de la especie *S. lycopersicum* se sumó al análisis la especie silvestre *S. pimpinellifolium*.

Siguiendo el esquema de análisis de la cosecha 2009, un análisis de conglomerados (AC) fue utilizado primeramente para observar el agrupamiento natural de los cultivares y las réplicas dentro de cada variedad. En la Figura 1 se grafica el resultado del AC de la cosecha 2010.

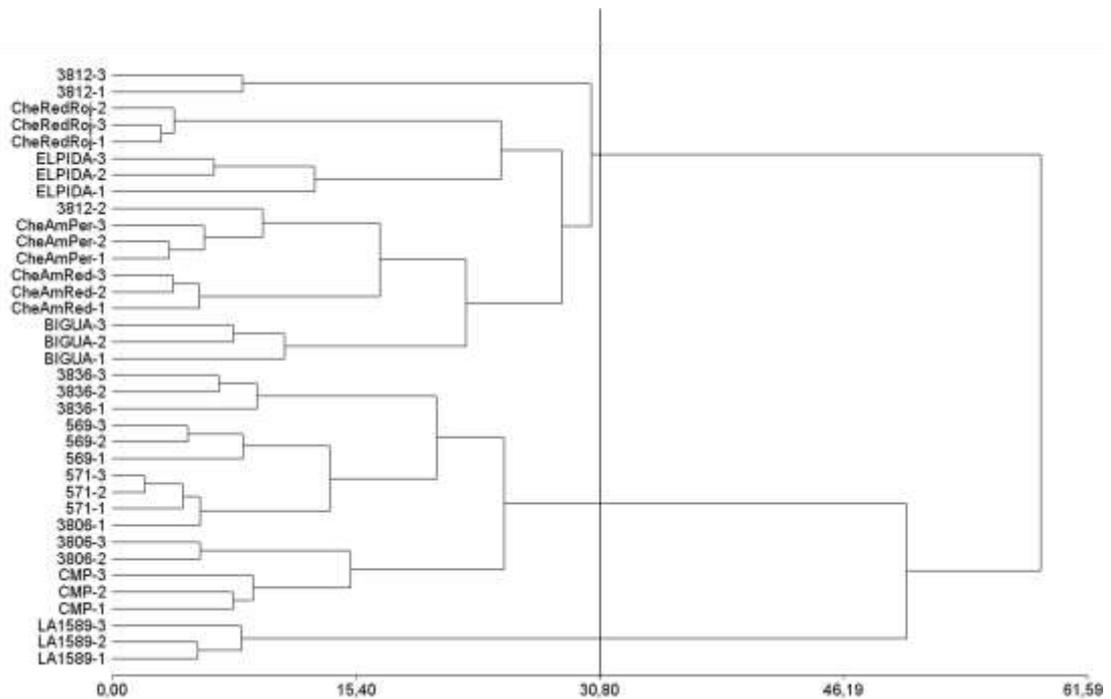


Figura 1. Análisis de Conglomerados de las variables metabólicas de la cosecha 2010.
Cultivares de la cosecha 2010.

(Algoritmo de Clasificación: Encadenamiento Promedio, Distancia: Gower).

En el dendrograma se observó, con excepciones de las réplicas 3812 y 3806, que las 3 réplicas analizadas de cada uno de los genotipos fueron agrupadas entre sí, reflejando una variabilidad biológica en cada cultivar inferior a la observada entre cultivares. Puede observarse este comportamiento en la formación de pequeños conglomerados a corta distancia entre repeticiones y a mayores distancias entre cultivares.

A nivel más general puede observarse que a un corte significativo del 50 % de la máxima distancia gráfica, pudieron reconocerse 3 conglomerados de cultivares diferentes. El primero de ellos se encuentra formado por las variedades 3812, ELPIDA, BIGUA y los tres cultivares de tipo cherry: Cherry Redondo Rojo (CheRedRoj), Cherry Amarillo Perita (CheAmPer) y Cherry Amarillo Redondo (CheAmRed). El segundo grupo se conformó con 3836, 569, 571, 3806 y CMP. Por último el cultivar silvestre, LA1589, fue la variedad más diferenciada uniéndose al segundo conglomerado a una distancia bastante lejana del origen.

Posteriormente se realizó un análisis de componentes principales (ACP) para observar la agrupación entre los cultivares y la distribución de los metabolitos volátiles asociados a cada una de las variedades. En la Figura 2 se esquematiza el biplot del ACP de la cosecha 2010.

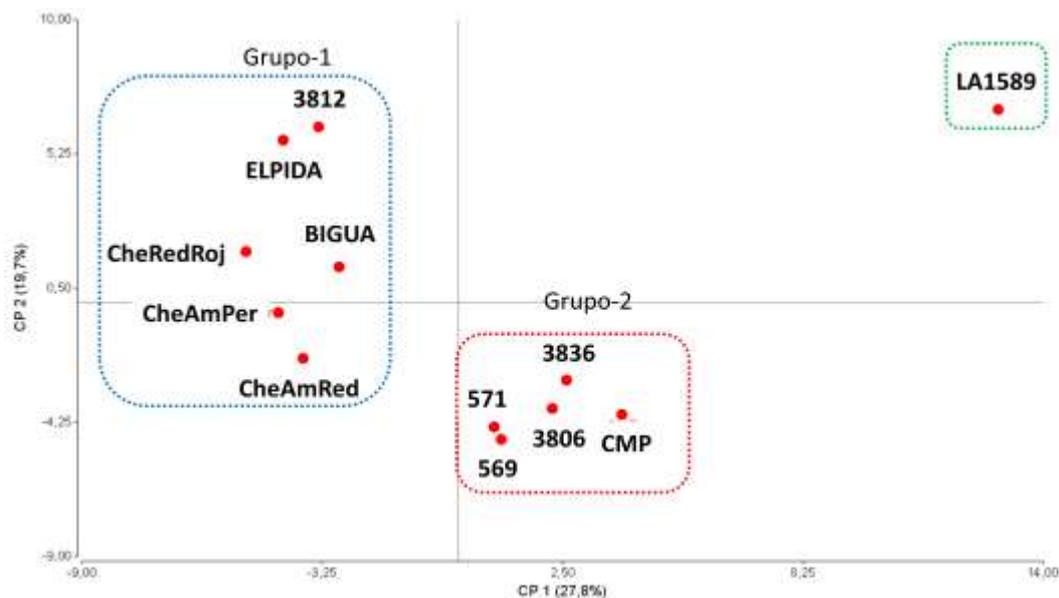


Figura 2. Análisis de Componentes Principales de los COVs de la cosecha 2010. Cultivares de la cosecha 2010.

En la gráfica de ACP se encuentra representado el 47,5 % de la variabilidad total del conjunto de datos, siendo el eje CP1 con el 27,8 % el mayor contribuyente de la representación multidimensional y el eje CP2 con el 19,7 %.

Tomando como referencia el análisis previo, en este gráfico del ACP pudo observarse la distribución de los cultivares en congruencia con los grupos descritos en el AC. El Grupo-1 incluyó a 3812, ELPIDA, BIGUA, CheRedRoj, CheAmPer y CheAmRed y se ubicó en sección de los valores negativos del eje CP1. Dentro de este grupo el eje CP2 permitió separar en mayor medida las variedades 3812 y ELPIDA, dos frutos de tipo redondo, de las tres variedades tipo cherry. El Grupo-2 se ubicó en la porción derecha del eje CP1 en las cercanías del centro de la gráfica. Este grupo contuvo las variedades 571, 569, 3806 de tipo perita, 3836 de tipo redondo y CMP, un fruto tipo cherry de color morado verdoso.

Por último el cultivar silvestre LA1589, *S. pimpinellifolium*, se posicionó en forma muy aislada del resto de las variedades tomando valores muy positivos del eje CP1 y CP2 en la gráfica del biplot. Este comportamiento se debe a las amplias diferencias metabólicas entre esta especie y las variedades de la especie domesticada (*S. lycopersicum*). También fue posible observar esta distribución en la cosecha 2009. La especie silvestre se separó completamente del resto de los cultivares de la cosecha 2009 en base a sus características metabólicas diferenciales. En el Anexo Digital ACP-Cosecha 2009 se encuentran los gráficos multivariados incluyendo este cultivar.

Teniendo en cuenta la distribución de las variedades y su agrupación natural definida por las variables metabólicas volátiles, pudo relacionarse esta disposición con la

información sensorial de los cultivares. Debe recordarse que los cultivares de mayor apreciación en la cosecha 2010 fueron 569, 3812, 3836, 3806, CheRedRoj y ELPIDA para el olor y sabor del fruto. En el sentido opuesto, las variedades de menor aceptación fueron BIGUA, LA1589, CheAmRed, CheAmPer y CMP específicamente para el olor.

Considerando estos aspectos, el Grupo 2 contuvo en mayor medida cultivares que fueron elegidos entre los más aceptados y algunos, como CMP, con una valoración media. En el Grupo 1 fue posible observar variedades que poseen malas y buenas devoluciones sensoriales en forma muy cercana, como por ejemplo BIGUA y los cherrys amarillos cercanos a 3812 y CheRedRoj. Como fue esperable el cultivar silvestre, LA1589, demostró la menor calidad sensorial de todos los frutos de la cosecha.

La distribución de las variedades y su agrupación también se refleja en la proyección de los metabolitos volátiles en el mismo plano. En la Figura 3 se ejemplifica la distribución de los COVs de la cosecha 2010.

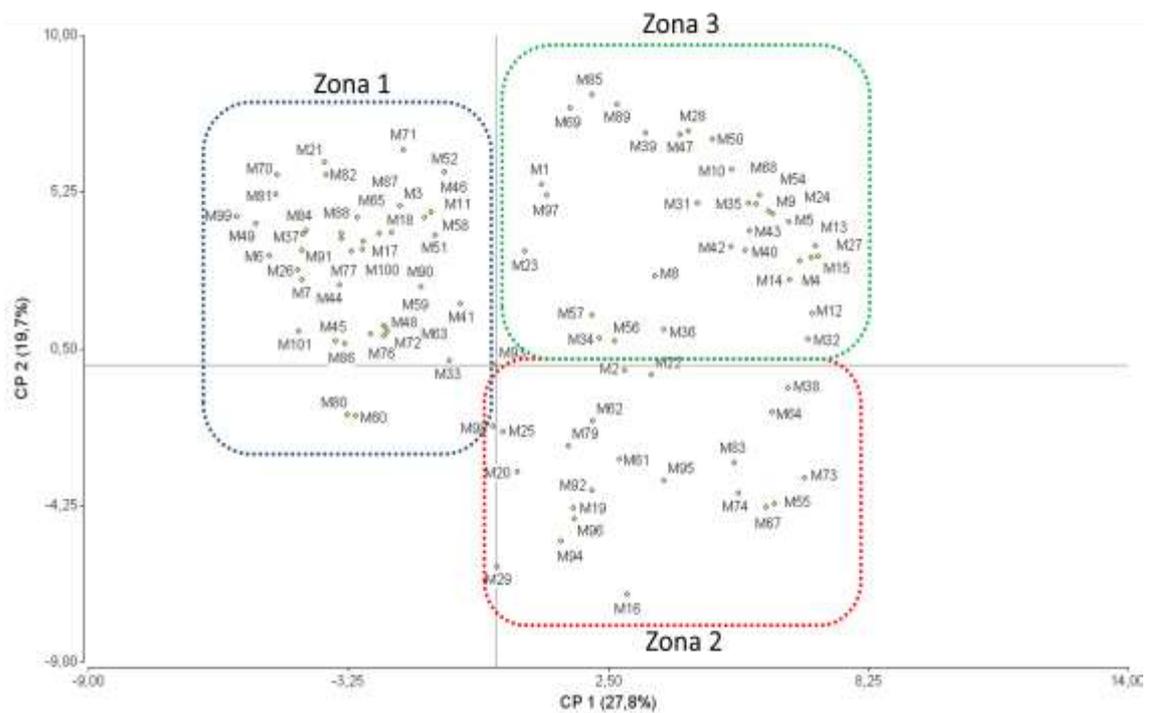


Figura 3. Análisis de Componentes Principales de los COVs de la cosecha 2010.

La distribución de las variables volátiles permitió demarcar 3 zonas diferentes en el plano de análisis, la Zona 1 situada a la izquierda del eje CP1 y las Zonas 2 y 3 ubicadas en el extremo opuesto del mismo eje pero separadas por su ubicación en el eje CP2.

La Zona 1 presentó mayor asociación con los cultivares 3812, ELPIDA, BIGUA y las tres variedades de tomates cherrys: Cherry Redondo Rojo, Cherry Amarillo Redondo y Cherry Amarillo Perita del Grupo-1. La Zona 2 coincidió con los cultivares 3836, 3806, 569, 571 y CMP. Por último, la especie silvestre, LA1589, se asoció en mayor medida a las variables ubicadas en la Zona 3.

Un análisis más esquemático de la distribución de COVs fue realizado teniendo en cuenta el origen metabólico de cada una de las variables. En la Figura 4 se encuentran graficados los compuestos volátiles de acuerdo a la vía metabólica de la cual derivan.

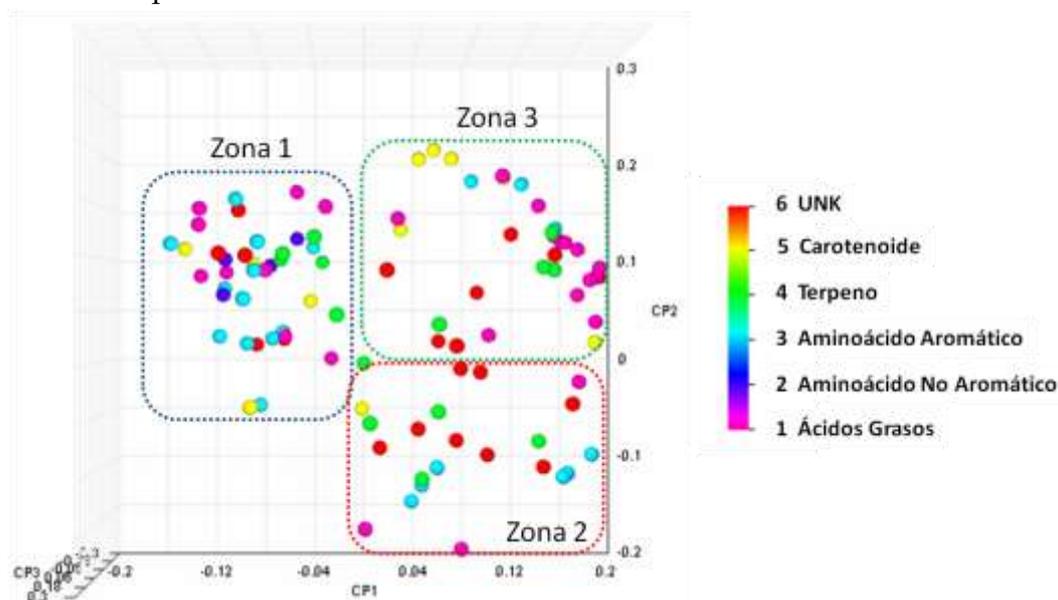


Figura 4. Distribución de COVs de acuerdo a su origen metabólico

En la figura anterior puede observarse la predominancia de los derivados de aminoácidos (azul y celeste) y ácidos grasos (violeta) en la Zona 1, una distribución pareja entre aminoácidos, terpenos (verde) y ácidos grasos en la Zona 2, y por último una abundancia notoria de ácidos grasos y algunos carotenoides (amarillo) en la Zona 3.

En las tablas siguientes se detallan los COVs incluidos dentro de cada una de las zonas demarcadas especificando el origen metabólico de cada uno de los compuestos. La clasificación metabólica corresponde a los cuatro orígenes diferentes mencionados previamente: ácidos grasos (AG), aminoácidos (AA), terpenoides (TER), carotenoides (CAR) y las señales sin identificar (UNK).

En la Tabla 1 se nombran los COVs incluidos dentro de la Zona1 del análisis de la cosecha 2010.

Tabla 1. COVs integrantes de la Zona 1 de la cosecha 2010.

Zona 1					
Código	Nombre	Origen	Código	Nombre	Origen
M3	3-metilbutanal	AA	M60	salicilato de metilo	AA
M6	metil butanoato	AG	M63	dimetilbenzaldehído	AA
M7	3-metil-1-butanol	AA	M65	β -citral	CAR
M11	tolueno	AA	M70	2-undecanona	AG
M17	1-nitropentano	AA	M71	2,4-decadienal	AG
M18	α -pineno	TER	M72	2-undecanol	AG
M21	<i>p</i> -metoxitolueno	AA	M76	UNK m/z 95	UNK
M26	benzaldehído	AA	M77	eugenol	AA
M33	octanal	AG	M80	β -damascenona	CAR
M37	2-isobutiliazol	AA	M81	2-metil-2-octen-4-ona	AG
M41	terpinoleno	TER	M82	UNK m/z 68	UNK
M44	2-metil-3-fenil-1-propeno	AA	M84	UNK m/z 147	UNK
M45	guayacol	AA	M86	2,5-ditertbutilbenzoquinona	AA
M46	linalool	TER	M87	lilial	AA

Zona 1					
Código	Nombre	Origen	Código	Nombre	Origen
M48	2-metilacetofenona	AA	M88	UNK m/z 131	UNK
M49	α -isoforona	CAR	M90	β -ionona epóxido	CAR
M51	alcanfor	TER	M91	2-dodecanona	AG
M52	3-metilheptilacetato	AG	M99	benzofenona	AA
M58	α -terpineol	TER	M100	8-pentadecanona	AG
M59	decanal	AG	M101	α -hexil cinamaldehído	AA

AA: aminoácidos, AG: ácidos grasos, TER: terpenos, CAR: Carotenoides y UNK: desconocidos.

Dentro de este grupo de variables pudo observarse una gran abundancia de derivados de aminoácidos y de ácidos grasos aportando un 43 % y 25 % de los metabolitos totales (Figura 4). Respecto de estos últimos COVs debe notarse la estructura de los metabolitos, estos presentaron cadenas alquílicas entre ocho y quince átomos de carbono, como por ejemplo octanal, decanal, 2,4-decadienal, 2-undecanona, 2-undecanol, 2-dodecanona, 2-metil-2-octen-4-ona y 8-pentadecanona. Esto sugiere su origen a partir de ácidos grasos de cadena larga poco fragmentados durante su biosíntesis^[20].

Los derivados de aminoácidos fueron los contribuyentes mayoritarios en este grupo. Entre ellos se asociaron los derivados volátiles de leucina, considerados dentro de los metabolitos de impacto, 3-metilbutanal, 3-metil-1-butanol, 1-nitropentano y 2-isobutiliazol. Sin embargo, los derivados volátiles con residuos aromáticos, principalmente de la fenilalanina, fueron los más abundantes. Entre ellos se destacan benzaldehído, eugenol y guayacol como los más reconocidos y salicilato de metilo denominado como volátil de impacto^[12, 19]. No obstante, otros derivados aromáticos volátiles como tolueno, *p*-metoxitolueno, 2-metil-3-fenil-1-propeno, 2-metilacetofenona, dimetilbenzaldehído, benzofenona y α -hexilcinamaldehído también se asociaron en esta zona.

Otros metabolitos importantes destacados en esta zona fueron los COVs de impacto β -citral, β -damascenona, β -ionona epóxido y linalool.

En la Tabla 2 se enumeran los COVs incluidos dentro de la Zona 2 del análisis de la cosecha 2010.

Tabla 2. COVs integrantes de la Zona 2 de la cosecha 2010.

Zona 2					
Código	Nombre	Origen	Código	Nombre	Origen
M2	UNK m/z 43	UNK	M64	UNK m/z 57-2	UNK
M16	heptanal	AG	M67	2-feniletil acetato	AA
M19	limoneno óxido	TER	M73	duraldehído	AA
M20	UNK m/z 83	UNK	M74	UNK m/z 57-3	UNK
M22	UNK m/z 93-1	UNK	M79	UNK m/z 161	UNK
M25	óxido geránico	TER	M83	verdil acetato	TER
M29	2-pentilfurano	AG	M92	1-fenil-1-propanol	AA
M38	2-octenal	AG	M94	salicilato de propilo	AA
M55	bencil acetato	AA	M95	UNK m/z 115	UNK
M61	UNK m/z 119	UNK	M96	salicilato de isoamilo	AA
M62	<i>p</i> -ment-1-en-9-al	TER	M98	β -metilionona	CAR

AA: aminoácidos, AG: ácidos grasos, TER: terpenos, CAR: Carotenoides y UNK: desconocidos.

La Zona 2 incluyó menos cantidad de variables que la anterior y la influencia de los grupos metabólicos no reflejó grandes diferencias entre los derivados de

aminoácidos, terpenos y ácidos grasos. Estas vías metabólicas aportaron un 27%, 18% y 14% respectivamente del total de COVs (Figura 4). En esta sección no se situó ninguno de los metabolitos de impacto que fueron descriptos anteriormente. Sólo algunos derivados directos, como heptanal y β -metil ionona, y algunos otros COVs señalados en el análisis de la cosecha 2009 como posibles contribuyentes al olor característico. Entre ellos puede nombrarse a óxido geránico, *p*-ment-1-en-9-al, 2-feniletíl acetato, salicilato de propilo e isoamilo.

En la Tabla 3 se enumeran los COVs incluidos dentro de la Zona 3 del análisis de la cosecha 2010.

Tabla 3. COVs integrantes de la Zona 3 de la cosecha 2010.

Zona 3					
Código	Nombre	Origen	Código	Nombre	Origen
M1	2-metilfurano	AG	M35	limoneno	TER
M4	1-penten-3-ona	AG	M36	2-etil-1-hexanol	AG
M5	2-etil-furano	AG	M39	fenilacetaldehído	AA
M8	UNK m/z 55	UNK	M40	<i>cis</i> -linalil óxido	TER
M9	1,4-pentadieno	AG	M42	<i>trans</i> -linalil óxido	TER
M10	4-pentenal	AG	M43	UNK m/z 58	UNK
M12	<i>cis</i> -3-hexenal	AG	M47	2-nonen-1-ol	AG
M13	hexanal	AG	M50	2-feniletanol	AA
M14	<i>cis</i> -2-hexenal	AG	M54	bencilnitrilo	AA
M15	<i>trans</i> -2-hexenal	AG	M56	UNK m/z 94	UNK
M23	UNK m/z 93-2	UNK	M57	DMHEX	TER
M24	<i>trans</i> -2-heptenal	AG	M68	2-decenal	AG
M27	metil trimetoxi acetato	UNK	M69	α -citral	CAR
M28	6-metil-5-hepten-2-ona	CAR	M85	geranil acetona	CAR
M31	UNK m/z 57-1	UNK	M89	β -ionona	CAR
M32	6-metil-5-hepten-2-ol	CAR	M97	pseudoionona	CAR
M34	UNK m/z 105	UNK			

AA: aminoácidos, AG: ácidos grasos, TER: terpenos, CAR: Carotenoides y UNK: desconocidos.

Esta sección de la gráfica fue dominada por la influencia de la especie silvestre, LA1589, agrupando una gran cantidad de metabolitos. Los contribuyentes mayoritarios de la Zona 3 fueron los derivados de ácidos grasos con un 40 % y en menor medida carotenoides y terpenoides aportando 18 % y 12 % respectivamente (Figura 4). También fue posible distinguir asociados a este cultivar exótico 11 COVs de impacto, como por ejemplo 1-penten-3-ona, *cis*-3-hexenal, *trans*-2-hexenal, hexanal, *trans*-2-heptenal, 6-metil-hepten-2-ona, fenilacetaldehído, 2-feniletanol, geranil acetona, β -ionona y pseudoionona.

Análisis por Redes Neuronales Artificiales de la Cosecha 2010

En forma complementaria a los análisis multivariados presentados se analizaron en forma paralela los mismos datos metabólicos de la cosecha 2010 mediante ARNeu. Este análisis permitió determinar específicamente cuales variables se asocian a las características sensoriales de interés.

El ARNeu de la cosecha 2010 se realizó bajo el mismo esquema que la cosecha anterior. El número de conglomerados elegidos para el análisis correspondió a un mapa de 7 neuronas de salida en forma especular.

En la Figura 5 se ilustra la capa de neuronas de resultados resaltando las neuronas donde se situó el olor y sabor característico y su zona de influencia. En esta cosecha el olor característico se ubicó en la neurona N° 20 y el sabor característico en la neurona adyacente N° 19.

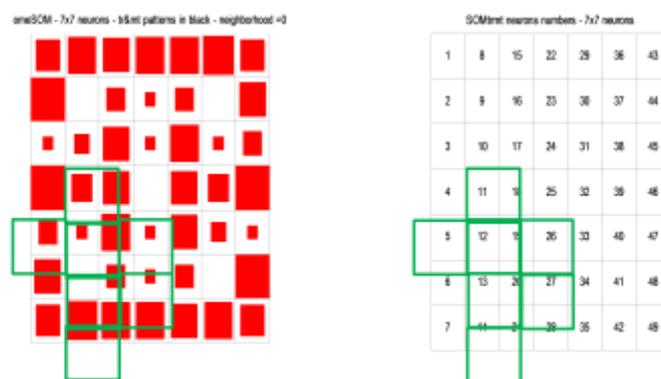


Figura 5. Mapa Neuronal de Resultados del análisis de COVs por ARNeu de la cosecha 2010.

El hecho de que las neuronas que contienen el olor y sabor característico se encuentren vecinas en la máxima proximidad denota una gran asociación entre estas variables sumamente interrelacionadas en la calidad del fruto. Las neuronas vecinas de ambos conglomerados (olor y sabor), al encontrarse tan próximas entre sí, comparten un perfil similar demostrando una gran correlación entre todas las variables que forman parte de la zona de influencia.

En la Tabla 4 se enumeran las variables incluidas en la neurona N° 20 y las vecinas N° 27 y N° 21 informando para cada metabolito cuál fue su ubicación (*n*) en las zonas delimitadas en los análisis de ACP. En la Figura 6 se grafica el detalle de la neurona que contiene el olor característico.

Tabla 4. Variables integrantes de la Neurona 20 y sus vecinos más próximos del ARNeu de la cosecha 2010.

Olor Característico (Neurona 20)							
N	V	Código	Nombre (n)	N	V	Código	Nombre (n)
20	0	Sens	Olor	20	0	Sens	Text. Piel
20	0	Sens	Cant. Pulpa				
21	1	M2	UNK m/z 43 (inv) (2)	21	1	M12	<i>cis</i> -3-hexenal (inv) (3)
21	1	M4	1-penten-3-ona (inv) (3)	21	1	M14	<i>cis</i> -2-hexenal (inv) (3)
21	1	M13	hexanal (inv) (3)	21	1	M15	<i>trans</i> -2-hexenal (inv) (3)
21	1	M27	metil trimetoxi acetato (inv) (3)	27	1	M45	guayacol (1)

N: número de neurona. V: vecindad. Sens: variable sensorial

(n): ubicación del COVs en las zonas descriptas del análisis de ACP.

A partir del análisis de la Figura 6 puede observarse que el olor característico no presentó ninguna variable metabólica directamente asociada dentro de la neurona donde se alojó el olor del fruto. En este caso la máxima correlación correspondió a otras variables de tipo sensorial como cantidad de pulpa y textura de piel.

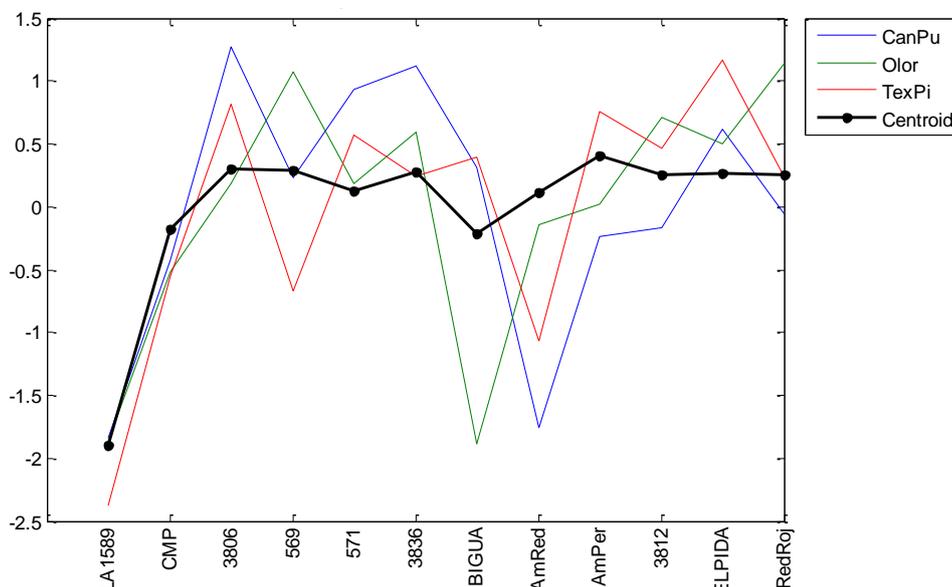


Figura 6. Detalle de la Neurona 20 del análisis de ARNeu de la cosecha 2010.

En las neuronas vecinas donde se encontró situado el olor característico, las neuronas N° 21 y N° 27 presentaron importantes metabolitos volátiles, como 1-penten-3-ona, hexanal, *cis*-3-hexenal, *cis*-2-hexenal y *trans*-2-hexenal. Es llamativo el hecho de que todos estos metabolitos mencionados son derivados de ácidos grasos^[4] y se correlacionaron en forma inversa junto con UNK m/z 43 (Figuras 13 y 14 del Anexo Digital ARNeu). La ubicación de estos COVs en el plano del ACP coincide con la Zona 3 (Figuras 2 y 3) que se encuentra muy influenciada por la presencia de LA1589.

Otro metabolito interesante que puede remarcarse dentro de las variables asociadas al olor característico fue el guayacol, un compuesto derivado de la vía de los fenilpropanoides, cercano al metabolito de impacto salicilato de metilo^[19]. Este metabolito se correlacionó con la Zona 2 donde mayormente se ubicaron los mejores exponentes sensoriales de la cosecha.

El sabor característico fue analizado del mismo modo en esta serie de datos. Esta importante variable sensorial se ubicó en la neurona N° 19, vecina a la que contuvo el olor característico. A su vez, las neuronas con vecindad +1, N° 12, N° 18 y N° 26, también formaron parte del conglomerado de sabor característico. En la Figura 7, se grafica el detalle de la neurona que contiene esta última variable sensorial mencionada.

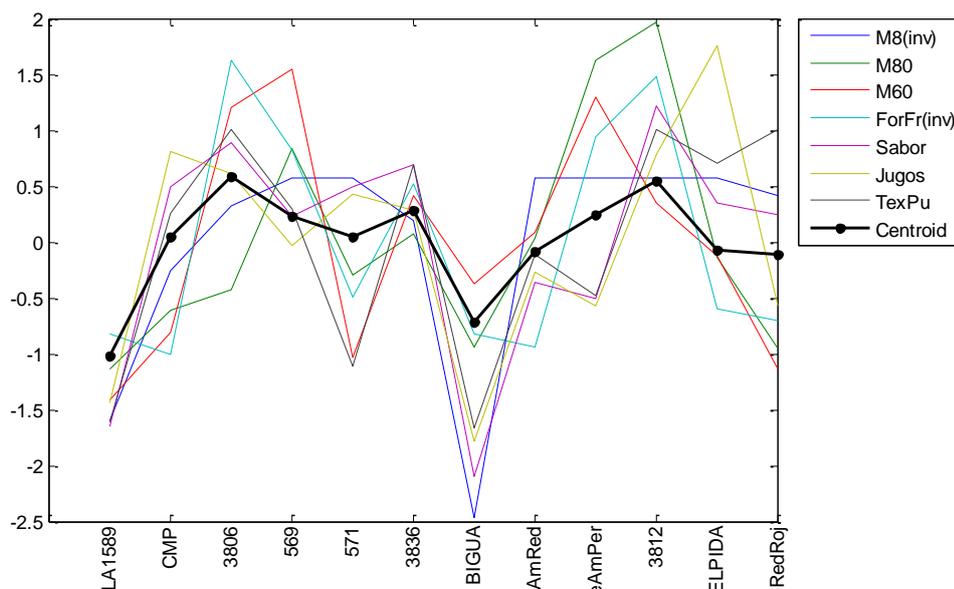


Figura 7. Detalle de la Neurona 19 del análisis de ARNeu de la cosecha 2010.

En la Tabla 5 se enumeran las variables que conforman la vecindad de la neurona N° 19 y su ubicación en las zonas delimitadas en los análisis de ACP. Los detalles gráficos de las neuronas mencionadas en la tabla se encuentran en las Figuras 17, 18 y 19 el Anexo Digital ARNeu.

Tabla 5. Variables integrantes de la Neurona 19 y sus vecinos más próximos del ARNeu de la cosecha 2010.

Sabor Característico (Neurona 19)							
N	V	Código	Nombre (n)	N	V	Código	Nombre (n)
19	0	M8	UNK m/z 55 (inv) (3)	19	0	Sens	Sabor
19	0	M60	salicilato de metilo (1)	19	0	Sens	Jugosidad
19	0	M80	β -damascenona (1)	19	0	Sens	TexPu
12	1	M51	alcanfor (inv) (1)	26	1	M59	decanal (1)
18	1	M23	UNK m/z 93-2 (3)	18	1	M90	β -ionona epóxido (inv) (1)
18	1	M25	óxido geránico (2)	18	1	Sens	Dulzura
18	1	M41	terpinoleno (1)	18	1	Sens	Acidez (inv)

N: número de neurona. V: vecindad. Sens: variable sensorial

(n): ubicación del COVs en las zonas descriptas del análisis de ACP.

El sabor característico aglomeró variables de tipo metabólico y sensorial dentro de la neurona N° 19. Dentro de las variables más importantes se puede nombrar a los metabolitos de impacto salicilato de metilo y β -damascenona. También las variables sensoriales jugosidad y textura de pulpa se correlacionaron adecuadamente con el sabor del fruto. En la vecindad se encontró otro metabolito volátil de impacto, β -ionona epóxido, aunque en este caso correlacionado en forma inversa junto con alcanfor, UNK m/z 55 y acidez. Además en las cercanías de la neurona N° 19 otras variables como óxido geránico, terpinoleno, decanal y UNK m/z 93-2 presentaron un perfil similar al expresado por el sabor característico.

En forma general pudo observarse que la mayoría de los COVs asociados al sabor característico formaron parte de la Zona 1 de las gráficas de ACP.

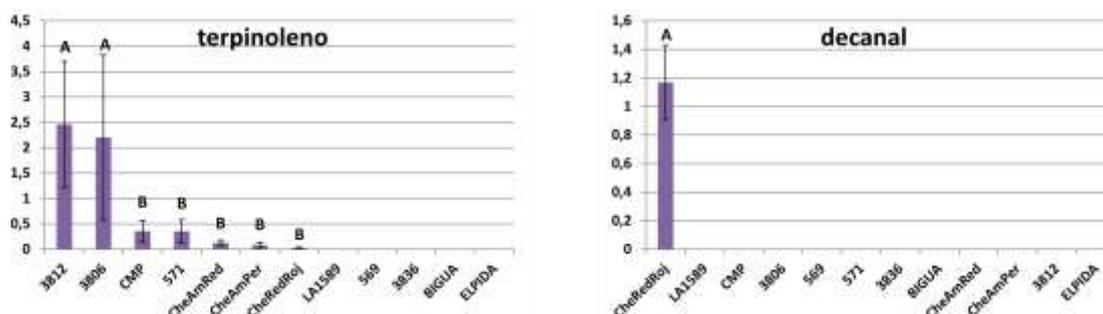
Las variables sensoriales que se encontraron vecinas al sabor del fruto fueron, jugosidad, textura de pulpa, dulzura y acidez (inv). Es conocido que estas características sensoriales son muy importantes en la apreciación de un alimento. Ya sea mediante compuestos químicos como por ejemplo los azúcares y los ácidos orgánicos^[16] para la dulzura y acidez, o por medio de la resistencia y contenido acuoso de la matriz en el proceso de masticación. La dulzura de igual forma que en la cosecha 2009 se correlacionó en forma cercana con el sabor característico del fruto.

La información obtenida por los ARNeu permitió remarcar cuales metabolitos se asociaron diferencialmente con el olor y sabor característico del fruto. En forma sencilla fue posible identificar cada uno de los compuestos volátiles asociados en las zonas delimitadas en las gráficas de ACP. Principalmente el olor característico se asoció en forma invertida con los COVs incluidos en la Zona 3 que presentó influencia del cultivar silvestre. Mientras que el sabor característico se correlacionó en mayor medida con la Zona 1, donde se ubicaron cultivares de buenas y malas cualidades sensoriales.

Análisis Específico de los Compuestos Orgánicos Volátiles de la Cosecha 2010

El análisis de ARNeu permitió reducir en gran medida los COVs totales a determinadas variables más íntimamente relacionadas a las variables sensoriales de interés. A continuación se detallan algunas correlaciones particulares entre los cultivares y los metabolitos volátiles.

En la Zona 1 se ubicaron en mayor parte los metabolitos asociados al sabor del fruto. Entre estos COVs se encontraron metabolitos volátiles de impacto y otros que no han sido hasta el momento relacionados al fruto del tomate como por ejemplo alcanfor, terpinoleno y decanal. En la cosecha anterior, alcanfor y terpinoleno se asociaron al olor característico, mientras que decanal se asoció en la zona de COVs relacionada al sabor del fruto. En las Figuras 8 y 9 y Figura 35 del Anexo Digital ANAVA 2010 se grafican los niveles de estos metabolitos mencionados.



Figuras 8 y 9. Niveles de COVs de la Zona 1 de la cosecha 2010.

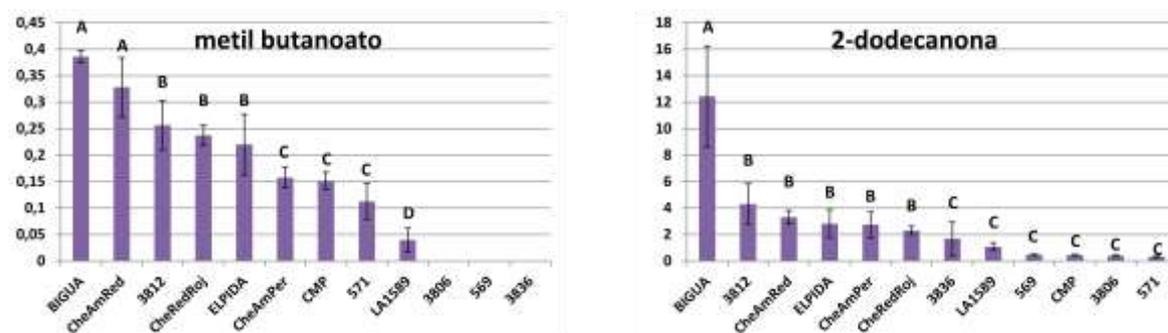
Letras diferentes demuestran niveles de significancia distintos para el análisis de varianza ($\alpha=0.05$).

En las Figuras 8 y 9 se observó que los COVs expresaron los mayores niveles con diferencias significativas en cultivares que fueron bien recibidos por los paneles sensoriales, entre ellos 3812, 3806 y CheRedRoj.

Los metabolitos de impacto salicilato de metilo y β -damascenona, coincidentemente con su condición de esenciales expresaron los niveles de mayor abundancia en los cultivares 569, 3836 y 3812 que resultaron ser los mejores calificados por los jueces sensoriales (Figuras 40 y 49 del Anexo Digital ANAVA 2010).

Además de los compuestos que más relación presentaron con el sabor característico, según el análisis de ARNeu, se ubicaron en la Zona 1 otros metabolitos de interés. Un caso remarcable lo conforman los COVs metil butanoato, 2-metil-2-octen-4-ona, α -isoforona, 2-undecanona, 2-dodecanona y benzofenona que se expresaron casi exclusivamente en los cultivares 3812, ELPIDA, BIGUA, CheRedRoj, CheAmRed y CheAmPer asociados a la Zona 1. Los metabolitos metil butanoato y 2-dodecanona presentaron los valores más abundantes en variedades del Grupo-1 que fueron poco apreciados por los paneles sensoriales. Por ejemplo BIGUA y CheAmRed para el éster metílico y solo BIGUA para 2-dodecanona. Este último fue asociado al sabor característico en la cosecha 2009. Debe considerarse que las variedades que le siguen en nivel de abundancia a BIGUA corresponden en su mayoría a cultivares de buena calidad. Al parecer una sobreproducción de este compuesto promovería sensaciones organolépticas de tipo desagradable en los frutos.

En las Figuras 10 y 11 se grafican los niveles de los COVs mencionados.



Figuras 10 y 11. Niveles de COVs de la Zona 1 de la cosecha 2010.

Letras diferentes demuestran niveles de significancia distintos para el análisis de varianza ($\alpha=0.05$).

Por otro lado deben destacarse algunos de los metabolitos de impacto incluidos en esta zona que no fueron asociados al sabor característico. Los derivados de aminoácidos no aromáticos como la leucina e isoleucina generan por un vía de deaminación y decarboxilación los COVs 3-metilbutanal, 3-metil-1-butanol, 1-nitropentano y 2-isobutiltiazol [13, 14]. Las características sensoriales de estos metabolitos son reconocidas como frutales, oleosas, pungentes y mustias. Sorprendentemente, el compuesto azufrado es catalogado con notas herbáceas, terrosas y *tomato-like* [12, 17].

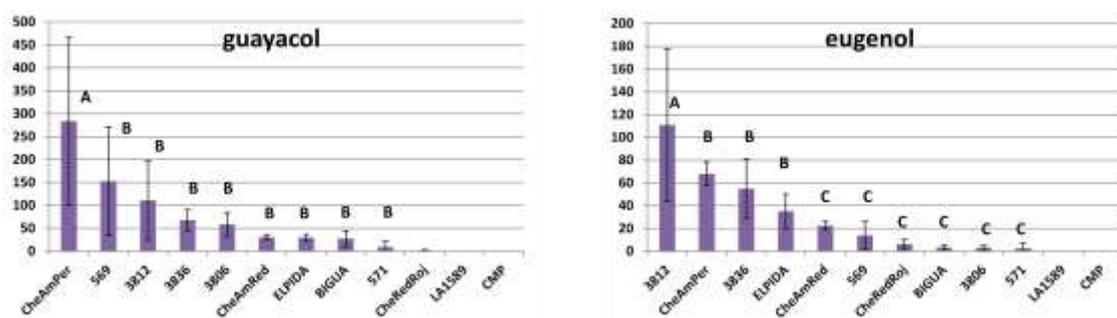
Los niveles observados de estos importantes metabolitos fue muy similar en la mayoría de los cultivares de buena y mala calidad organoléptica de toda la cosecha. Sin embargo la variedad ELPIDA con una buena aceptación en el olor y sabor demostró niveles levemente superiores de 3-metilbutanal, nitropentano y 2-isobutiltiazol. Los gráficos de los niveles de estos COVs se encuentran en las Figuras 2, 6, 15 y 26 del Anexo Digital ANAVA 2010.

Un compuesto que ha ganado mucha importancia en este último tiempo es el guayacol. Inicialmente este compuesto con notas de tipo ahumado, madera, medicinal [17], fue considerado dentro de los compuestos que aportaban características indeseadas en los alimentos (*off flavor*) [19]. Sin embargo en los últimos años algunos reportes han considerado este compuesto como uno de los posibles contribuyentes activos en el desarrollo del aroma del tomate [7].

El análisis de ARNeu determinó que este compuesto se correlacionó estrechamente con el olor característico del fruto. En un análisis más detallado se observó este metabolito en mayor abundancia en los cultivares CheAmPer, 569, 3812, 3836 y 3806 mayoritariamente. Esto resulta llamativo debido a que los cultivares de mayor aceptación contienen niveles elevados de estos COVs de igual manera que el cultivar cherry amarillo que fue pobremente aceptado por los jueces sensoriales.

Otro compuesto relacionado como el eugenol, con un sustituyente 1-propeno de diferencia sobre la estructura del guayacol y matices sensoriales similares, presentó un perfil de expresión semejante. Los mismos cultivares de buena calidad expresaron niveles aumentados de igual forma que la variedad cherry amarilla.

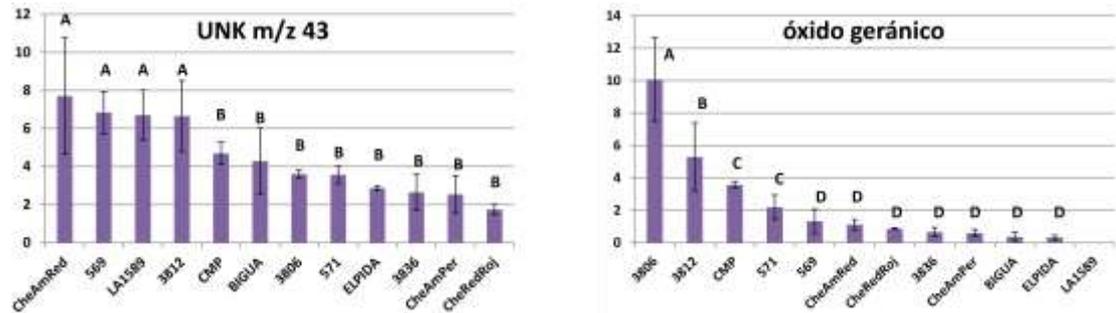
A pesar de la posible contribución positiva de guayacol y eugenol, el aporte de otros compuestos químicos probablemente superan el buen carácter que le otorgan estos derivados de aminoácidos generando sensaciones poco aceptadas en el cultivar de frutos amarillos. En las Figuras 12 y 13 se grafican los niveles de los COVs mencionados.



Figuras 12 y 13. Niveles de COVs de la Zona 1 de la cosecha 2010.

Letras diferentes demuestran niveles de significancia distintos para el análisis de varianza ($\alpha=0.05$).

En la Zona 2 no se distribuyeron en gran medida COVs muy renombrados en estudios de metabolitos volátiles de tomate, sólo algunos derivados de COVs de impacto como heptanal y β -metil ionona como los más importantes. Teniendo en cuenta los resultados de los análisis de ARNeu, solo las variables UNK m/z 43 (en forma invertida) y óxido geránico, en forma reiterada con el 2009, pudieron ser relacionadas con el olor y sabor característico. En las Figuras 14 y 15 se grafican los niveles de estos COVs.

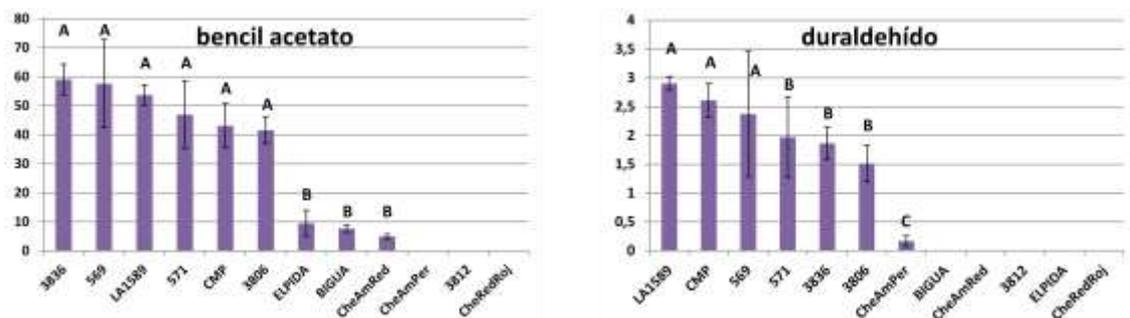


Figuras 14 y 15. Niveles de COVs de la Zona 2 de la cosecha 2010. Letras diferentes demuestran niveles de significancia distintos para el análisis de varianza ($\alpha=0.05$).

El terpenoide óxido geránico, presentó niveles significativamente diferentes para 3806 y 3812, dos cultivares que fueron bien receptados en las mesas de degustación. Pueden observarse también que la abundancia de este metabolito declina levemente en los cultivares que tuvieron menor calidad sensorial. Este COVs además de asociarse a las variables sensoriales de interés en más de una cosecha, no ha sido descrito hasta el momento como un posible contribuyente al olor característico del tomate.

La variable sin identificar UNK m/z 43 se correlacionó de forma inversa con el olor, sin embargo los niveles de este metabolito no presentan una asociación muy clara con la clasificación sensorial de los cultivares. Puede observarse en forma poco específica un aumento de la expresión en los cultivares poco aceptados CheAmRed, LA1589, CMP, BIGUA y una leve tendencia de decrecer en los cultivares mejor calificados.

El resto de los COVs no presentó correlación con los resultados del ARNeu, sin embargo pueden mencionarse algunas relaciones interesantes. Por ejemplo una serie de metabolitos derivados de aminoácidos aromáticos expresó sus niveles casi exclusivamente en los cultivares que tuvieron mayor relación con la Zona 2. Estos COVs fueron 1-fenil-1-propanol, 2-feniletíl acetato, duraldehído, bencil acetato, salicilato de propilo y salicilato de isoamilo. En las Figuras 16 y 17 y las Figuras 43, 56, 57 y 58 del Anexo Digital ANAVA 2010 se grafican los niveles de los COVs mencionados.



Figuras 16 y 17. Niveles de COVs de la Zona 2 de la cosecha 2010. Letras diferentes demuestran niveles de significancia distintos para el análisis de varianza ($\alpha=0.05$).

Estos metabolitos fueron los que demarcaron mayor discriminación metabólica sobre las variedades del Grupo-2. Por ejemplo, los metabolitos bencil acetato y duraldehído, se ubicaron en el extremo derecho de la Zona 2 sobre el mapa del ACP (Figura 3). En las gráficas anteriores puede observarse como los niveles más abundantes se expresaron significativamente en los cultivares 3836, 569, 571, CMP, 3806 y

ocasionalmente en LA1589. Todas estas variedades pertenecen al Grupo-2, excepto el cultivar silvestre, LA1589.

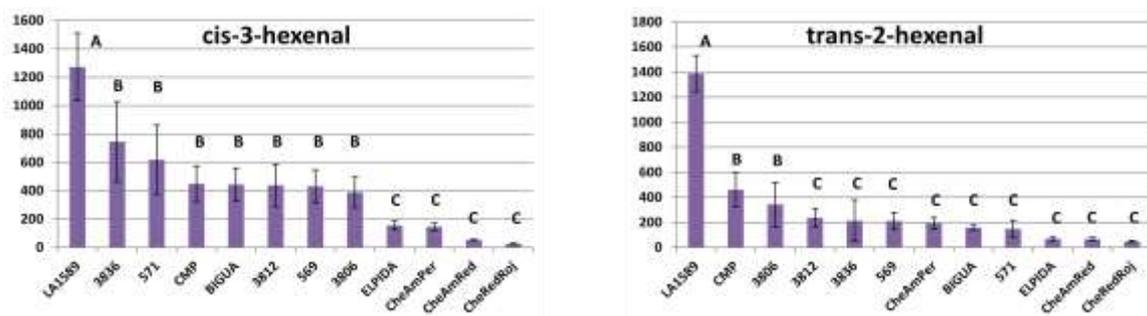
Otro detalle interesante sobre estos COVs fue que algunos de ellos fueron asociados en la cosecha 2009 a alguna característica sensorial de interés, como por ejemplo 1-fenil-1-propanol al olor y los salicilatos de propilo e isoamilo al sabor del fruto. En la presente cosecha a pesar de no formar parte de la correlación más estrecha con el olor y sabor se asociaron mayoritariamente a cultivares apreciados como 3836, 569 y 3806.

Por último en la Zona 3 se ubicaron, en mayor proporción, los metabolitos volátiles que se asociaron al olor característico mediante ARNeu. Esta sección del ACP presentó una gran influencia de la especie silvestre LA1589, *S. pimpinellifolium*.

Los COVs de la Zona 3 correlacionados al Olor fueron 1-penten-3-ona, hexanal, *cis*-3-hexenal, *cis*-2-hexenal, *trans*-2-hexenal y los compuestos volátiles sin identificar UNK m/z 55 (inv) y UNK m/z 93-2. Las variables metabólicas enumeradas anteriormente corresponden a derivados volátiles de ácidos grasos, y exceptuando *cis*-2-hexenal, todos son identificados como metabolitos volátiles de impacto.

Es sumamente llamativa la relación inversa que presentaron todos estos compuestos con el olor característico. Este hecho se debe precisamente a que en los cultivares silvestres es característico encontrar un perfil de metabolitos muy diferentes a la especie domesticada^[33]. En algunos casos como en *S. pennellii* y *S. pimpinellifolium* el flujo metabólico deriva en una sobreproducción de COVs con un gran impacto sobre las características sensoriales. En *S. pimpinellifolium* se expresaron con gran abundancia los derivados de aminoácidos y ácidos grasos particularmente.

Los metabolitos volátiles derivados de la vía metabólica de ácidos grasos que expresaron los niveles más elevados en el cultivar silvestre fueron 1-penten-3-ona, 2-etilfurano, 1,4-pentadieno, 4-pentenal, *trans*-2-heptenal, 2-nonen-1-ol, 2-decenal, *cis*-3-hexenal, *trans*-2-hexenal, hexanal y *cis*-2-hexenal. En las Figuras 18 y 19 y las Figuras 3, 4, 8, 9, 11, 12, 19, 33 y 44 del Anexo Digital ANAVA se grafican los niveles de los metabolitos mencionados.

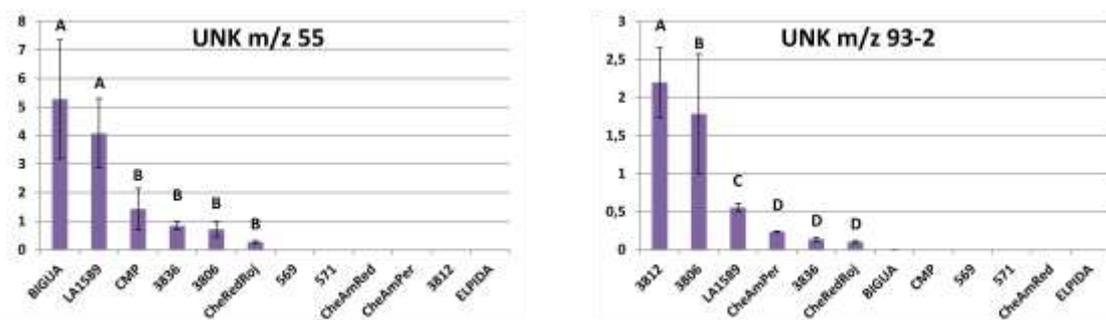


Figuras 18 y 19. Niveles de COVs de la Zona 3 de la cosecha 2010.

Letras diferentes demuestran niveles de significancia distintos para el análisis de varianza ($\alpha=0.05$).

Los metabolitos sin identificar UNK m/z 55 y UNK m/z 93-2 presentaron una relación inversa y directa respectivamente con el olor característico. En las Figuras 20 y 21 se grafican los niveles de estos COVs. En las gráficas mencionadas puede apreciarse

que la variable asociada de tipo invertida, UNK m/z 55, se correlacionó con mayores niveles con los cultivares de menor calidad, BIGUA y LA1589, mientras que UNK m/z 93-2, en forma directa, se expresó en los cultivares con buenas valoraciones sensoriales. Esto señala también que COVs sin identificar presentan correlaciones con cultivares de diferentes valoración sensorial de igual forma que otros metabolitos identificados. Estos UNK, una vez caracterizados, podrán ser tentativos candidatos que puedan considerarse en futuros procesos de mejoramiento de la especie.



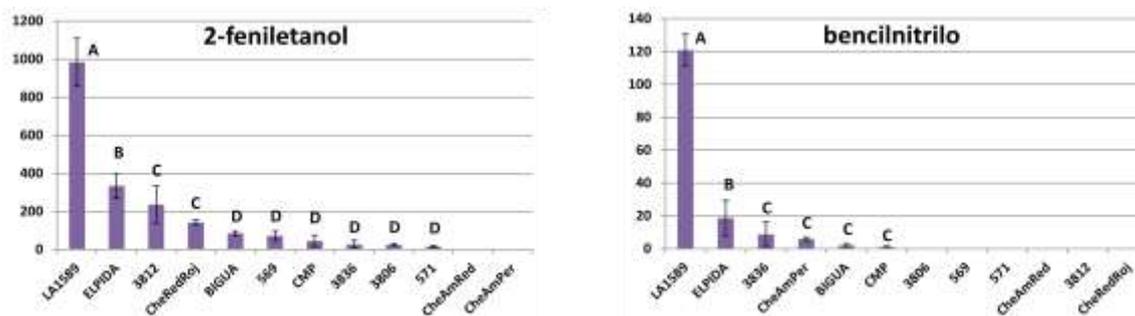
Figuras 20 y 21. Niveles de COVs de la Zona 3 de la cosecha 2010.

Letras diferentes demuestran niveles de significancia distintos para el análisis de varianza ($\alpha=0.05$).

Otros COVs importantes de la Zona 3 fueron los metabolitos de impacto derivados de la fenilalanina como fenilacetaldehído, 2-feniletanol y bencilnitrilo que presentaron niveles elevados en *S. pimpinellifolium* con diferencias significativas muy acentuadas sobre el resto de los cultivares.

Estos compuestos aromaticos poseen características olfatorias asociadas a notas florales, dulces, miel y herbáceas^[17]. Sin embargo en grandes concentraciones toman características de tipo desagradable con un fuerte carácter químico y aromático^[32]. A pesar de no presentar correlación con las caracteristas sensoriales en el ARNeu del 2010, si lo hicieron en el analisis previo de la cosecha 2009. En caso de haberse repetido la asociacion en ambos años, sería probable que hubieran correlacionado en forma inversa, de igual manera que los ácidos grasos debido a los niveles exacerbados presentes en el cultivar silvestre.

En las Figuras 22 y 23 y en la Figura 28 del Anexo Digital ANAVA 2010 se grafican los niveles de los derivados de aminoácidos mencionados de la Zona 3.



Figuras 22 y 23. Niveles de COVs de la Zona 3 de la cosecha 2010.

Letras diferentes demuestran niveles de significancia distintos para el análisis de varianza ($\alpha=0.05$).

Los compuestos volátiles de carotenoides también se hicieron presentes en este grupo de variables asociado a LA1589. Los metabolitos 6-metil-5-hepten-2-ona, 6-metil-5-hepten-2-ol, α -citral, geranil acetona y pseudoionona presentaron niveles significativamente superiores en LA1589 y en cultivares de buena calidad. Sin embargo los buenos matices sensoriales de estos COVs [17], no fueron suficientes para enmascarar el efecto de otros metabolitos con aporte perjudicial para el aroma, como los derivados de la fenilalanina en alta abundancia. En las Figuras 22, 23, 45, 52 y 59 del Anexo Digital ANAVA 2010 se ejemplifican los niveles de los derivados de carotenoides mencionados.

En la Zona 3 fue posible determinar que los COVs asociados al olor característico tuvieron en su mayoría una relación de modo invertida con esta importante variable sensorial. A través de la incorporación de un cultivar que sobre expresa una porción de COVs definida, LA1589, fue posible determinar la importancia de la concentración de determinados COVs y su impacto en la apreciación sensorial.

Conclusiones de la Cosecha 2010

El estudio de la cosecha 2010 permitió determinar grupos de variedades de tomate con características metabólicas diferentes. A su vez fue posible exponer las amplias diferencias metabólicas del cultivar silvestre LA1589, *S. pimpinellifolium*.

Las diferencias metabólicas expuestas se vieron reflejadas también en las características sensoriales de los frutos. El caso más relevante se observó en la variedad silvestre presentando niveles de COVs derivados de ácidos grasos y aminoácidos aromáticos muy abundantes que le confirieron un olor y sabor de baja calidad.

El análisis de los datos mediante ARNeu permitió determinar los metabolitos más estrechamente relacionados al olor y sabor en los frutos de la cosecha.

La Zona 1 influenciada por los cultivares de buena calidad 3812, ELPIDA, CheRedRoj contuvo mayoritariamente metabolitos derivados de ácidos grasos y aminoácidos que se correlacionaron específicamente con el sabor característico.

La Zona 3 dominada bajo el efecto del cultivar silvestre, presentó los metabolitos volátiles asociados al olor característico. En este caso los COVs derivados de ácidos grasos mayoritariamente se relacionaron en forma invertida con esta importante variable sensorial.

La inclusión de un genotipo exótico, como LA1589, que sobre expresó determinados metabolitos con marcada influencia sobre el olor demostró la importancia de los niveles de COVs y su relación con la apreciación sensorial en el fruto del tomate. En el análisis de la cosecha 2009 fue posible observar que muchos de estos metabolitos se asociaron al olor y sabor característico pero de forma directa.

Análisis de los Compuestos Orgánicos Volátiles de la Cosecha 2012

En el mes de marzo de 2012 tuvo lugar la campaña de cosecha de frutos de tomates en el mismo sitio que los años anteriores. Las variedades colectadas fueron 15, incluyendo la especie silvestre *S. pimpinellifolium*, de las cuales se tomaron cuatro réplicas biológicas para determinar el perfil de COVs. Las señales detectadas en cada repetición fueron normalizadas de igual manera que en las cosechas previas de acuerdo a la descripción en el Capítulo II: Materiales y Métodos. En esta cosecha durante las determinaciones de compuestos volátiles se observó una notable disminución de la expresión de metabolitos en las variedades ensayadas. Debido a esto, sólo se consideraron en los siguientes estudios las variables metabólicas que presentaron señales con áreas integrables en al menos un cultivar de las 15 variedades de la cosecha.

El esquema de análisis presentado en las cosechas anteriores también fue respetado en esta sección. Por lo tanto para iniciar este estudio se efectuó primeramente un AC para determinar la similitud entre las réplicas de cada cultivar y la agrupación entre los genotipos analizados. En la Figura 1 se grafica el resultado obtenido por este análisis multivariado.

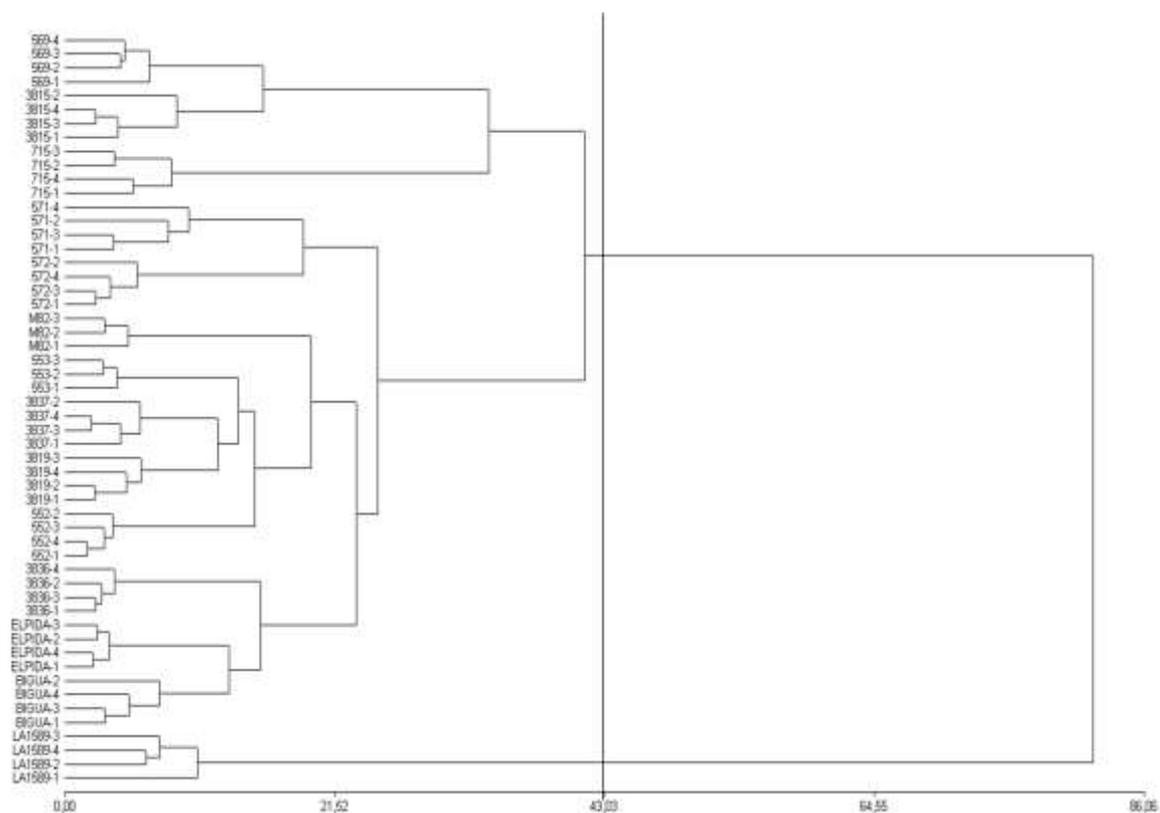


Figura 1. Análisis de Conglomerados de las variables metabólicas de la cosecha 2012.
Cultivares de la cosecha 2012.

(Algoritmo de Clasificación: Encadenamiento Promedio, Distancia: Gower).

El dendrograma permite observar que las repeticiones analizadas de todos los cultivares presentaron una excelente congruencia dentro del genotipo. Las réplicas de las variedades se asociaron primeramente entre sus pares formando un pequeño

conglomerado que luego se condensó con otro de iguales características. Este mismo comportamiento fue posible observarlo en todos los cultivares de la cosecha 2012.

En forma más general la gráfica permitió distinguir agrupaciones formadas entre los cultivares de acuerdo a su similitud metabólica medida por los COVs. A una distancia de referencia del 50 % de la máxima longitud de la gráfica se conformaron dos conglomerados de genotipos. Los grupos quedaron conformados por 569, 3815 y 715 en el primer caso y un numeroso conglomerado que incluyó a 571, 572, M82, 553, 3837, 3819, 552, 3836, ELPIDA y BIGUA. Por último pudo observarse como el cultivar silvestre, LA1589, se mantuvo alejado de los dos grupos conectándose a una lejana distancia debido a sus enormes diferencias metabólicas.

Seguidamente se realizó un ACP para determinar el agrupamiento y relación entre cultivares y metabolitos volátiles. En la Figura 2, se grafica el plano bidimensional del resultado del análisis de ACP.

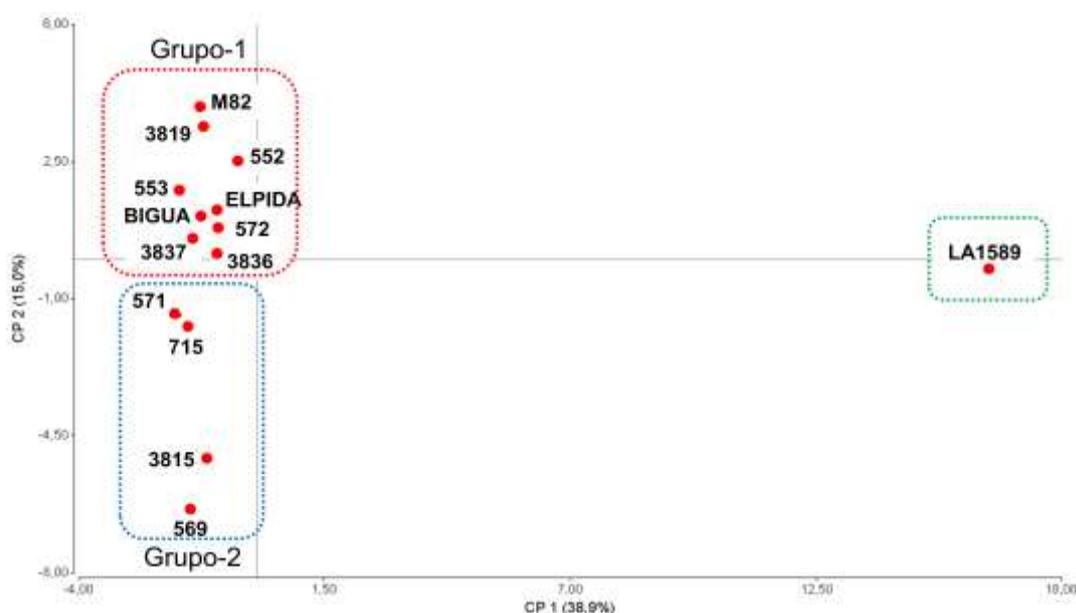


Figura 2. Análisis de Componentes Principales de los COVs de la cosecha 2012.
Cultivares de la cosecha 2012.

El análisis de ACP arrojó en el mapa una proyección representada del 53,9 % de la variabilidad total de los datos, aportando el eje CP1 un 38,9 % y el eje CP2 un 15 %.

A partir de esta figura pudo observarse que los cultivares se distribuyeron en forma muy concentrada sobre los valores negativos el eje CP1 conteniendo todas las variedades de la especie *S. lycopersicum*. En el extremo opuesto se situó el cultivar silvestre en forma muy alejada del resto de los demás variedades.

Debe notarse en este caso que la separación más importante de las variedades de tomates comestibles, *S. lycopersicum*, estuvo comprendida sobre el eje CP2. En los valores positivos del eje se agruparon los cultivares 3819, 3836, 3837, BIGUA, ELPIDA de tipo redondo y las variedades M82, 552, 553, 572 de tipo perita formando el Grupo-1. Por otro lado los cultivares 571, 715, 569 de tipo perita y la variedad 3815 de tipo cherry conformaron el Grupo-2 ubicándose en los valores negativos del eje CP2. Puede remarcarse también que dentro del Grupo-2 puede subdividirse en dos agrupaciones

más pequeñas de acuerdo a la ubicación de las variedades en el eje CP2. Por último la especie silvestre como fue mencionado se ubicó solitariamente en el otro extremo de la gráfica.

La información obtenida en los análisis multivariados acerca de la agrupación de los cultivares coincidió en gran medida como puede apreciarse en las graficas. La única diferencia observada fue en la agrupación del genotipo 571 que se encontró asociado a diferentes cultivares en los dos análisis realizados (AC y ACP).

La distribución de los COVs en el biplot está representada en la Figura 3. En base a la disposición de las variables metabólicas pudo clasificarse 3 zonas de metabolitos distribuidas en el plano gráfico.

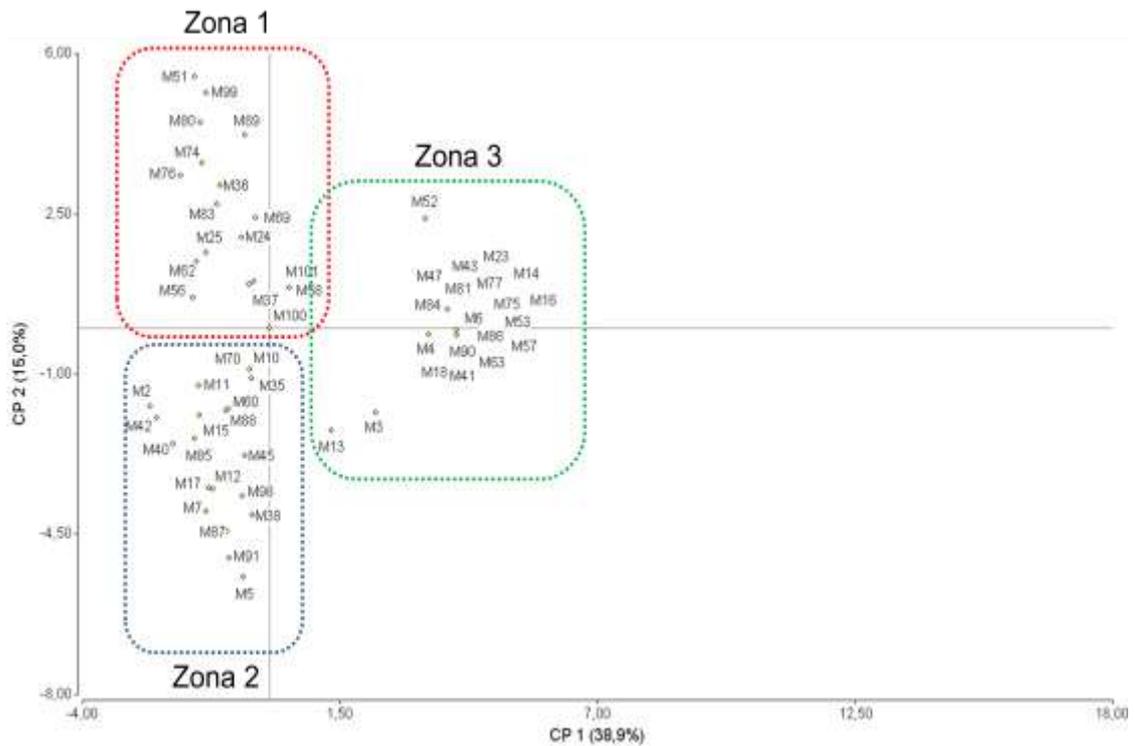


Figura 3. Análisis de Componentes Principales de los COVs de la cosecha 2012.

El esquema mencionado de la disposición de metabolitos volátiles en el ACP fue muy similar al obtenido por la distribución de los cultivares. Puede observarse la Zona 1, asociada a los cultivares del Grupo-1 (Figura 2), ubicada en la región izquierda superior del gráfico. La Zona 2, presentando correlación con los cultivares del Grupo-2, ubicada debajo de la zona antes mencionada. Y por último con mayor divergencia, la Zona 3 ubicada en el margen opuesto del eje CP1 guardando relación con el cultivar silvestre LA1589. En las siguientes tablas se nombran los COVs pertenecientes a las zonas definidas en este gráfico de ACP.

En las tablas siguientes se detallan los COVs incluidos dentro de cada una de las zonas demarcadas especificando el origen metabólico de cada uno de los compuestos. La clasificación metabólica corresponde a los cuatro orígenes diferentes mencionados previamente en otros análisis: ácidos grasos (AG), aminoácidos (AA), terpenoides (TER), carotenoides (CAR) y las señales sin identificar (UNK).

Tabla 1. COVs integrantes de la Zona 1.

Zona 1					
Código	Nombre	Origen	Código	Nombre	Origen
M24	<i>trans</i> -2-heptenal	AG	M74	UNK m/z 57-3	UNK
M25	óxido geránico	TER	M76	UNK m/z 95	UNK
M36	2-etil-1-hexanol	AG	M80	β -damascenona	CAR
M37	2-isobutiltiazol	AA	M83	verdil acetato	TER
M51	alcanfor	TER	M89	β -ionona	CAR
M56	UNK m/z 94	UNK	M99	benzofenona	AA
M58	α -terpineol	TER	M100	8-pentadecanona	AG
M62	<i>p</i> -ment-1-en-9-al	TER	M101	α -hexilcinamaldehído	AA
M69	α -citral	CAR			

En la Zona 1 en base a los COVs integrados, se observó el aporte de todos los orígenes metabólicos pero no se observó una clara predominancia de alguna de estas rutas metabólicas que promueven la biosíntesis de los compuestos volátiles.

Tabla 2. COVs integrantes de la Zona 2.

Zona 2					
Código	Nombre	Origen	Código	Nombre	Origen
M2	UNK m/z 43	UNK	M40	<i>cis</i> -linalil óxido	TER
M5	2-etil-furano	AG	M42	<i>trans</i> -linalil óxido	TER
M7	3-metil-1-butanol	AA	M45	guayacol	AA
M10	4-pentalenal	AG	M60	salicilato de metilo	AA
M11	tolueno	AA	M70	2-undecanona	AG
M12	<i>cis</i> -3-hexenal	AG	M85	geranil acetona	CAR
M15	<i>trans</i> -2-hexenal	AG	M87	lilial	AA
M17	1-nitropentano	AA	M88	UNK m/z 131	UNK
M35	limoneno	TER	M91	2-dodecanona	AG
M38	2-octenal	AG			

En la Zona 2 se observó un aporte mayoritario del 37 % de derivados de ácidos grasos y 32 % de aminoácidos, seguido con un 16 % de contribución de derivados terpenoides.

Tabla 3. COVs integrantes de la Zona 3.

Zona 3					
Código	Nombre	Origen	Código	Nombre	Origen
M3	3-metilbutanal	AA	M52	3-metilheptilacetato	AG
M4	1-penten-3-ona	AG	M53	UNK m/z 120	UNK
M6	metil butanoato	AG	M57	DMHEX	TER
M13	hexanal	AG	M63	dimetilbenzaldehído	AA
M14	<i>cis</i> -2-hexenal	AG	M75	(3E)-4-metil-3-hepten-2-ona	AG
M16	heptanal	AG	M77	eugenol	AA
M18	α -pineno	TER	M81	2-metil-2-octen-4-ona	AG
M23	UNK m/z 93-2	UNK	M84	UNK m/z 147	UNK
M41	terpinoleno	TER	M86	2,5-ditertbutilbenzoquinona	AA
M43	UNK m/z 58	UNK	M90	β -ionona epóxido	CAR
M47	2-nonen-1-ol	AG			

En la Zona 3, dominada por la influencia del cultivar silvestre, pudo observarse un aporte más significativo de los derivados de ácidos grasos aportando un 43 % del total de COVs. Esta composición concuerda con el perfil de metabolitos observada en la

cosecha 2010 expresando en mayor abundancia metabolitos volátiles provenientes de ácidos grasos.

Teniendo en cuenta la distribución de variables y genotipos obtenida en las gráficas de ACP (Figuras 2 y 3) pudo observarse una concentración de datos muy significativa en la región de valores negativos del eje CP1. Esta aglomeración dificulta la asignación de correlaciones entre la expresión de COVs y genotipos en los análisis de ACP. Principalmente este efecto se debe a la presencia del cultivar silvestre, LA1589, que fuerza la aglomeración de variables y genotipos en un área pequeña debido a sus grandes diferencias metabólicas.

En base a esta información y contemplando que el mayor interés se enfoca en encontrar asociaciones entre COVs y variedades comestibles de tomate, se consideró realizar un análisis más exhaustivo de los cultivares pertenecientes a la especie domesticada, *S. lycopersicum*. A continuación se muestran los análisis correspondientes a esta significativa porción de la cosecha 2012.

Primeramente se realizó un AC sin considerar la variedad LA1589. Se utilizó los promedios de las réplicas de cada cultivar para simplificar el análisis conociendo que la dispersión dentro del genotipo es significativamente inferior a la variabilidad metabólica entre cultivares (Figura 1). En la Figura 4 se muestra el resultado del análisis de AC para variedades de la especie *S. lycopersicum* sin considerar la especie silvestre, LA1589.

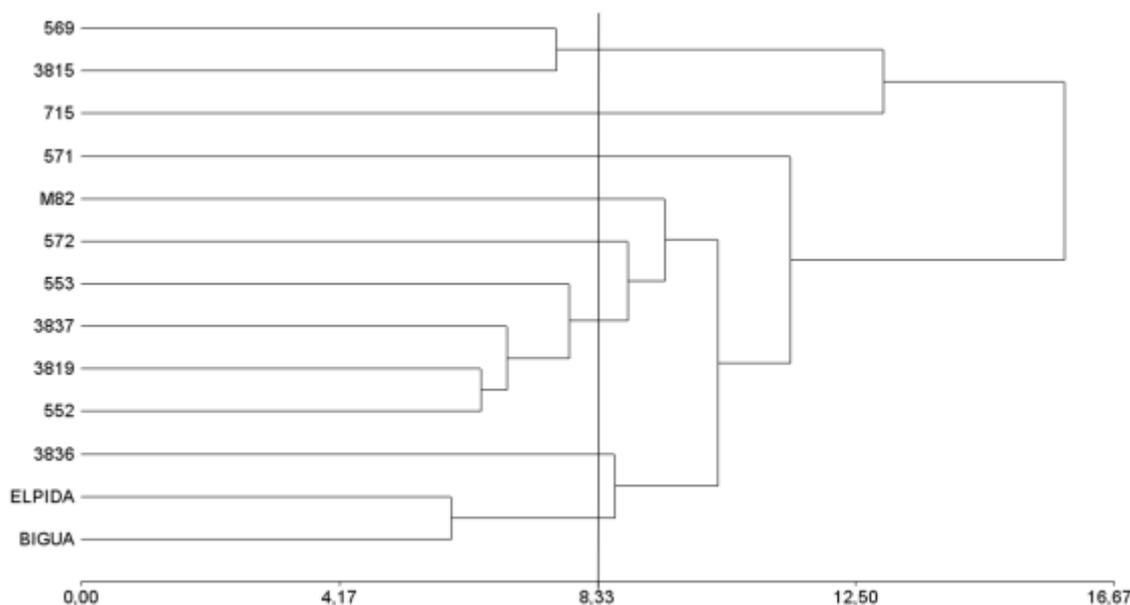


Figura 4. Análisis de Conglomerados de las variables metabólicas de la cosecha 2012 sin LA1589.
Cultivares de la cosecha 2012.

(Algoritmo de Clasificación: Encadenamiento Promedio, Distancia: Gower).

La asociación de los cultivares en el dendrograma presentó una distribución con pequeños cambios respecto del AC anterior (Figura 1). En este caso puede observarse conglomerados más pequeños formados antes del 50 % de la distancia máxima y algunos cultivares, antes agrupados, se separaron demostrando mayor diferenciación. Sin embargo la agrupación final en mayores grupos de cultivares presentó mucha correlación con el resultado obtenido previamente.

Los nuevos conglomerados quedaron formados por las variedades 569, 3815; ELPIDA y BIGUA; 552, 3819, 3837 y 553. Las variedades que se diferenciaron en esta nueva distribución fueron 571, M82, 572, 3836 y 715.

Seguidamente un análisis de ACP fue realizado considerando únicamente las variedades de *S. lycopersicum* para determinar las relaciones entre cultivares y COVs. En la Figura 5 se ejemplifica el resultado del ACP en esta nueva condición.

El análisis aportó una representación de la variabilidad total del 39,4% distribuida en mayor medida en el eje CP1 (23%) y en el eje CP2 (16,4%). En el plano bidimensional del ACP se observó una disposición más amplia de los cultivares respecto del análisis incluyendo LA1589 (*S. pimpinellifolium*). En este caso puede apreciarse como las variedades con mayores diferencias como 715, 569, 3815, 572, 571 y M82 (según el AC sin LA1589) tendieron a ubicarse en las zonas más alejadas de la gráfica. Por otro lado los cultivares restantes se concentraron en la zona central de los ejes. La nueva distribución determinó la formación de nuevos grupos de variedades de *S. lycopersicum* denominados (*S. lyc*).

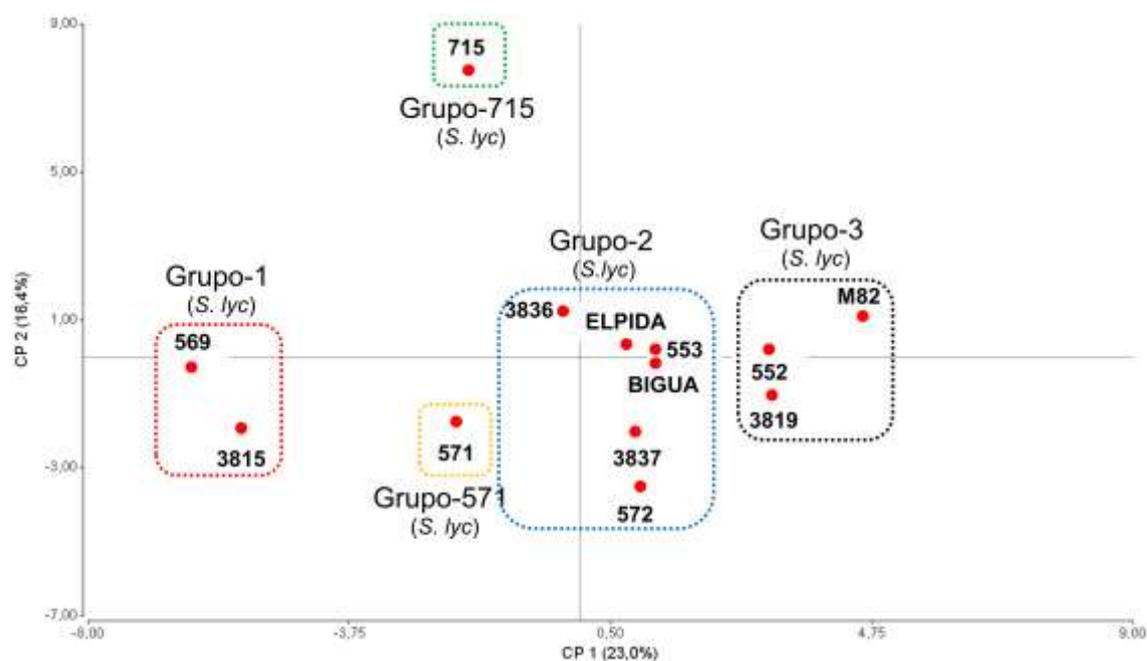


Figura 5. Análisis de Componentes Principales de los COVs de la cosecha 2012 sin LA1589. Cultivares de la cosecha 2012.

Los grupos de variedades en este análisis fueron 569 y 3815 en el extremo izquierdo del eje CP1 conformando el Grupo-1 (*S. lyc*), los cultivares 3836, ELPIDA, 553, BIGUA, 3837 y 572 aglomerados en el Grupo-2 (*S. lyc*) sobre la zona central y 552, 3819 y M82 en el extremo derecho del eje CP1 formando el Grupo-3 (*S. lyc*). Además las variedades 715 y 571 se ubicaron en forma separada de los demás grupos de genotipos.

Una vez obtenido un escenario de distribución de cultivares, es necesario considerar la información sensorial que fue expuesta en el Capítulo IV: Análisis Sensorial de los Frutos de Tomate.

Los cultivares más destacados en los paneles sensoriales por su buena calidad correspondieron a 715, 572 y M82 específicamente para el olor, mientras que 552, 3819 y

3837 se encontraron entre los más apreciados para el olor y sabor conjuntamente. Por otro lado los menos aceptados en las valoraciones fueron coincidentemente BIGUA y ELPIDA. Sin embargo, a nivel general de la cosecha 2012 los frutos de la especie silvestre, LA1589, fueron considerados como los peores exponentes sensoriales.

Considerando la información sensorial mencionada, pudo determinarse sobre la gráfica del análisis de ACP (Figura 5) que las variedades aglomeradas en el Grupo 3 (*S. lyc*), M82, 552 y 3819 presentaron buenas consideraciones organolépticas. El sector izquierdo del Grupo 1 (*S. lyc*), integrado por 3815 y 569, presentó una media/baja aceptación, mayormente para el olor del fruto. Debe destacarse también el cultivar 571, separado de los demás cultivares, con una baja calidad en base a su olor, en las inmediaciones del centro de la gráfica de ACP.

Por otro lado el cultivar 715 que se mantuvo alejado de la distribución central también fue bien recibido sensorialmente, principalmente por su olor característico.

Los demás cultivares que se encuentran distribuidos sobre el plano, presentaron menor aceptación sensorial y se ubicaron principalmente en el centro de la gráfica, dominado por las variedades de menor calidad BIGUA y ELPIDA. Estos coinciden en mayor medida con los cultivares del Grupo-2 (*S. lyc*). Sin embargo, puede observarse una excepción con la variedad 572, ubicada en el extremo de este grupo, que presentó a diferencia del resto una buena consideración sensorial en base al olor de sus frutos.

Una vez definida la relación sensorial de cada cultivar debe considerarse la información metabólica de los COVs asociados a cada genotipo y grupos de variedades estudiados. Sobre el mismo mapa de análisis pueden ubicarse las variables metabólicas del ensayo. En la Figura 6 se representa la distribución de COVs de la cosecha 2012.

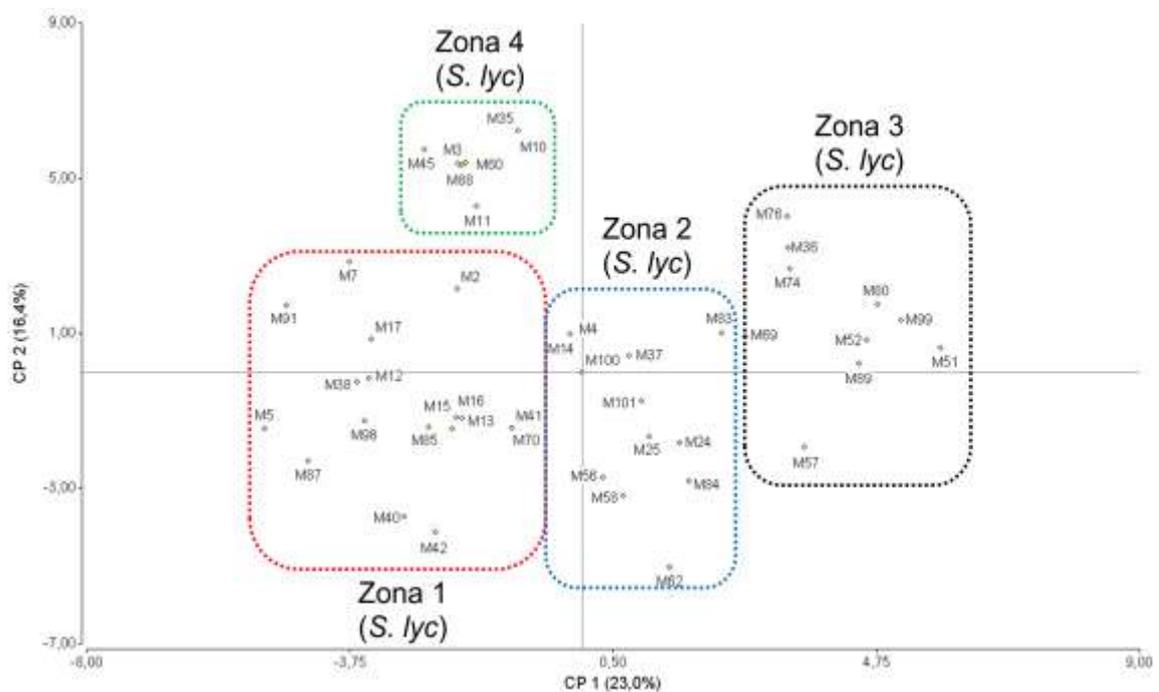


Figura 6. Análisis de Componentes Principales de los COVs de la cosecha 2012 sin LA1589.

Observando la gráfica de la Figura 6 se identificaron 4 zonas donde se concentraron en forma general los COVs analizados.

La Zona 1 (*S. lyc*) en la región izquierda del gráfico se asoció con los cultivares del Grupo-1 (*S. lyc*), 3815, 569 y también 571 ubicados en la misma sección. La Zona 2 (*S. lyc*) en el centro de la gráfica presentó mayor relación con las variedades del Grupo-2 (*S. lyc*): 3836, ELPIDA, 553, BIGUA, 3837 y 572. Debe notarse que en esta región del mapa coinciden en forma cercana genotipos de buena y mala calidad sensorial. La Zona 3 (*S. lyc*) ubicada en el extremo derecho del eje CP1 se asoció a los cultivares M82, 552 y 3819, de buenos caracteres sensoriales, pertenecientes al Grupo-3 (*S. lyc*). Por último la Zona 4 (*S. lyc*), separada del resto de los grupos, se relacionó particularmente con la variedad 715, uno de los cultivares más apreciados sensorialmente por su olor.

Un análisis más esquemático de la distribución de COVs fue realizado teniendo en cuenta el origen metabólico de cada una de las variables. En la Figura 7 se encuentran graficados los compuestos volátiles de acuerdo a la vía metabólica de la cual derivan.

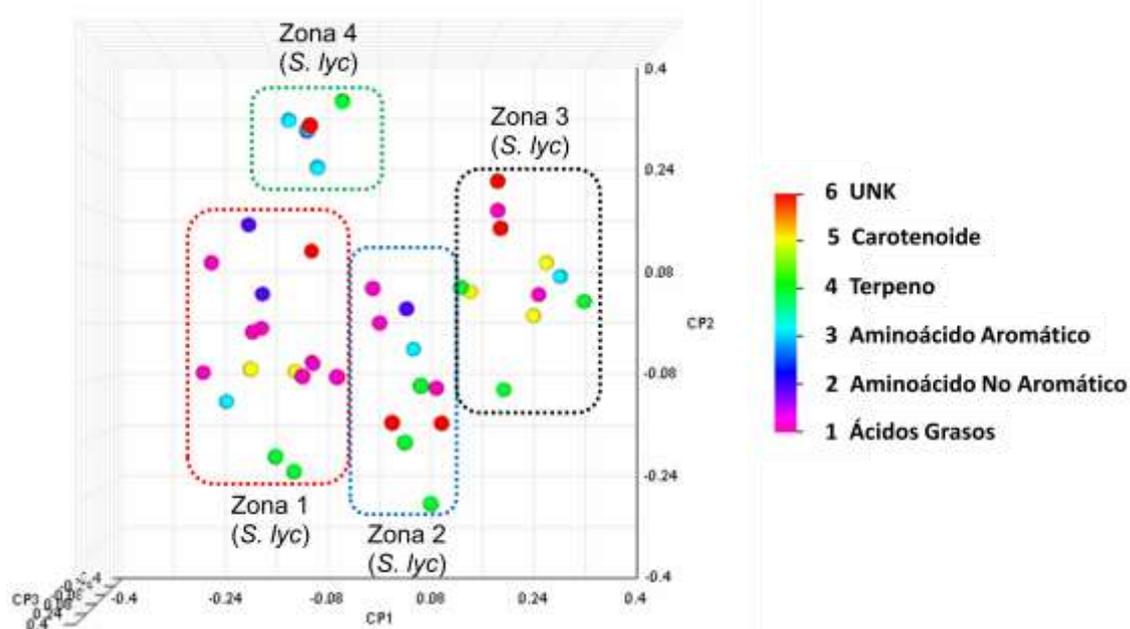


Figura 7. Distribución de COVs de acuerdo a su origen metabólico en la cosecha 2012 sin LA1589.

En forma general puede apreciarse la contribución de las distintas vías metabólicas a cada una de las zonas comentadas anteriormente. La contribución de derivados de ácidos grasos (violeta) y aminoácidos no aromáticos (azul) fue más visible en la sección izquierda de la gráfica, sobre la Zona 1 (*S. lyc*). Los terpenoides (verde) se distribuyeron en mayor medida en las Zonas 1 (*S. lyc*), Zona 2 (*S. lyc*) y Zona 3 (*S. lyc*) ubicándose en el extremo inferior de cada una de las zonas mencionadas. Por último la Zona 4 (*S. lyc*) se vio más favorecida con el aporte de derivados de aminoácidos aromáticos (celeste).

En las tablas siguientes se detallan los COVs incluidos dentro de cada una de las nuevas zonas delimitadas del ACP sin considerar el cultivar silvestre. La clasificación metabólica corresponde a los cuatro orígenes utilizados en todos los análisis previos.

Tabla 4. COVs integrantes de la Zona 1 (*S. lyc*).

Zona 1					
Código	Nombre	Origen	Código	Nombre	Origen
M2	UNK m/z 43	UNK	M40	<i>cis</i> -linalil óxido	TER
M5	2-etil-furano	AG	M41	terpinoleno	TER
M7	3-metil-1-butanol	AA	M42	<i>trans</i> -linalil óxido	TER
M12	<i>cis</i> -3-hexenal	AG	M70	2-undecanona	AG
M13	hexanal	AG	M85	geranil acetona	CAR
M15	<i>trans</i> -2-hexenal	AG	M87	lilial	AA
M16	heptanal	AG	M91	2-dodecanona	AG
M17	1-nitropentano	AA	M98	β -metil ionona	CAR
M38	2-octenal	AG			

En la Zona 1 (*S. lyc*) pudo observarse una mayor abundancia de metabolitos volátiles derivados de ácidos grasos contribuyendo con un 47 % y una contribución de 18% de aminoácidos y terpenos cada uno sobre el total de COVs. Entre los COVs más importantes puede nombrarse a los metabolitos volátiles de impacto 3-metil-1-butanol, *cis*-3-hexenal, hexanal, *trans*-2-hexenal, 1-nitropentano y geranil acetona. Sumados a estos, metabolitos derivados de COVs de impacto como heptanal y β -metil ionona también se agruparon en esta zona.

Tabla 5. COVs integrantes de la Zona 2 (*S. lyc*).

Zona 2					
Código	Nombre	Origen	Código	Nombre	Origen
M4	1-penten-3-ona	AG	M58	α -terpineol	TER
M14	<i>cis</i> -2-hexenal	AG	M62	<i>p</i> -ment-1-en-9-al	TER
M24	<i>trans</i> -2-heptenal	AG	M83	verdil acetato	TER
M25	óxido geránico	TER	M84	UNK m/z 147	UNK
M37	2-isobutiltiazol	AA	M100	8-pentadecanona	AG
M56	UNK m/z 94	UNK	M101	α -hexil cinamaldehído	AA

La Zona 2 (*S. lyc*) presentó un aporte similar entre terpenos y derivados de ácidos grasos con un 33 % cada uno, un 17 % proveniente de derivados de aminoácidos y el porcentaje restante correspondiente a señales sin identificar. Los COVs de impacto asociados en esta sección fueron 1-penten-3-ona, *trans*-2-heptenal y 2-isobutiltiazol.

Tabla 6. COVs integrantes de la Zona 3 (*S. lyc*).

Zona 3					
Código	Nombre	Origen	Código	Nombre	Origen
M36	2-etil-1-hexanol	AG	M74	UNK m/z 57-3	UNK
M51	alcanfor	TER	M76	UNK m/z 95	UNK
M52	3-metilheptilacetato	AG	M80	β -damascenona	CAR
M57	DMHEX	TER	M89	β -ionona	CAR
M69	α -citral	CAR	M99	benzofenona	AA

Dentro de la Zona 3 (*S. lyc*) la contribución de las vías metabólicas estuvo compuesta por un 30 % los carotenoides, 20 % los ácidos grasos y terpenos y un 10 % los aminoácidos. Los carotenoides aportaron un mayor porcentaje donde se destacan principalmente la β -damascenona y β -ionona como COVs de impacto.

Tabla 7. COVs integrantes de la Zona 4 (*S. lyc*).

Zona 4					
Código	Nombre	Origen	Código	Nombre	Origen
M3	3-metilbutanal	AA	M45	guayacol	AA
M10	4-pentenal	AG	M60	salicilato de metilo	AA
M11	tolueno	AA	M88	UNK m/z 131	UNK
M35	limoneno	TER			

Por último la Zona 4 (*S. lyc*), alejada de los otros grupos de COVs presentó a los derivados de aminoácidos como los contribuyentes más abundantes. Estos COVs aportaron un 57 % de los metabolitos incluidos en esta aislada región. Entre ellos pueden destacarse a guayacol y los metabolitos volátiles de impacto 3-metilbutanal y salicilato de metilo.

Análisis por Redes Neuronales Artificiales de la Cosecha 2012

La cosecha 2012 se analizó mediante ARNeu de igual manera que las cosechas anteriores. Sin embargo debido a menor cantidad de variables metabólicas que pudieron ser detectadas el número de neuronas de análisis se disminuyó a 5 en forma especular.

En estos análisis fue considerado el cultivar silvestre LA1589, *S. pimpinellifolium*. En virtud de que la metodología de ARNeu considera la correlación de variables y cultivares en forma particular para luego formar conglomerados de co-expresión de tipo multivariado, la inclusión del cultivar exótico no produjo dificultades en la posterior interpretación de los resultados como fue observado en las técnicas de AC y ACP.

En la Figura 8, se grafica el mapa de neuronas de salida del análisis correspondiente a la cosecha 2012 por ARNeu.

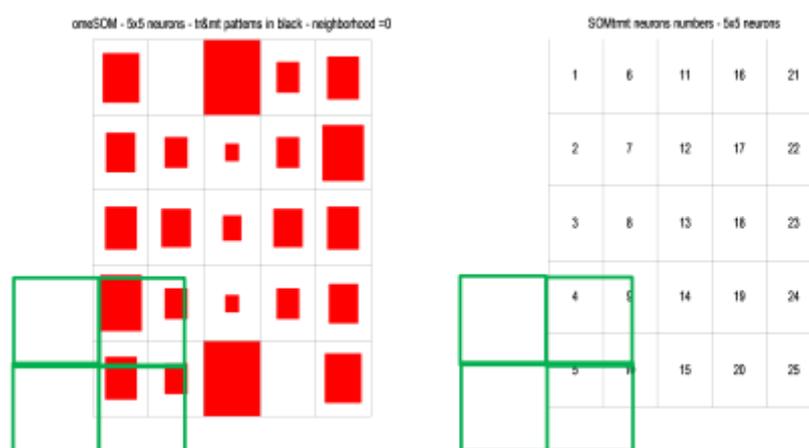


Figura 8. Mapa Neuronal de Resultados del análisis de COVs por ARNeu de la cosecha 2012.

El análisis de la cosecha 2012 presentó las variables olor y sabor característico ubicadas en un mismo conglomerado, la neurona N° 5 del mapa de resultados. En la Figura 9, se grafican las variables que se asociaron con mayor fortaleza al olor y sabor en la neurona N° 5.

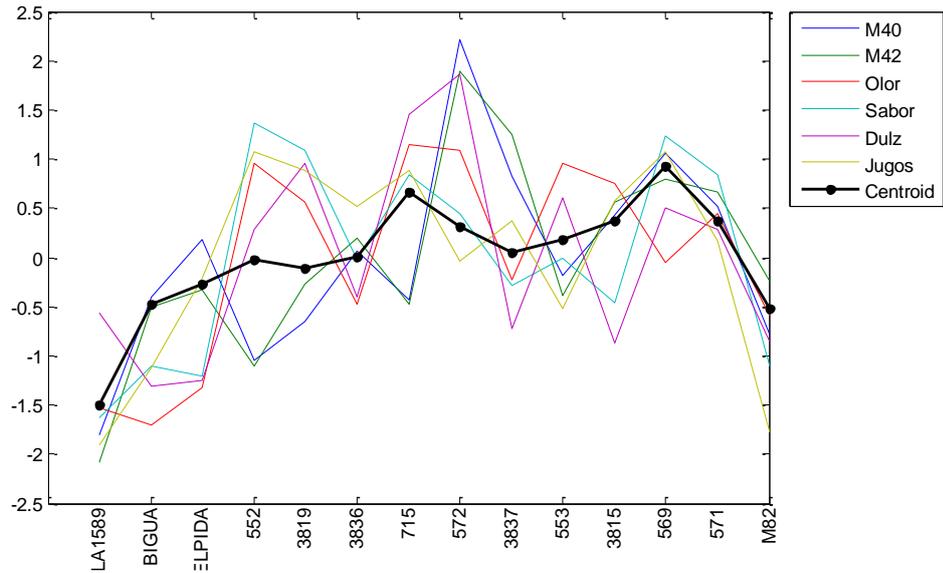


Figura 9. Detalle de la Neurona 5 del análisis por ARNeu de la cosecha 2012.

El hecho de que las variables de mayor interés olor y sabor característico, se ubicaran en la misma neurona denotó una alta correlación reafirmando la gran dependencia que existe entre estas variables. Además otras variables de gran importancia sensorial como la dulzura y la jugosidad también se asociaron de igual forma en la misma neurona N° 5.

La Zona de influencia del olor y sabor característico incluyó a las neuronas vecinas más próximas N° 10, N° 4 y N° 9 y abarcó importantes COVs además de otras variables de tipo sensorial. En las Figuras 10 y 11 se grafican los detalles de las neuronas N° 4 y N° 10 y en la Figura 26 del Anexo Digital ARNeu se encuentra el gráfico de la neurona N° 9.

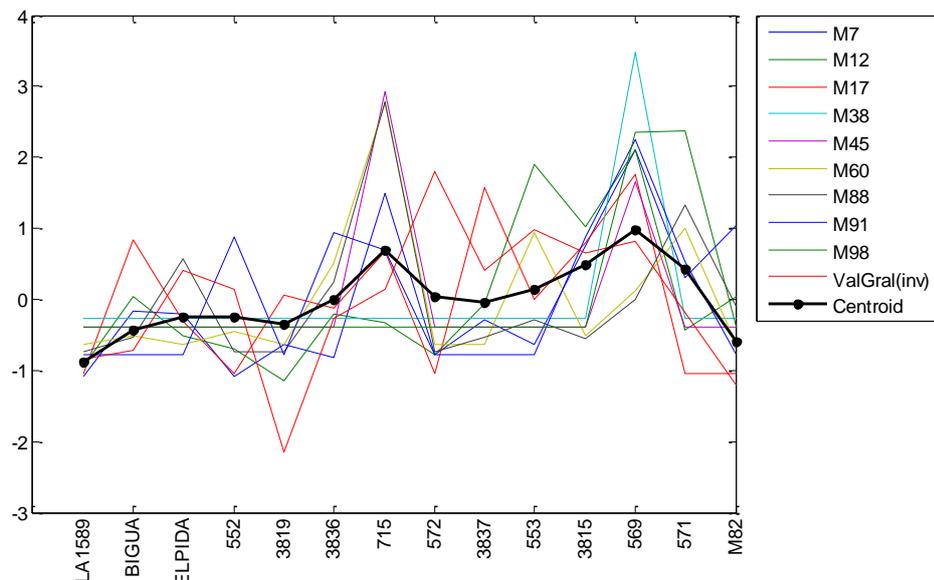


Figura 10. Detalle de la Neurona 4 del análisis por ARNeu de la cosecha 2012.

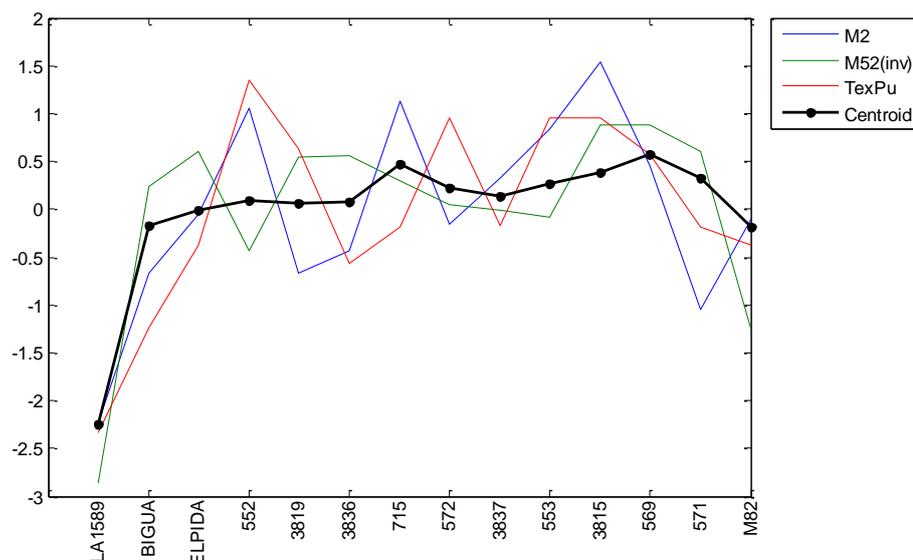


Figura 11. Detalle de la Neurona 10 del análisis por ARNeu de la cosecha 2012.

En la Tabla 8, se ejemplifican las variables de la neurona N° 5 y de las neuronas que conforman la zona de influencia del olor y sabor característico. Además, se especifica en las columnas Zona c/LA1589 y Zona s/LA1589 en que zona de los análisis de ACP (Figuras 3 y 6) se ubicaron las variables metabólicas con mayor correlación sensorial.

Tabla 8. Variables integrantes de la Neurona N° 5 y sus vecinos más próximos de la cosecha 2012.

Olor y Sabor Característico (Neurona 5)						
N	V	Código	Nombre	Zona c/LA1589	Zona s/LA1589	
5	0	M40	<i>cis</i> -linalil óxido	2	1	
5	0	M42	<i>trans</i> -linalil óxido	2	1	
5	0	Sens	Olor			
5	0	Sens	Sabor			
5	0	Sens	Dulzura			
5	0	Sens	Jugosidad			
10	1	M2	UNK m/z 43	2	1	
10	1	M52	3-metilheptilacetato (inv)	3	3	
10	1	Sens	Text. Pulpa			
4	1	M38	2-octenal	2	1	
4	1	M45	guayacol	2	4	
4	1	M60	salicilato de metilo	2	4	
4	1	M88	UNK m/z 131	2	4	
9	1	M11	tolueno	2	4	
4	1	M7	3-metil-1-butanol	2	1	
4	1	M12	<i>cis</i> -3-hexenal	2	1	
4	1	M17	1-nitropentano	2	1	
4	1	M91	2-dodecanona	2	1	
4	1	M98	β -metil ionona	2	1	
4	1	Sens	Val. Gral. (inv)			
9	1	M15	<i>trans</i> -2-hexenal	2	1	
9	1	M85	geranil acetona	2	1	

N: número de neurona. V: vecindad. Sens: variable sensorial

Zona c/LA1589: ubicación del metabolito en el ACP incluyendo LA1589.

Zona s/LA1589: ubicación del metabolito en el ACP excluyendo LA1589.

Los metabolitos más renombrados de la zona de influencia del olor y sabor característico corresponden a COVs de impacto como salicilato de metilo, 3-metil-1-

butanol, *cis*-3-hexenal, 1-nitropentano, *trans*-2-hexenal y geranil acetona. Además completan este grupo otros metabolitos que no han sido relacionados hasta el momento a las características sensoriales del tomate, estos nuevos COVs fueron *cis*-linalil óxido, *trans*-linalil óxido, 3-metilheptilacetato (inv), 2-octenal, β -metil ionona, tolueno, 2-dodecanona y dos señales sin identificar UNK m/z 131 y UNK m/z 43.

En forma global, de acuerdo al origen metabólico de los compuestos volátiles asociados al olor y sabor, las vías metabólicas más influyentes fueron los ácidos grasos y aminoácidos aportando un 31 % cada una y los terpenoides, carotenoides y compuestos sin identificar contribuyendo con un 12,5 % cada uno sobre el total de COVs.

Por otro lado, se demostró nuevamente la estrecha relación que presentaron las variables sensoriales dulzura, jugosidad, valoración general y textura de pulpa con las variables sensoriales de mayor interés en este estudio. Particularmente la dulzura se relacionó con el olor y sabor en los 3 análisis realizados (cosechas 2009, 2010 y 2012), mientras que la jugosidad lo hizo en las dos últimas oportunidades, en 2010 y 2012.

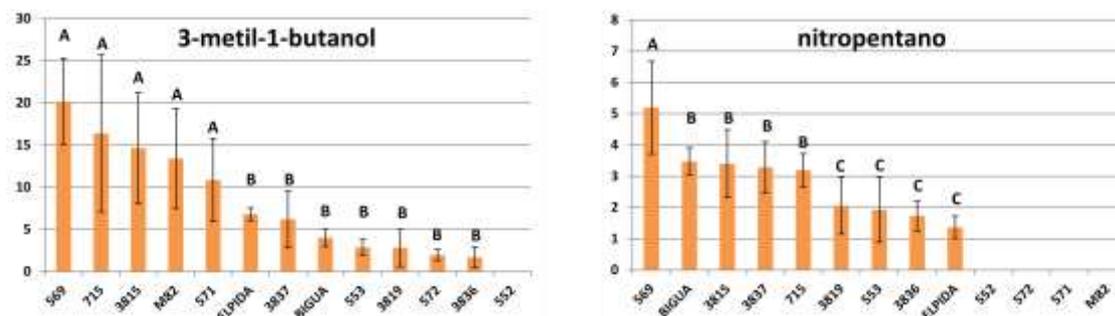
A partir de los resultados del ARNeu pudo observarse que, exceptuando 3-metilheptil acetato, todas las variables metabólicas asociadas al olor y sabor presentaron relación con la Zona 2 del ACP (Figura 3) cuando el cultivar silvestre formó parte de las variedades estudiadas. Esta zona de COVs se asoció con los cultivares del Grupo-2, 571, 3815, 569 y 715 (Figura 2). Por otro lado cuando el cultivar LA1589 fue excluido del análisis de ACP, estos mismos COVs, correlacionados al olor y sabor, se asociaron a la Zona 1 (*S. lyc*) y Zona 4 (*S. lyc*) del ACP LA1589 (Figura 6). Estas zonas de COVs presentaron relación con el Grupo-1 (*S. lyc*) y Grupo-571 (*S. lyc*) conteniendo a los cultivares 569, 3815 y 571 y el Grupo-715 (*S. lyc*) exclusivamente influenciado por la variedad 715 (Figura 5). Debe recordarse que las variedades 569 y 715 presentaron los mejores aspectos sensoriales por su sabor y olor respectivamente y los cultivares 3815 y 571 tuvieron una apreciación media a baja en sus frutos. La agrupación de los COVs señalados a cultivares de buena calidad sensorial pone de manifiesto la congruencia de los resultados obtenidos del estudio por ARNeu junto con los datos obtenidos de los análisis de ACP.

Los datos finales del análisis de ARNeu permitieron remarcar cuales metabolitos se asociaron con el olor y sabor característico identificando las zonas de las gráficas de ACP donde se ubicaron los COVs. La Zona 2 (con LA1589) y las Zonas 1 (*S.lyc*) y Zona 4 (*S.lyc*) contuvieron las variables metabólicas que se correlacionaron con mayor fortaleza con el olor y sabor en la cosecha 2012.

Análisis Específico de los Compuestos Orgánicos Volátiles de la Cosecha 2012

Los análisis de ARNeu y ACP determinaron que los metabolitos asociados a las variables sensoriales de interés se distribuyeron en mayor proporción en la Zona 1 (*S. lyc*) y Zona 4 (*S. lyc*) de las gráficas de ACP (sin LA1589). Estas zonas presentaron mayor influencia de los cultivares 715, 569, 3815 y 571. A continuación se detallarán algunos ejemplos de los COVs y cultivares de la especie *S. lycopersicum* de estas y otras zonas mencionadas.

En la Zona 1 (*S. lyc*) se agruparon los metabolitos volátiles de impacto^[2, 12] 3-metil-1-butanol, *cis*-3-hexenal, 1-nitropentano, *trans*-2-hexenal y geranil acetona correlacionados al olor y sabor del fruto mediante ARNeu. Estos COVs expusieron sus máximos niveles con diferencias significativas en los cultivares 569, 3815, 571 y en menor medida 715, M82 y 3837. Estas variedades presentaron características sensoriales medias y buenas en base a su olor y sabor. En las Figuras 12 y 13 y las Figuras 7, 10 y 36 del Anexo Digital ANAVA 2012 se ejemplifican los niveles de los COVs de impacto mencionados.



Figuras 12 y 13. Niveles de COVs asociados a la Zona 1 (*S. lyc*) de la cosecha 2012.

Letras diferentes demuestran niveles de significancia distintos para el análisis de varianza ($\alpha=0.05$).

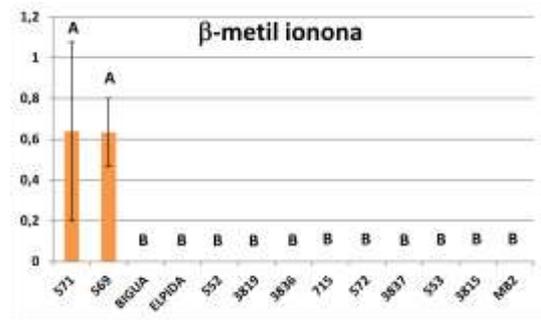
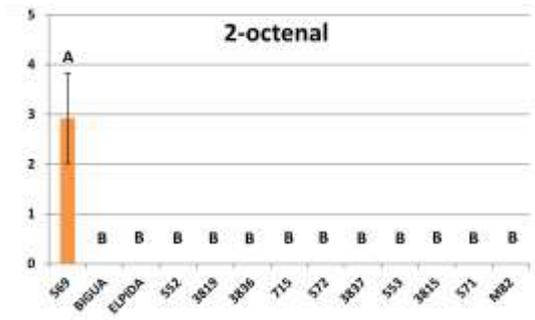
En las figuras anteriores puede observarse que para los derivados volátiles del metabolismo de leucina e isoleucina^[13, 14], los cultivares 569, 3815 y 715, en forma algo inferior, presentaron los niveles más abundantes de estos metabolitos.

Otros COVs remarcados del análisis de ARNeu pertenecientes a este grupo de variables metabólicas que no pertenecen a la lista de metabolitos de impacto fueron *cis*-linalil óxido, *trans*-linalil óxido, 2-octenal, 2-dodecanona, β -metil ionona y UNK m/z 43. Los COVs 2-dodecanona y β -metil ionona no han sido hasta el momento ligados al olor y el sabor del fruto del tomate.

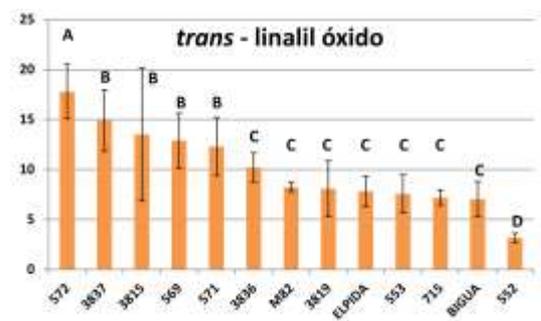
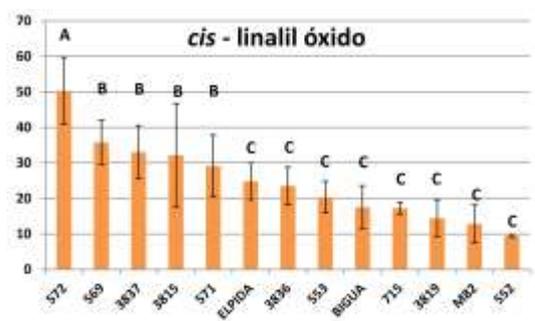
Sobre los COVs 2-octenal y β -metil ionona se observó que sólo se expresaron específicamente en los cultivares 569 y 571 del Grupo-1 (*S. lyc*). En cambio UNK m/z 43 y 2-dodecanona se expresaron en diversos genotipos con niveles significativos similares en 552, 553, 3836 y cultivares de otros grupos.

Por último los terpenoides *cis*-linalil óxido y *trans*-linalil óxido aportando notas de tipo floral y herbáceo^[17], tuvieron una expresión significativamente más elevada en 572, una de las variedades de mejor calidad, seguido de variedades incluidas en el Grupo-1

(*S. lyc*) con buenos a moderados niveles de aceptación sensorial. En las Figuras 14 a 17 y Figuras 1 y 40 del Anexo Digital ANAVA 2012 se grafican los niveles de los COVs mencionados.



Figuras 14 y 15. Niveles de COVs asociados a la Zona 1 (*S. lyc*) de la cosecha 2012. Letras diferentes demuestran niveles de significancia distintos para el análisis de varianza ($\alpha=0.05$).



Figuras 16 y 17. Niveles de COVs asociados a la Zona 1 (*S. lyc*) de la cosecha 2012. Letras diferentes demuestran niveles de significancia distintos para el análisis de varianza ($\alpha=0.05$).

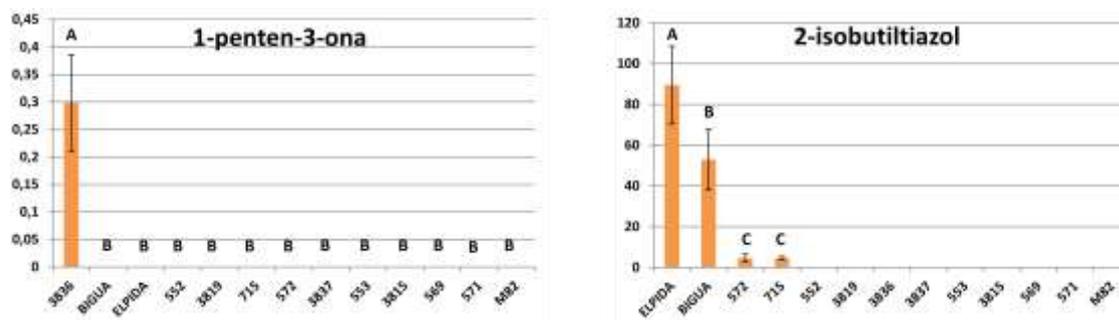
Los resultados obtenidos en el ARNeu no permitieron en esta cosecha discriminar específicamente cuales COVs aportaron en mayor medida al olor o sabor característico del tomate. Sin embargo, teniendo en cuenta que el cultivar 569 se ubicó siempre dentro de las variedades correlacionados a los caracteres sensoriales y el rasgo sensorial destacado fue el buen sabor de sus frutos, permite inferir que esta variedad presentó un perfil de COVs que contribuiría positivamente a desarrollar un sabor agradable junto con otros metabolitos como azúcares y ácidos orgánicos^[16].

Además en esta zona se distribuyeron otros metabolitos que no fueron asociados al olor y sabor del fruto por ARNeu, entre ellos pueden nombrarse a 2-etilfurano, hexanal, heptanal, 2-undecanona, terpinoleno y lialil. Los cuatro primeros compuestos provienen del metabolismo de ácidos grasos y presentan notas de tipo dulce-caramelo, herbáceo-fresco-vegetal y frutado-ceroso respectivamente^[17] que podrían armonizar con el aroma del fruto. En cuanto al terpinoleno y lialil, estos aportan matices de tipo cítrico-pino-madera y floral^[17]. La mayoría de estos COVs tuvieron como mayor exponente, con diferencias significativas, a la variedad 3815 que presentó una apreciación sensorial media. Estos COVs, a pesar de presentar notas sensoriales que pudieran beneficiar el incremento del olor característico no fueron asociadas a los cultivares de mayor calidad en el 2012. En las Figuras 3, 8, 11, 20, 31 y 37 del Anexo Digital ANAVA 2012 se grafican los niveles de los metabolitos comentados.

En la Zona 2 (*S. lyc*) no se ubicó ninguno de los COVs señalados por el análisis de ARNeu como contribuyente para el olor o sabor del fruto. Esta zona se mostró influenciada por cultivares de buena y media aceptación sensorial en forma muy cercana a las variedades que presentaron la más baja calificación organoléptica. Estas variedades pertenecen todas al Grupo-2 (*S. lyc*).

En esta sección de la gráfica a pesar de no ubicarse COVs relacionados a las variables sensoriales de interés se ubicaron 3 metabolitos de impacto, 1-penten-3-ona, *trans*-2-heptenal y 2-isobutiltiazol^[12] y otros COVs que en cosechas previas formaron parte de las variables correlacionadas al olor y sabor del fruto.

Los metabolitos de impacto mencionados se asociaron mayoritariamente a cultivares que presentaron niveles de calidad sensorial bajos y medios, como ELPIDA, BIGUA, 3836 y 553. En las Figuras 18 y 19 y en la Figura 10 del Anexo Digital ANAVA se grafican los niveles de estos metabolitos de impacto situados en la Zona 2 (*S. lyc*).



Figuras 18 y 19. Niveles de COVs asociados a la Zona 2 (*S. lyc*) de la cosecha 2012.

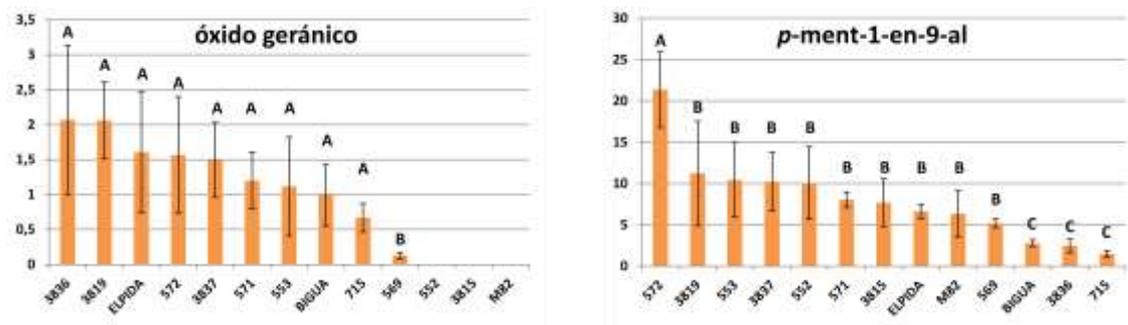
Letras diferentes demuestran niveles de significancia distintos para el análisis de varianza ($\alpha=0.05$).

Los niveles de estos importantes metabolitos presentaron niveles significativamente superiores en cultivares poco apreciados, sobre todo en ELPIDA y BIGUA. En esta cosecha estos metabolitos presentaron una relación de tipo invertida con el olor y sabor.

Los demás metabolitos que no forman parte de los COVs de impacto presentaron diferentes comportamientos en los cultivares asociados a la Zona 2 (*S. lyc*). Entre las variables metabólicas pueden nombrarse a *cis*-2-hexenal, óxido geránico, α -terpineol, *p*-ment-1-en-9-al, α -hexil cinamaldehído y UNK m/z 94.

Los derivados terpénicos, óxido geránico, α -terpineol, *p*-ment-1-en-9-al, en las cosechas 2009 y 2010 presentaron correlación con el olor y sabor característico mediante el análisis de ARNeu (Tablas 4 y 5 del análisis de la Cosecha 2009 y Tabla 5 del Análisis de la Cosecha 2010). Sin embargo, en esta cosecha debido al perfil presentado no pudieron ser asociados a estas características sensoriales. En las Figuras 20 y 21 se grafican los niveles de algunos de los metabolitos mencionados.

El cultivar que presentó mayor abundancia para *p*-ment-1-en-9-al fue 572, mientras que para el resto de la cosecha se observó un nivel muy parejo. Un comportamiento similar fue observado para óxido geránico presentando niveles sin diferencias significativas para casi toda la cosecha. La acumulación de estos compuestos en los cultivares de mayor calidad fue observado en las cosechas 2009 y 2010, sin embargo en el 2012 no pudo observarse este mismo comportamiento.



Figuras 20 y 21. Niveles de COVs asociados a la Zona 2 (*S. lyc*) de la cosecha 2012. Letras diferentes demuestran niveles de significancia distintos para el análisis de varianza ($\alpha=0.05$).

Puede agregarse también que *p*-ment-1-en-9-al (M62), fue uno de los COVs que mayor variabilidad aportó sobre el eje CP2 para la discriminación de los cultivares (Figura 6). Este derivado terpénico presentó una ubicación más alejada del centroide de la Zona 2 (*S. lyc*). Este desplazamiento coincide con su mayor relación con la variedad 572 y su ubicación más aislada del resto de las variedades.

Por otro lado α -hexil cinamaldehído expuso los niveles más abundantes en los cultivares de peor valoración sensorial de la cosecha, BIGUA, ELPIDA y en una variedad de buena aceptación, 572. El comportamiento errático de esta variable no permite asociar su presencia con una buena o mala asociación sensorial en la cosecha 2012. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que en el análisis de la cosecha 2009 este compuesto volátil fue asociado al sabor característico como un posible contribuyente positivo al desarrollo del mismo (Tabla 7 del Análisis de la Cosecha 2009).

En forma similar *cis*-2-hexenal se expresó exclusivamente en la variedad 3836, presentando una calidad sensorial media/baja. En la cosecha 2010, este metabolito fue asociado en forma invertida con el olor característico, es decir que un incremento en su concentración desfavorecería el desarrollo de una buena percepción sensorial (Tabla 4 del Análisis de la Cosecha 2010). En este caso si fue posible observar una congruencia entre la relación metabolito-cultivar a pesar de que en el 2012 no fue asociado a las variables de interés. Esto permite inferir acerca de una posible contribución negativa de este compuesto en los frutos que presentan concentraciones abundantes de hexenal. En las Figuras 7 y 43 del Anexo Digital ANAVA 2012 se pueden apreciar las gráficas con los niveles de los metabolitos mencionados.

El resto de los COVs de la Zona 2 (*S. lyc*) no presentó relaciones muy claras acerca de su expresión en los cultivares asociados ni tendencias que pudieran compararse con resultados previos.

En la Zona 3 (*S. lyc*), fue posible encontrar un solo metabolito relacionado al olor y sabor característico expuesto por el ARNeu. El mismo fue el éster acético derivado de ácidos grasos relacionado en forma inversa, 3-metilheptil acetato. La ubicación del metabolito se asoció a los cultivares 552, 3819 y M62 que presentaron mayor influencia sobre la Zona 3 (*S. lyc*). Debe considerarse que este compuesto no ha sido clasificado previamente como un posible contribuyente al desarrollo de las características sensoriales del fruto del tomate.

Además en la Zona 3 (*S. lyc*) también se asociaron otros COVs importantes como los metabolitos de impacto β -damascenona y β -ionona. Completan esta lista DMHEX: 3,6-dimetil-2, 3, 3a, 4, 5, 7a-hexahidrobenzofurano, 2-etil-1-hexanol, alcanfor, α -citral, benzofenona y las señales sin identificar UNK m/z 57-3 y UNK m/z 95.

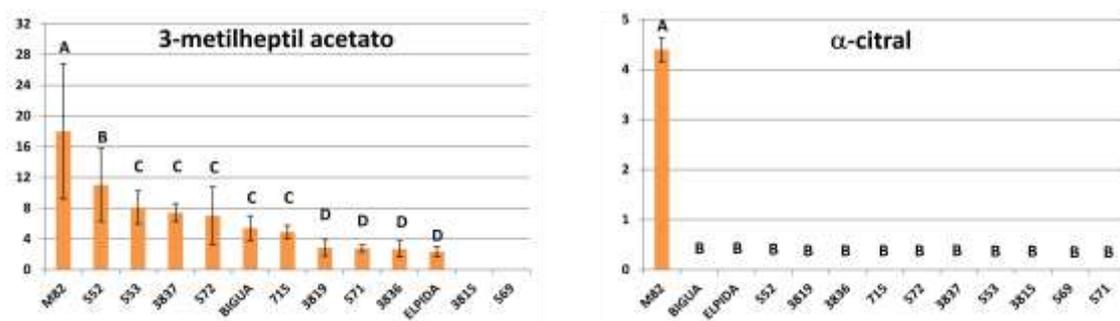
El éster 3-metilheptil acetato presentó los niveles más elevados en la variedad M82 y 552, pertenecientes al Grupo-3 (*S. lyc*) de cultivares. Sorprendentemente, el genotipo M82 presentó una muy buena apreciación en base a su olor, pero fue recibido con menor aceptación debido al sabor desarrollado en sus frutos.

Respecto del compuesto volátil mencionado no se reportan hasta el momento datos sensoriales acerca del mismo, aunque un isómero estructural, 1-metilheptil acetato (CAS N° 2051-50-5) presenta notas aromáticas de tipo frutal^[17] que podrían estar cercanas al aporte del metabolito remarcado por el ARNeu. Por otro lado es conocido que los ésteres no son muy abundantes en el tomate como lo son en otros frutos como peras^[26], manzanas^[34], bananas y frutillas^[35]. Además un estudio determinó que la presencia aumentada de ésteres, por disminución de enzimas de acción esterasa, en las variedades comestibles de tomate tiene un efecto perjudicial sobre el impacto sensorial de sus frutos. Este efecto se observa más claramente en frutos silvestres de tomate que no son considerados comestibles^[31]. Toda esta información permite afirmar la relación inversa de este metabolito, denotada por ARNeu, con las características de interés en los frutos de tomate.

En la Figura 22 se ejemplifican los niveles de 3-metilheptil acetato en los cultivares de la cosecha 2012.

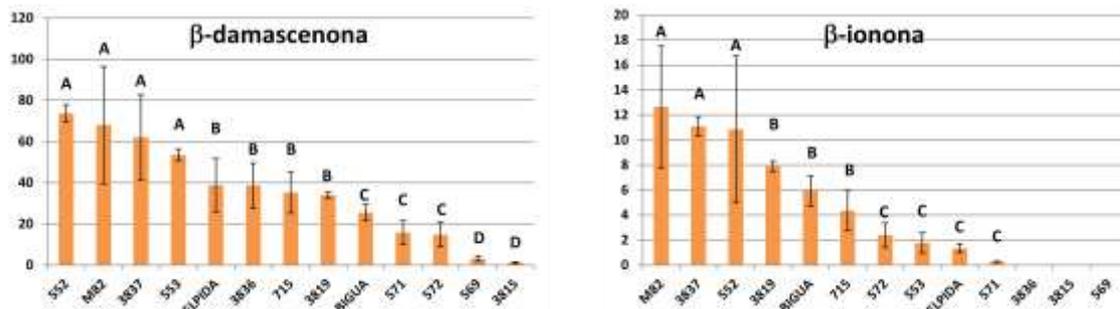
Los COVs de impacto sin correlación con el olor y sabor del fruto, β -damascenona y β -ionona junto con α -citral fueron los derivados de carotenoides ubicados en esta zona. Las características sensoriales que presentan estos metabolitos son de tipo frutal y favorecen el desarrollo de aromas agradables^[17]. Estos COVs se correlacionaron en mayor medida con las variedades M82, 3837, 552 y 3819 presentando en general una buena apreciación general en los frutos. Particularmente α -citral se expresó en forma exclusiva en M82, mientras que los dos otros derivados de carotenoides se expresaron en mayor cantidad de variedades, aunque en mayor abundancia en los cultivares mencionados.

En las Figuras 23 a 25 se grafican los derivados de carotenoides mencionados.



Figuras 22 y 23. Niveles de COVs asociados a la Zona 3 (*S. lyc*) de la cosecha 2012.

Letras diferentes demuestran niveles de significancia distintos para el análisis de varianza ($\alpha=0.05$).



Figuras 24 y 25. Niveles de COVs asociados a la Zona 3 (*S. lyc*) de la cosecha 2012. Letras diferentes demuestran niveles de significancia distintos para el análisis de varianza ($\alpha=0.05$).

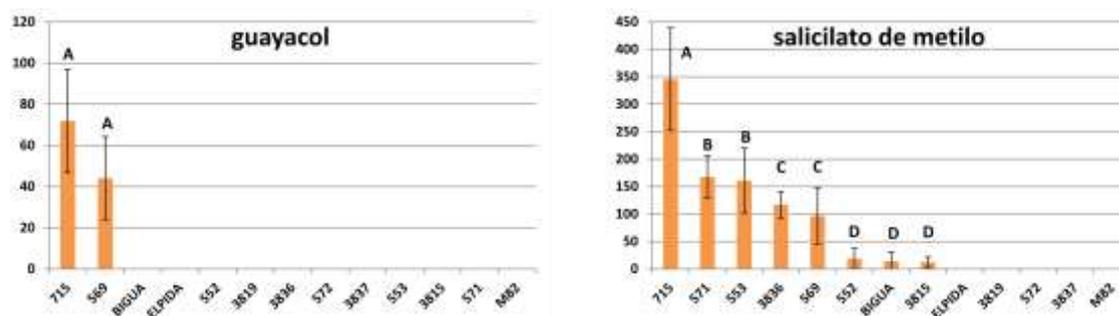
Los metabolitos benzofenona, alcanfor, UNK m/z 57-3, UNK m/z 95 y DMHEX presentaron en común que los cultivares del Grupo-3 (*S. lyc*) contuvieron los niveles más abundantes de los COVs mencionados. A su vez fue posible observar que en todos ellos los niveles de estos metabolitos estuvieron ausentes en las variedades del Grupo-1 (*S. lyc*), 569 y 3815, ubicado en el extremo izquierdo de las gráficas de ACP. Esto permite inferir acerca de la capacidad de estos COVs para discriminar algunas variedades en base a los niveles que expresan sus frutos. Particularmente benzofenona y alcanfor, situados en la sección más distal de la Zona 3 (*S. lyc*) (Figura 6) fueron los metabolitos que mayor variabilidad remarcaron en los cultivares de este grupo. En las Figuras 23, 26, 32, 33 y 42 del Anexo Digital ANAVA 2012 se demuestran los niveles de estos COVs.

Finalmente, en la Zona 4 (*S. lyc*) íntimamente correlacionada con la variedad 715, presentando el mejor olor de la cosecha 2012, se ubicaron 4 metabolitos asociados a las variables sensoriales de interés por medio del ARNeu. Estos COVs fueron guayacol, tolueno, UNK m/z 131 y el metabolito de impacto salicilato de metilo. Este grupo de COVs de la Zona 4 (*S. lyc*) se completó con 4-pentenal, limoneno y 3-metilbutanal, otro metabolito de impacto.

Los derivados de aminoácidos aromáticos tolueno, guayacol y salicilato de metilo presentaron los niveles más abundantes en 715 y otras variedades de buena y media calidad. Sobre el salicilato de metilo es conocido que forma parte de los metabolitos esenciales para el desarrollo del buen aroma del tomate^[4, 12], esta información concuerda con la expresión de este metabolito en el cultivar de mayor aceptación olfatoria.

Respecto del guayacol, como fue mencionado en el análisis de la cosecha 2010, estudios previos asociaron este compuesto a características negativas (*off flavor*)^[19], incluso en otras especies y alimentos^[36], pero en los últimos años otros estudios lo reivindican ubicándolo como un posible contribuyente en el desarrollo de los caracteres clásicos del tomate^[7]. En esta cosecha fue posible observar su asociación al mejor cultivar, 715.

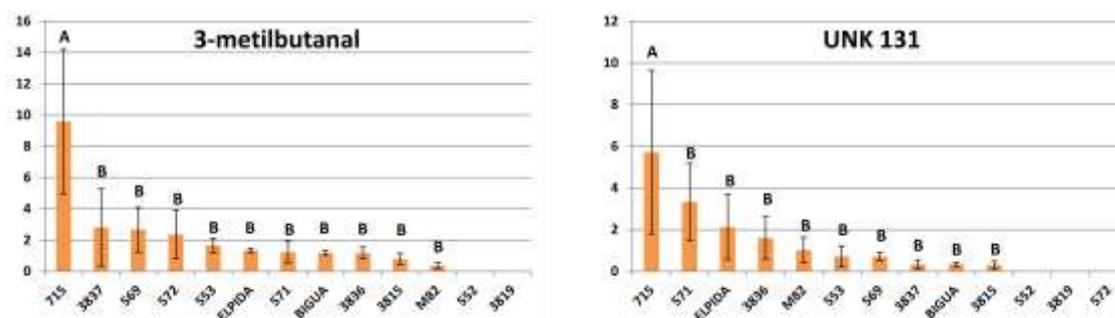
El hidrocarburo aromático, tolueno, presentó sus máximos niveles en 715 y otros genotipos como 3836 y ELPIDA de menor calidad sensorial. En esta cosecha no presentó una clara tendencia a asociarse en mayor proporción a los mejores cultivares. Sin embargo junto con salicilato de metilo y guayacol en cosechas anteriores también fueron relacionados al olor y sabor del fruto (Tabla 4 del Análisis de Cosecha 2009 y Tablas 4 y 5 del Análisis de Cosecha 2010). En las Figuras 26, 27 y en la Figura 6 del Anexo Digital ANAVA 2012 se grafican los niveles de los derivados de aminoácidos comentados.



Figuras 26 y 27. Niveles de COVs asociados a la Zona 4 (*S. lyc*) de la cosecha 2012. Letras diferentes demuestran niveles de significancia distintos para el análisis de varianza ($\alpha=0.05$).

La otra variable metabólica relacionada por ARNeu fue UNK m/z 131, esta señal se asoció a 715 presentando niveles significativamente superiores al resto de la cosecha. En el análisis de la cosecha 2009 este mismo metabolito desconocido también fue asociado al olor característico por ARNeu (Tabla 5 del Análisis de la Cosecha 2009).

El metabolito volátil de impacto derivado de aminoácidos no aromáticos, 3-metilbutanal, expresó un perfil muy similar a UNK m/z 131. El cultivar 715 fue la variedad que presentó el nivel más abundante con diferencias estadísticamente significativas. A pesar de ello, no presentó una asociación con las variables sensoriales más importantes en el 2012, por el contrario en la cosecha 2009, de igual forma que UNK m/z 131, este metabolito si fue asociado al sabor característico mediante ARNeu. (Tabla 7 del Análisis de la Cosecha 2009). En las gráficas 28 y 29 se demuestran los niveles de estos COVs mencionados.



Figuras 28 y 29. Niveles de COVs asociados a la Zona 4 (*S. lyc*) de la cosecha 2012. Letras diferentes demuestran niveles de significancia distintos para el análisis de varianza ($\alpha=0.05$).

Por último los COVs 4-pental y limoneno presentaron expresión exclusivamente en la variedad 715. En las Figuras 5 y 15 del Anexo Digital ANAVA 2012 se ejemplifican estos metabolitos.

En un breve resumen, en esta compleja sección pudo observarse que los metabolitos volátiles más íntimamente relacionados con el olor y sabor característico se distribuyeron mayoritariamente en la Zona 1 (*S. lyc*) y Zona 4 (*S. lyc*). A su vez estos grupos de COVs responden a la influencia de los cultivares 569 (como el mejor exponente del grupo por su sabor), 3815 y 571 para la Zona 1 (*S. lyc*) y 715, presentando la mejor calidad en base a su olor, para la Zona 4 (*S. lyc*).

Conclusiones de la Cosecha 2012

Las metodologías de análisis multivariado permitieron remarcar las diferencias presentes en los cultivares, siendo la especie silvestre LA1589, *S. pimpinellifolium*, la que expuso mayor distancia metabólica entre las variedades de la cosecha 2012.

La adición de un análisis excluyendo el cultivar exótico, LA1589, permitió señalar diferentes grupos y variedades de la especie *S. lycopersicum* con contenidos metabólicos diferentes que previamente no pudieron ser caracterizados cuando el cultivar silvestre formó parte del estudio. El análisis permitió reconocer 3 grupos diferenciados entre sí y señalar a las variedades de *S. lycopersicum* 715 y 571 como los más distintos de la cosecha 2012.

El análisis de ARNeu permitió señalar una serie de COVs asociados al olor y sabor característico incluyendo metabolitos de impacto y otros no relacionados. Estos COVs se ubicaron en mayor proporción en las zonas donde los cultivares 569, 3815, 571 y 715 presentaron la mayor influencia sobre los metabolitos volátiles.

El análisis específico de los metabolitos en cada zona de COVs permitió remarcar que algunos metabolitos volátiles de impacto presentaron una relación contraria al comportamiento clásico esperado, expresándose en variedades de baja calidad sensorial. Un ejemplo de estos COVs fueron 2-isobutiltiazol y 1-penten-3-ona.

Los resultados integrados de los análisis de la cosechas 2012 sugieren que las variedades 569 y 715 fueron los cultivares de mayor influencia para el sabor y olor respectivamente en base a los COVs asociados que expresaron y las buenas valoraciones sensoriales de sus frutos.

Comentarios Finales del Capítulo V

Consideraciones Generales

La información analizada en forma meticulosa de las 3 campañas de cosecha de tomates 2009, 2010 y 2012 ha permitido exponer las diferencias metabólicas existentes entre las distintas especies de tomate analizadas y también detallar las diferencias sensoriales y químicas dentro de las variedades de la especie comestible de tomates, *S. lycopersicum*.

Las características químicas que conformaron a cada cultivar resaltaron que la variabilidad observada entre los frutos pertenecientes a un mismo cultivar fueron muy inferiores a la variabilidad reflejada entre los genotipos permitiendo diferenciar las variedades ensayadas en cada cosecha.

La información organoléptica de los frutos obtenida en las sesiones de degustación presentó en forma general una correlación con la distribución de cultivares obtenida en base a sus diferencias metabólicas. Esta observación reafirma la influencia de los compuestos químicos volátiles sobre las características sensoriales en el fruto del tomate.

Los distintos enfoques de análisis sobre los datos metabólicos y sensoriales de las variedades de tomate arrojaron una serie de compuestos orgánicos volátiles que se asociaron estrechamente con el olor y sabor característico del fruto del tomate en cada cosecha.

Cosechas Individuales

La cosecha 2009 presentó la mayor cantidad de metabolitos volátiles asociados al aroma y sabor. Los COVs que presentaron mayor relación con el olor fueron en su mayoría derivados terpenoides y aminoácidos correspondiendo al perfil de metabolitos expresado por el cultivar 3806. El análisis del sabor en la misma cosecha presentó mayor correlación con derivados de aminoácidos, seguido de los ácidos grasos y carotenoides. Los cultivares que presentaron mayor influencia sobre esta variable fueron 572, 569 y 552.

La cosecha 2010 presentó un aporte mayoritario de ácidos grasos, en forma invertida, sobre el olor característico del fruto. Este efecto tuvo causa en la inclusión en el análisis del cultivar silvestre LA1589, *S. pimpinellifolium*, que posee un perfil de compuestos volátiles exacerbado y una mala apreciación sensorial. El sabor del fruto estuvo influenciado en mayor proporción por los derivados volátiles terpenoides y los cultivares 3812, ELPIDA y CheRedRoj fueron las variedades que mayor aporte presentaron sobre esta variable sensorial.

La cosecha 2012 comprendió la menor cantidad de metabolitos asociados al olor y sabor del tomate de las tres cosechas. Los metabolitos que mayor aporte presentaron para estas características sensoriales fueron los derivados volátiles de aminoácidos y

ácidos grasos. Los cultivares que presentaron mayor influencia fueron 715 para el olor y 569 para el sabor.

Metabolitos Volátiles asociados al Olor y Sabor del Fruto del Tomate

La cantidad total de metabolitos asociados al olor y sabor característico del tomate incluyó 57 metabolitos diferentes en los 3 años de cosecha estudiados. Dentro de esta lista se ubicaron compuestos con reconocida actividad sobre las características del fruto como los metabolitos volátiles de impacto. Un total de 18 de estos compuestos estuvieron incluidos en los metabolitos asociados al olor y sabor.

Así mismo, en forma novedosa, se encontró una serie de 15 compuestos volátiles que hasta el momento no habían sido relacionados como potenciales contribuyentes al aroma y sabor del fruto. Estos COVs fueron 2-etil-1-hexanol, *p*-ment-1-en-9-al, DMHEX: 3,6-dimetil-2, 3, 3a, 4, 5, 7a-hexahidrobenzofurano, alcanfor, terpinoleno, 2-metilacetofenona, 1-fenil-1-propanol, óxido geránico, 2-dodecanona, decanal, *p*-metoxitolueno, 3-metilheptil acetato, benzofenona, β -metil ionona, salicilato de propilo y salicilato de isoamilo.

Sumado a estos compuestos, otros metabolitos volátiles sin identificación también formaron parte del grupo de variables asociadas al olor y sabor del tomate. Las señales UNK *m/z* 120, UNK *m/z* 95, UNK *m/z* 131, UNK *m/z* 119, UNK *m/z* 68, UNK *m/z* 55, UNK *m/z* 57-2, UNK *m/z* 115, UNK *m/z* 43 y UNK *m/z* 93-2 formaron parte de la serie de desconocidos con relación a las características sensoriales de interés.

Particularmente los metabolitos que se asociaron en diversas cosechas con el olor y el sabor característico fueron:

- *cis*-3-hexenal, como el único metabolito que presentó relación específicamente con el olor característico en las tres cosechas ensayadas.
- β -damascenona, β -ionona epóxido, decanal y UNK *m/z* 55 específicamente con el sabor característico en dos cosechas diferentes.
- tolueno, UNK *m/z* 43, alcanfor, terpinoleno, óxido geránico, guayacol, 1-nitropentano, 2-dodecanona, 2-octenal, geranil acetona, metil salicilato y UNK *m/z* 131 con el olor y el sabor característico en dos cosechas diferentes.

Contribución Metabólica de los Compuestos Orgánicos Volátiles de las Cosechas de Tomate

En forma global, considerando los resultados finales de manera integrada pudo observarse que los derivados volátiles de aminoácidos, en particular los que presentaron residuos aromáticos, fueron los metabolitos de mayor contribución sobre el olor y sabor del fruto. Los derivados de ácidos grasos en un porcentaje menor fueron los segundos

contribuyentes más abundantes. Estas vías metabólicas fueron las que aportaron la mayor cantidad de metabolitos volátiles en los perfiles de COVs de las tres cosechas ensayadas.

Conclusiones Finales del Capítulo

La estrategia empleada utilizando diferentes análisis multivariados y un enfoque inicial comprendiendo la totalidad de los datos para reducir específicamente las variables de mayor correlación permitió remarcar determinados metabolitos, conocidos y nuevos, relacionados con los atributos sensoriales de interés.

El empleo de los Análisis por Redes Neuronales Artificiales como un novedoso complemento de las técnicas multivariadas clásicas de estudio permitió demarcar las variables metabólicas y sensoriales de mayor correlación con el olor y sabor característico del fruto del tomate. Debe remarcarse que la metodología de ARNeu ha sido utilizada por primera vez para el análisis de COVs del fruto del tomate.

El seguimiento de los metabolitos volátiles correlacionados al olor y sabor del fruto permitió identificar determinados cultivares de tomate que expresaron los compuestos volátiles remarcados como los responsables de favorecer o perjudicar el desarrollo del olor y sabor característico de la especie *S. lycopersicum*.

Referencias

- [1] **Petro-Turza M.** Flavor of Tomato and Tomato Products. *Food Rev. Int.*, 1987, 2:309-351.
- [2] **Goff SA, Klee HJ.** Plant Volatile Compounds: Sensory Cues for Health and Nutritional Value? *Science*, 2006, 311:815-819.
- [3] **Buttery RG, Teranishi R, Ling LC.** Fresh tomato aroma volatiles: a quantitative study. *J. Agr. Food Chem.*, 1987, 35:540-544.
- [4] **Yilmaz E.** The Chemistry of Fresh Tomato Flavor. *Turk. J. Agric. For.*, 2001, 25:149-155.
- [5] **Yilmaz E.** Oxylipin Pathway in the Biosynthesis of Fresh Tomato Volatiles. *Turk. J. Biol.*, 2001, 25:351-360.
- [6] **Tikunov Y, Lommen A, de Vos CHR, Verhoeven HA, Bino RJ, Hall RD, Bovy AG.** A Novel Approach for Nontargeted Data Analysis for Metabolomics. Large-Scale Profiling of Tomato Fruit Volatiles. *Plant Physiol.*, 2005, 139:1125-1137.
- [7] **Tieman DM, Bliss P, McIntyre LM, Blandon-Ubeda A, Bies D, Odabasi AZ, Rodriguez GR, van der Knaap E, Taylor MG, Goulet C, et al.** The Chemical Interactions Underlying Tomato Flavor Preferences. *Curr. Biol.*, 2012, 22:1035-1039.
- [8] **Fukusaki E, Kobayashi A.** Plant metabolomics: potential for practical operation. *J. Biosci. Bioeng.*, 2005, 100:347-354.
- [9] **Milone DH, Stegmayer GS, Kamenetzky L, Lopez M, Lee JM, Giovannoni JJ, Carrari F.** *omeSOM: a Software for Clustering and Visualization of Transcriptional and Metabolite Data Mined from Interspecific Crosses of Crop Plants. *BMC Bioinformatics*, 2010, 11:438.
- [10] **Stegmayer G, Gerard M, Milone DH.** Data Mining Over Biological Datasets: An Integrated Approach Based on Computational Intelligence. *IEEE Comput. Intell. M.*, 2012, 7:22-34.
- [11] **Milone DH, Stegmayer G, Lopez M, Kamenetzky L, Carrari F.** Improving clustering with metabolic pathway data. *BMC Bioinformatics*, 2014, 15:101.
- [12] **Buttery RG, Ling LC.** Volatile Components of Tomato Fruit and Plant Parts: Relationship and Biogenesis. In *Bioactive Volatile Compounds from Plants*. Edited by Teranishi R, Buttery RG, Sugisawa H. Washington D.C.: ACS; 1993: 22-33
- [13] **Gonda I, Bar E, Portnoy V, Lev S, Burger J, Schaffer AA, Tadmor Ya, Gepstein S, Giovannoni JJ, Katzir N, Lewinsohn E.** Branched-chain and aromatic amino acid catabolism into aroma volatiles in Cucumis melo L. fruit. *J. Exp. Bot.*, 2010, 61:1111-1123.
- [14] **Kochevenko A, Araújo WL, Maloney GS, Tieman DM, Do PT, Taylor MG, Klee HJ, Fernie AR.** Catabolism of Branched Chain Amino Acids Supports Respiration but Not Volatile Synthesis in Tomato Fruits. *Mol. Plant*, 2012, 5:366-375.
- [15] **Klee HJ.** Improving the flavor of fresh fruits: genomics, biochemistry, and biotechnology. *New Phytol.*, 2010, 187:44-56.
- [16] **Baldwin EA, Goodner K, Plotto A.** Interaction of Volatiles, Sugars, and Acids on Perception of Tomato Aroma and Flavor Descriptors. *J. Food Sci.*, 2008, 73:S294-S307.
- [17] **The Good Scent Company Web Page** [<http://www.thegoodscentcompany.com>]
- [18] **Tieman D, Zeigler M, Schmelz E, Taylor MG, Rushing S, Jones JB, Klee HJ.** Functional analysis of a tomato salicylic acid methyl transferase and its role in synthesis of the flavor volatile methyl salicylate. *Plant J.*, 2010, 62:113-123.
- [19] **Tikunov YM, de Vos RCH, González Paramás AM, Hall RD, Bovy AG.** A Role for Differential Glycoconjugation in the Emission of Phenylpropanoid Volatiles from Tomato Fruit Discovered Using a Metabolic Data Fusion Approach. *Plant Physiol.*, 2010, 152:55-70.
- [20] **Fridman E, Wang J, Iijima Y, Froehlich JE, Gang DR, Ohlrogge J, Pichersky E.** Metabolic, Genomic, and Biochemical Analyses of Glandular Trichomes from the Wild Tomato Species *Lycopersicon hirsutum* Identify a Key Enzyme in the Biosynthesis of Methylketones. *Plant Cell*, 2005, 17:1252-1267.

- [21] **Besser K, Harper A, Welsby N, Schauvinhold I, Slocombe S, Li Y, Dixon RA, Broun P.** Divergent Regulation of Terpenoid Metabolism in the Trichomes of Wild and Cultivated Tomato Species. *Plant Physiol.*, 2009, 149:499-514.
- [22] **Qiao Y, Xie B, Zhang Y, Zhang Y, Fan G, Yao X, Pan S.** Characterization of Aroma Active Compounds in Fruit Juice and Peel Oil of Jincheng Sweet Orange Fruit (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) by GC-MS and GC-O. *Molecules*, 2008, 13:1333-1344.
- [23] **Flamini R, Traldi P.** Grape Aroma Compounds: Terpenes, C13-Norisoprenoids, Benzene Compounds, and 3-Alkyl-2-Methoxypyrazines. In *Mass Spectrometry in Grape and Wine Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc.; 2010: 95-116
- [24] **Aharoni A, Giri AP, Verstappen FWA, Berteaux CM, Sevenier R, Sun Z, Jongasma MA, Schwab W, Bouwmeester HJ.** Gain and Loss of Fruit Flavor Compounds Produced by Wild and Cultivated Strawberry Species. *Plant Cell*, 2004, 16:3110-3131.
- [25] **Yilmaztekin M.** Analysis of Volatile Components of Cape Gooseberry (*Physalis peruviana* L.) Grown in Turkey by HS-SPME and GC-MS. *Sci. World J.*, 2014, 2014:8.
- [26] **Rapparini F, Predieri S.** Pear Fruit Volatiles. In *Horticultural Reviews*. John Wiley & Sons, Inc.; 2010: 237-324
- [27] **Boonbumrung S, Tamura H, Mookdasanit J, Nakamoto H, Ishihara M, Yoshizawa T, Varanyanon W.** Characteristic Aroma Components of the Volatile Oil of Yellow Keaw Mango Fruits Determined by Limited Odor Unit Method. *Food Sci. Technol. Res.*, 2001, 7:200-206.
- [28] **Aprèa E, Biasioli F, Gasperi F.** Volatile Compounds of Raspberry Fruit: From Analytical Methods to Biological Role and Sensory Impact. *Molecules*, 2015, 20:2445-2474.
- [29] **Samakradhamrongthai R, Utama-Ang N, Thakeow P.** Identification of volatile compounds released from dry scented Thai flowers and their potential application in flower-mixed tea. *Asian J. Food Agro.*, 2009, 2:525-534.
- [30] **Guterman I, Masci T, Chen X, Negre F, Pichersky E, Dudareva N, Weiss D, Vainstein A.** Generation of Phenylpropanoid Pathway-Derived Volatiles in Transgenic Plants: Rose Alcohol Acetyltransferase Produces Phenylethyl Acetate and Benzyl Acetate in Petunia Flowers. *Plant Mol. Biol.*, 2006, 60:555-563.
- [31] **Goulet C, Mageroy MH, Lam NB, Floystad A, Tieman DM, Klee HJ.** Role of an esterase in flavor volatile variation within the tomato clade. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2012, 109:19009-19014.
- [32] **Tadmor Y, Fridman E, Gur A, Larkov O, Lastochkin E, Ravid U, Zamir D, Lewinsohn E.** Identification of malodorous, a Wild Species Allele Affecting Tomato Aroma That Was Selected against during Domestication. *J. Agr. Food Chem.*, 2002, 50:2005-2009.
- [33] **Schauer N, Zamir D, Fernie AR.** Metabolic profiling of leaves and fruit of wild species tomato: a survey of the *Solanum lycopersicum* complex. *J. Exp. Bot.*, 2005, 56:297-307.
- [34] **Song J, Gardner BD, Holland JF, Beaudry RM.** Rapid Analysis of Volatile Flavor Compounds in Apple Fruit Using SPME and GC/Time-of-Flight Mass Spectrometry. *J. Agr. Food Chem.*, 1997, 45:1801-1807.
- [35] **Beekwilder J, Alvarez-Huerta M, Neef E, Verstappen FWA, Bouwmeester HJ, Aharoni A.** Functional Characterization of Enzymes Forming Volatile Esters from Strawberry and Banana. *Plant Physiol.*, 2004, 135:1865-1878.
- [36] **Kennison KR, Gibberd MR, Pollnitz AP, Wilkinson KL.** Smoke-Derived Taint in Wine: The Release of Smoke-Derived Volatile Phenols during Fermentation of Merlot Juice following Grapevine Exposure to Smoke. *J. Agr. Food Chem.*, 2008, 56:7379-7383.

Capítulo VI

Asociación del Olor y Sabor con el Origen Metabólico y Grupos Funcionales de los Compuestos Orgánicos Volátiles del Fruto del Tomate

Asociación del Olor y Sabor con el Origen Metabólico y Grupos Funcionales de los Compuestos Orgánicos Volátiles del Fruto del Tomate

Introducción

Los seres humanos se basan principalmente en 2 sistemas quimiosensoriales para detectar químicos en el aire: el olfato y la quemestesis (sensibilidad química). El sentido del olfato mediado por los nervios olfativos y la quemestesis por medio del nervio trigémino. Este último sistema nervioso se encarga de determinar la presencia de COVs produciendo sensaciones como el escozor, hormigueo, ardor, irritación, frescura y pungencia complementando la información obtenida por los receptores olfatorios^[1].

Diferentes estudios han encontrado una relación entre las características funcionales, espaciales y estéricas de COVs y su actividad en términos de percepción del olor. Estos estudios han demostrado una directa relación entre diferentes características estructurales, tales como grupos funcionales, características de las cadenas laterales, estereoisomería, con el poder odorífero y propiedades o notas odoríferas^[2-4].

El uso de la información global generalmente tiende a simplificar un modelo de estudio. En muchas ocasiones, ofrece la ventaja de manejar menor cantidad de datos ayudando a interpretar fenómenos biológicos que pasan desapercibidos cuando los análisis se encuentran enfocados en determinar relaciones específicas y conclusiones puntuales. En los capítulos previos, se identificaron en cada cosecha COVs que se asociaron al olor y sabor del fruto de tomate. Sin embargo, las asociaciones de estos compuestos no fueron consistentes en todas las cosechas, no obstante, si hubo consistencias en el predominio de COVs asociados de determinados orígenes metabólicos. En este trabajo de investigación se planificó un esquema de análisis que involucrara conjuntamente todas las mediciones sensoriales y metabólicas determinadas en las tres cosechas ensayadas en un solo estudio. El objetivo de este análisis es determinar asociaciones entre las distintas variables sensoriales y los grupos funcionales y/u origen metabólico ^[5]. Mediante el uso de una sencilla herramienta analítica como el Análisis de Correlación de Spearman fue posible obtener interesantes resultados cumpliendo con el objetivo planteado anteriormente ^[6-8].

Análisis de Correlación entre variables sensoriales

Inicialmente se realizó un análisis de correlación utilizando los datos metabólicos y sensoriales coincidentes de las cosechas de tomates 2009, 2010 y 2012. El análisis fue realizado utilizando el coeficiente de Spearman con un nivel de significancia de 0,05. Los datos sensoriales fueron reducidos a tres categorías por variable para simplificar los

análisis. A modo de ejemplo con el Olor se presenta la reducción de categorías sensoriales utilizada. Inicialmente se promedió la frecuencia de las dos categorías máximas (Olor Característico-5 y Olor Característico-4) y mínimas (Olor Característico-1 y Olor Característico-2) para constituir las categorías Olor-5 y Olor-1. Estas nuevas categorías reflejan el olor característico y olor no característico determinado por los jueces sensoriales. El valor de la frecuencia de Olor Característico-3 se transformó en la nueva categoría Olor-3 denotando la calidad intermedia de la misma variable sensorial.

El mismo tratamiento de variables y datos se realizó con olor característico, sabor característico, dulzura y acidez. En la Tabla 1 se enumeran las nuevas categorías sensoriales.

Tabla 1. Variables Sensoriales del Análisis de Correlación Global.

Nº	Nombre	Código	Nº	Nombre	Código
1	Olor No Característico	Olor-1	7	Dulzura Baja	Dulz-1
2	Olor Característico Medio	Olor-3	8	Dulzura Media	Dulz-3
3	Olor Característico	Olor-5	9	Dulzura Alta	Dulz-5
4	Sabor No Característico	Sabor-1	10	Acidez Baja	Acid-5
5	Sabor Característico Medio	Sabor-3	11	Acidez Media	Acid-3
6	Sabor Característico	Sabor-5	12	Acidez Alta	Acid-1

Los datos de COVs fueron clasificados de acuerdo a su origen metabólico y al grupo funcional presente en su estructura molecular. Las categorías de origen metabólico fueron: ácidos grasos (AG), aminoácidos (AA), terpenos (TER) y carotenoides (CAR). En cuanto a la clasificación según los grupos funcionales las categorías fueron: aldehídos (ALD), alcoholes (ALC), cetonas (CET), ésteres (EST), hidrocarburos (HIDR), furanos (FUR), nitrocompuestos (NITR), tiazoles (TIAZ), epóxidos (EPOX) y para los compuestos difuncionales éter-alcohol (ET-ALC) y éster-alcohol (EST-ALC)^[9].

Las variables metabólicas consideradas en los análisis de correlación fueron las mediciones que presentaron niveles mayores al límite de detección de la técnica en todas las cosechas. Además las señales no identificadas (UNK) no fueron consideradas para este análisis. En forma global se consideraron 47 variables metabólicas expresadas como composición porcentual (porcentaje de área respecto del área total integrada del cromatograma) y 12 categorías organolépticas provenientes de las 4 variables sensoriales.

En la Tabla 2 se enumeran las variables metabólicas y su correspondiente clasificación por origen metabólico y por grupo funcional.

Tabla 2. Clasificación de variables metabólicas.

Nº	Nombre	Nombre Corto	Código	Origen Metabólico	Grupo Funcional
1	3-metilbutanal	3mBUTAL	M3	Aminoácidos	Aldehído
2	1-penten-3-ona	1PENT3ONA	M4	Ácidos Grasos	Cetona
3	2-etil-furano	2eFURAN	M5	Ácidos Grasos	Furano
4	metil butanoato	mBUTNATO	M6	Ácidos Grasos	Éster
5	3-metil-1-butanol	3mBUTOL	M7	Aminoácidos	Alcohol
6	4-pental	4PENTENAL	M10	Ácidos Grasos	Aldehído
7	tolueno	TOLUEN	M11	Aminoácidos	Hidrocarburo
8	<i>cis</i> -3-hexenal	C3HEXENAL	M12	Ácidos Grasos	Aldehído
9	hexanal	HEXANAL	M13	Ácidos Grasos	Aldehído
10	<i>cis</i> -2-hexenal	C2HEXENAL	M14	Ácidos Grasos	Aldehído
11	<i>trans</i> -2-hexenal	T2HEXENAL	M15	Ácidos Grasos	Aldehído
12	heptanal	HEPTANAL	M16	Ácidos Grasos	Aldehído
13	nitropentano	NITRPENTAN	M17	Aminoácidos	Nitrocompuesto
14	<i>a</i> -pineno	aPINENE	M18	Terpenoides	Hidrocarburo
15	<i>trans</i> -2-heptenal	2HEPTENAL	M24	Ácidos Grasos	Aldehído
16	óxido geránico	OXGERAN	M25	Terpenoides	Epóxido
17	limoneno	LIMONEN	M35	Terpenoides	Hidrocarburo
18	2-etil-1-hexanol	2eHEXANOL	M36	Ácidos Grasos	Alcohol
19	2-isobutiltiazol	2ISBUTIAZOL	M37	Aminoácidos	Tiazol
20	2-octenal	2OCTENAL	M38	Ácidos Grasos	Aldehído
21	<i>cis</i> -linalil óxido	LINALOXcis	M40	Terpenoides	Alcohol
22	terpinoleno	TERPINOLEN	M41	Terpenoides	Hidrocarburos
23	<i>trans</i> -linalil óxido	LINALOXtrans	M42	Terpenoides	Alcohol
24	guayacol	GUAYACOL	M45	Aminoácidos	Éter-Alcohol
25	2-nonen-1-ol	2NONENOL	M47	Ácidos Grasos	Alcohol
26	alcanfor	ALCANFOR	M51	Terpenoides	Cetona
27	3-metilheptil acetato	3mHepACET	M52	Ácidos Grasos	Éster
28	DMHEX	DMHEX	M57	Terpenoides	Furano
29	α -terpineol	aTERPOL	M58	Terpenoides	Alcohol
30	salicilato de metilo	SALICMET	M60	Aminoácidos	Éter-Alcohol
31	<i>p</i> -ment-1-en-9-al	PMENT9AL	M62	Terpenoides	Aldehído
32	dimetilbenzaldehído	dmBENZALDEH	M63	Aminoácidos	Aldehído
33	α -citral	aCITRAL	M69	Carotenoides	Aldehído
34	2-undecanona	2UNDECONA	M70	Ácidos Grasos	Cetona
35	(3E)-4-metil-3-hepten-2-ona	4m3HEPTONA	M75	Ácidos Grasos	Cetona
36	eugenol	EUGENOL	M77	Aminoácidos	Éter-Alcohol
37	β -damascenona	bDAMASC	M80	Carotenoides	Cetona
38	2-metil-2-octen-4-ona	2m2OCTNONA	M81	Ácidos Grasos	Cetona
39	verdil acetato	VERDILACET	M83	Terpenoides	Éster
40	geranil acetona	GEACETON	M85	Carotenoides	Cetona
41	lilial	LILIAL	M87	Terpenoides	Aldehído
42	β -ionona	bIONON	M89	Carotenoides	Cetona
43	β -ionona epóxido	bIONONEPOX	M90	Carotenoides	Cetona
44	2-dodecanona	2DODECONA	M91	Ácidos Grasos	Cetona
45	β -metil ionona	bmIONONA	M98	Carotenoides	Cetona
46	benzofenona	BENZFENON	M99	Aminoácidos	Cetona
47	α -hexilcinamaldehído	aHEXCINAMAL	M101	Aminoácidos	Aldehído

Inicialmente se realizó un análisis de correlación entre las variables sensoriales para observar la relación existente entre las distintas variables y categorías más cercanas al aroma y sabor del fruto del tomate. Las tablas de coeficientes de correlación y probabilidades de todos los análisis realizados se encuentran en el Anexo Digital Análisis Global. En la Figura 1, se grafican los coeficientes de correlación de las variables sensoriales.

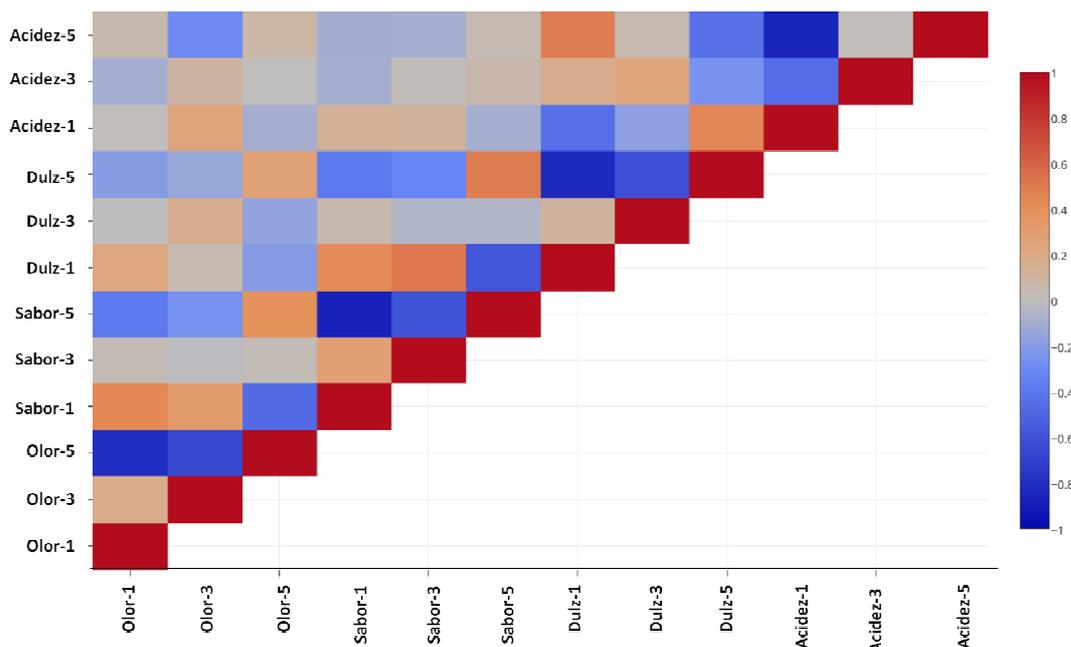


Figura 1. Gráfico de coeficientes de correlación de las variables sensoriales.

A partir de la Figura 1, puede observarse en forma global una mayor abundancia de correlaciones negativas (color azul) respecto de las positivas (color rojo) entre las variables sensoriales. A su vez las correlaciones que presentaron mayor fuerza de asociación fueron las de signo negativo. Entre los casos más importantes puede nombrarse, como es esperado, las asociaciones entre las máximas y mínimas categorías de cada variable sensorial, como por ejemplo Acidez-5 y Acidez-1, Dulzura-5 y Dulzura-1, Sabor-5 y Sabor-1 y Olor-5 y Olor-1. A su vez, también se observaron correlaciones con significancia estadística entre variables sensoriales distintas. A continuación se exponen en mayor detalle estos resultados.

En la Figura 2 se grafican en mayor detalle las correlaciones estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre pares de variable sensoriales en una escala de coeficientes de correlación de -1 (correlación negativa: azul) a 1 (correlación positiva: rojo). El color negro indica una asociación no significativa ($p > 0,05$) que no fue considerada en las gráficas siguientes. En estas figuras se destacan el olor, sabor, dulzura y acidez.

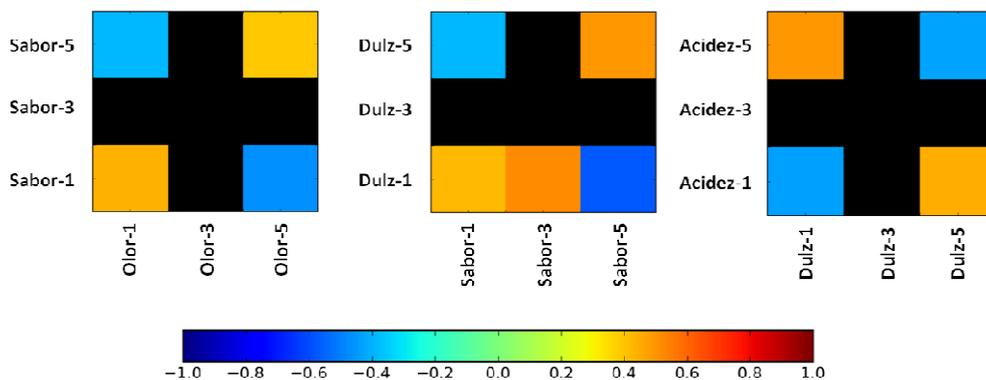


Figura 2. Gráfico de coeficientes de correlación con $p < 0,05$ de variables sensoriales.

Los resultados de las correlaciones demostraron una covariación en forma positiva (color naranja) entre el olor y sabor en su mínima calidad como así también en su máxima categoría, indicando que en general los frutos calificados como buenos o malos en el olor también fueron definidos de igual forma en el sabor. Este resultado refuerza la importante conexión entre estas variables y su contribución en la apreciación de la calidad organoléptica del fruto de tomate. También puede destacarse la relación entre la dulzura y el sabor con distintas correlaciones significativas. Sobre estas variables puede observarse una dependencia entre las mismas, donde el incremento en la dulzura produce un aumento en la aceptabilidad del fruto medida a través de su sabor^[9, 10]. Por último, puede observarse una relación entre la acidez y la dulzura del fruto. A partir de las gráficas puede observarse la correlación positiva entre el aumento de la acidez (Acidez-1, categoría menos aceptada) con el incremento de la dulzura y viceversa^[11]. Este comportamiento expuso que el aumento en la sensación de acidez del fruto presentó una mayor valoración de la dulzura por parte de los jueces sensoriales de las diferentes cosechas ensayadas.

Análisis de Correlación por Origen Metabólico

Una vez determinadas las relaciones entre las características sensoriales de los frutos se realizó un análisis similar considerando el origen biosintético de los metabolitos volátiles. Se utilizaron los cuatro orígenes metabólicos descriptos anteriormente y además relaciones entre los grupos metabólicos, como por ejemplo ácidos grasos/aminoácidos (AG/AA).

En la Figura 3 se ejemplifica en detalle la sección de asociaciones entre los grupos metabólicos y las variables sensoriales.

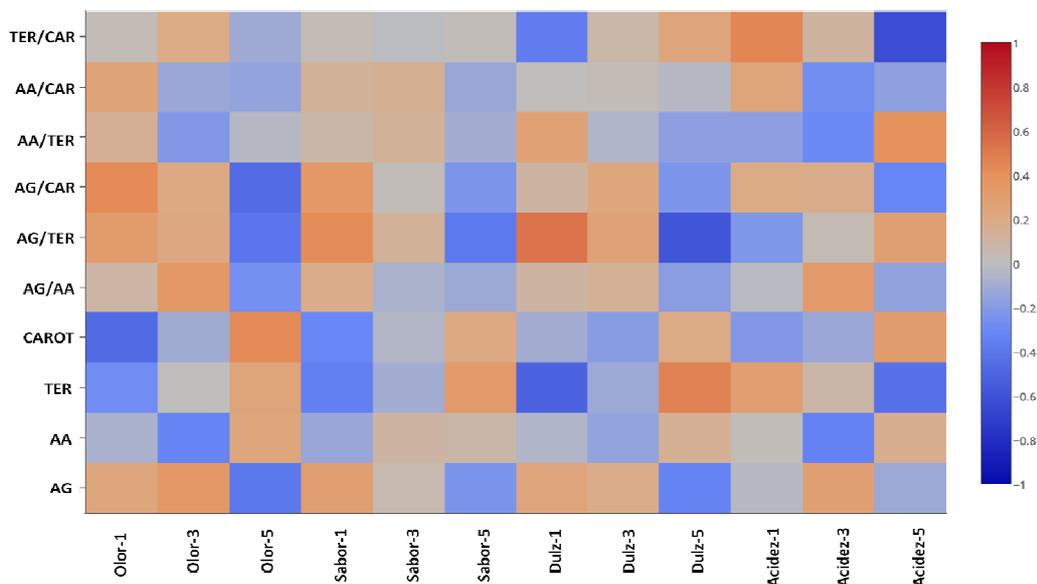


Figura 3. Detalle de gráfico de coeficientes de correlación de los grupos metabólicos y variables sensoriales.

La porción graficada permite observar que las correlaciones entre los grupos de variables clasificadas por su origen y las características sensoriales presentaron en general asociaciones débiles. Sin embargo, a pesar de expresar una fuerza moderada en la asociación fue posible identificar covariaciones estadísticamente significativas. El gráfico que representa el análisis completo se encuentra en el Anexo Digital Análisis de Correlación.

Entre las asociaciones que tuvieron correlaciones significativas pueden nombrarse a los ácidos grasos y carotenoides con el olor y los terpenoides con el sabor, dulzura y acidez. A su vez, puede destacarse también la falta de correlaciones significativas entre las variables sensoriales y los derivados de aminoácidos.

En la Figura 4 se detallan las correlaciones significativas mencionadas entre las variables sensoriales y familias metabólicas.

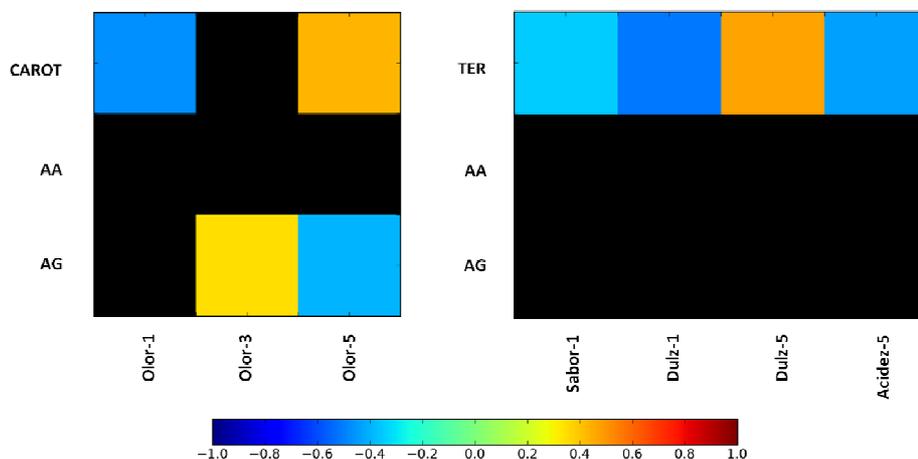


Figura 4. Detalle de correlaciones significativas entre familias metabólicas y variables sensoriales.

Las relaciones señaladas en el análisis demostraron que los derivados de ácidos grasos y carotenoides presentaron una gran influencia sobre el olor del fruto. Los ácidos grasos presentaron una correlación negativa con el desarrollo del olor característico exponiendo el impacto negativo de estos compuestos sobre el aroma. Por otro lado los derivados de carotenoides presentaron una asociación positiva con el olor. La mayor expresión de estos derivados correlacionó con el incremento de la apreciación sensorial del olor característico.

En cuanto al grupo de los terpenoides, estos derivados presentaron una relación positiva con el sabor y la dulzura, indicando que su presencia impacta positivamente en la apreciación de estas variables. Contrariamente, en el caso de la acidez, los terpenos presentaron una correlación negativa con esta variable. Por otro lado, los compuestos derivados de aminoácidos presentaron correlaciones positivas con las cuatro variables sensoriales, pero ninguna de ellas fue estadísticamente significativa.

Respecto de las relaciones entre los grupos metabólicos, los cocientes que contenían ácidos grasos, AG/TER y AG/CAR, presentaron correlaciones significativas de signo negativo con el olor y sabor característico. Sobre la dulzura se observó que las

relaciones AG/TER y TER/CAR presentaron correlaciones significativas negativas y positivas respectivamente con este importante atributo sensorial. Por último sobre la acidez del fruto pudo observarse que TER/CAR, AA/CAR y AG/CAR presentaron conjuntamente relaciones negativas con esta variable en su categoría más aceptada. Sin embargo, sólo TER/CAR presentó una correlación estadísticamente significativa.

En forma sintética, la información comentada en este último párrafo permite deducir que una mayor expresión de ácidos grasos a expensas de terpenos o carotenoides produce una reducción en la aceptación del olor y sabor del fruto. La dulzura presentó sensibilidad al contenido de terpenos, un incremento en estos derivados produce un fruto con mayor carácter dulce.

En el caso de la acidez, la disminución en la expresión de derivados de carotenoides presentó una relación que promueve el mayor carácter ácido en los frutos degustados. Un caso similar fue reportado utilizando frutos de tomate mutantes con un perfil deficiente de carotenoides, estos frutos presentaron una correlación significativa con una disminución de la dulzura cuando estos metabolitos volátiles eran expresados en baja proporción. Este estudio sugiere que existe una compleja interacción entre COVs, azúcares y ácidos que aun no puede ser explicada en su totalidad^[12].

Análisis de Correlación por Grupo Funcional

Posteriormente al estudio según el origen metabólico de los COVs se realizó un análisis de correlación utilizando los datos sensoriales y metabólicos clasificados de acuerdo al grupo funcional presente en la estructura molecular. En este análisis pudo observarse que los mayores coeficientes de correlación (en valor absoluto) se obtuvieron sobre las relaciones de grupos funcionales, como por ejemplo entre aldehídos/alcoholes y alcoholes (ALD/ALC y ALC), cetonas/hidrocarburos y alcoholes/hidrocarburos (CET/HIDR y ALC/HIDR).

Las relaciones de mayor interés en este estudio demarcaron que entre las variables sensoriales y los grupos funcionales se obtuvieron coeficientes de correlación estadísticamente significativos. En la Figura 5 se grafican en forma ampliada los coeficientes de correlación de la sección específica que incluye los grupos funcionales y las variables sensoriales de mayor interés. El gráfico completo del análisis de correlación se encuentra en la Figura 2 del Anexo Digital Análisis de Correlación.

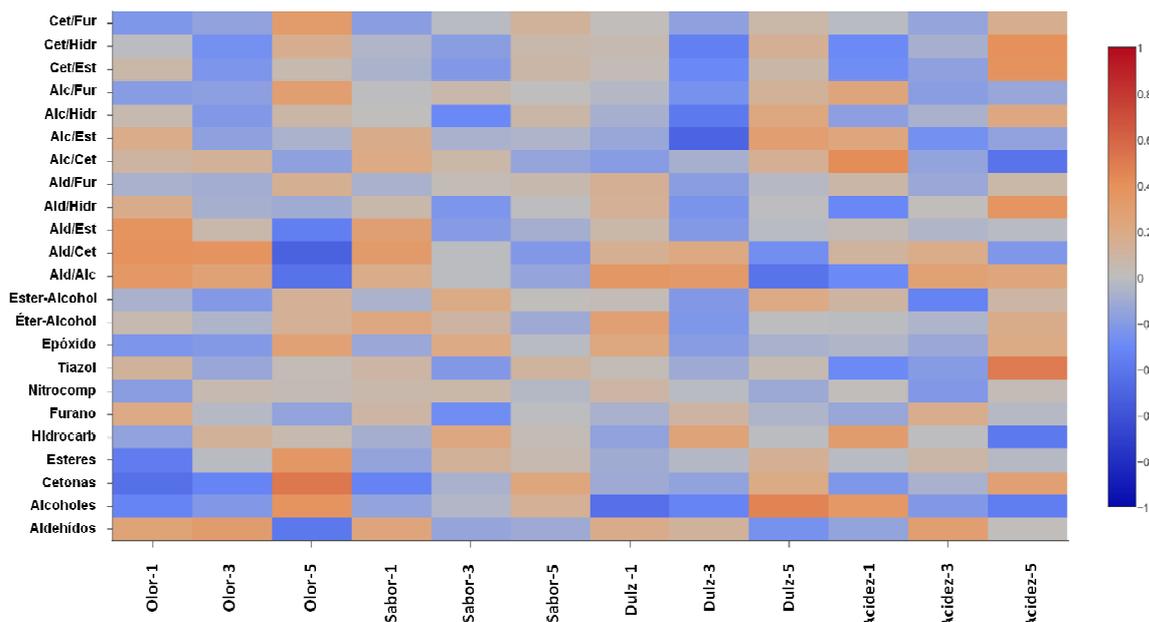
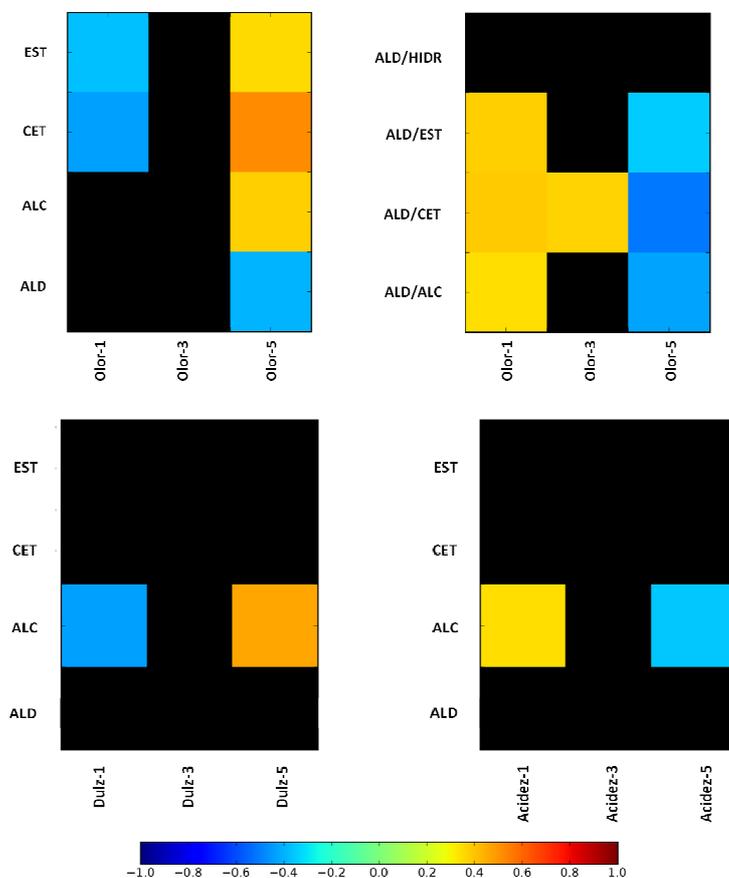


Figura 5. Detalle de gráfico de coeficientes de correlación de los grupos funcionales y variables sensoriales.

A partir de la figura anterior pueden destacarse las asociaciones que presentaron niveles significativos de correlación involucrando los grupos funcionales más abundantes en el metabolismo del fruto del tomate. Estas relaciones se exponen en las Figuras 6 y 7.



Figuras 6 y 7. Detalle de correlaciones significativas entre grupos funcionales y variables sensoriales.

Las correlaciones significativas indicaron que el olor se asoció a diferentes grupos funcionales y relaciones observándose correlaciones positivas y negativas. Los aldehídos se correlacionaron en forma negativa con el olor en su máxima categoría, pero los alcoholes, cetonas y ésteres se asociaron en forma positiva con su categoría más apreciada^[11]. A su vez, esta variable sensorial en su categoría más baja también se asoció en forma negativa con las cetonas y ésteres. Debe remarcarse también que las relaciones entre grupos funcionales que incluyeron a los aldehídos también presentaron asociaciones con el olor en sus categorías máximas y mínimas. Estas relaciones conteniendo aldehídos con alcoholes, cetonas y ésteres (ALD/ALC, ALD/CET y ALD/EST) presentaron asociaciones positivas con el Olor-1 (poco característico) y asociaciones negativas con el Olor-5, la categoría más apreciada. Estas asociaciones advierten que a medida que la relación entre aldehídos y otros grupos funcionales (ALD/Gr. Funcional) aumenta, el olor característico tiende a disminuir. El aumento de dicha relación puede producirse por un incremento en la producción de aldehídos en el fruto o por una reducción significativa de COVs que contienen alcoholes, cetonas o ésteres en su estructura molecular.

Otras asociaciones que presentaron significancia involucraron el grupo de los alcoholes. Por un lado se observó una relación directa con la dulzura. El incremento de los derivados alcohólicos correlacionó positivamente con la máxima Dulzura y negativamente con la categoría más baja (Dulz-1). Sobre la acidez se observó una asociación positiva con Acidez-1 y una relación negativa con Acidez-5. Esto permite determinar que una mayor abundancia en la expresión de los alcoholes favorecería el incremento de la acidez en el fruto del tomate.

Los resultados demostraron que los metabolitos volátiles conteniendo el grupo funcional aldehído presentan una gran influencia sobre el desarrollo del olor del fruto. En contraparte, los alcoholes presentes en el perfil volátil de los frutos demostraron poseer incidencia sobre el olor característico, la dulzura y la acidez.

Sobre el sabor del fruto no se observaron correlaciones estadísticamente significativas para ningún grupo funcional. Sin embargo, se observó una leve tendencia de los alcoholes, cetonas, ésteres e hidrocarburos a relacionarse en forma positiva con el aumento del sabor característico. En cambio los aldehídos demostraron un leve tendencia pero de signo contrario con el sabor.

En resumen a medida que el fruto expresa mayor cantidad de derivados volátiles aldehídicos la aceptación del olor comienza a disminuir, sin embargo un aumento en el contenido de alcoholes tendrá un efecto positivo en el incremento del olor característico. También un incremento en los alcoholes favorecería la percepción de dulzura y acidez en el fruto.

Análisis de Correlación Mixto

Además de las correlaciones estudiadas, se realizaron otros análisis de correlación basados en los resultados obtenidos. Debido a que determinados grupos funcionales que

presentaron incidencia sobre la calidad organoléptica provienen en su gran mayoría de un origen metabólico definido se realizaron estudios para corroborar la relación entre estos grupos funcionales y la ruta metabólica de la cual pertenecen.

Teniendo en cuenta el perfil de COVs, las distintas vías metabólicas y los grupos funcionales (Tabla 2) puede observarse que los metabolitos que contienen el grupo aldehído provienen en un 55 % de los ácidos grasos, 26 % de los aminoácidos, 13 % de los terpenoides y un 6 % de los carotenoides. Respecto de los COVs con el grupo alcohol un 47,3 % provienen de aminoácidos, 29 % de terpenos, 17,7 % de ácidos grasos y 6% de carotenoides. Por último las cetonas tienen origen en un 40 % a partir de los carotenoides, 30 % de los ácidos grasos y 15 % de aminoácidos y 15 % de terpenoides. En la Figura 8, se esquematizan los porcentajes de contribución metabólica a los grupos funcionales mencionados.

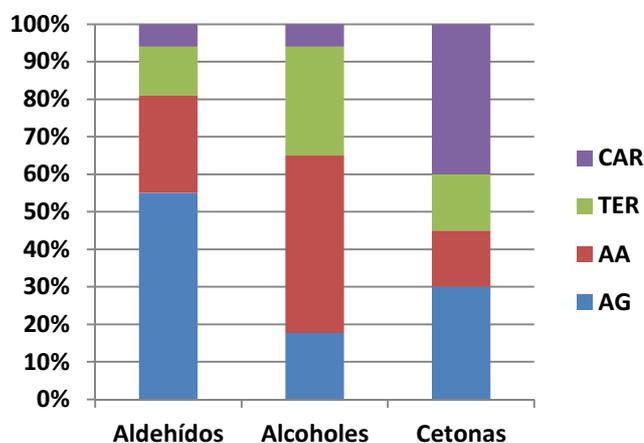


Figura 8. Contribución de los orígenes metabólicos a los grupos funcionales más abundantes.

A partir de esta información puede considerarse la influencia de los ácidos grasos (azul) en mayor medida sobre la expresión de los aldehídos, los aminoácidos (rojo) y los terpenoides (verde) sobre los alcoholes y los carotenoides (violeta) sobre las cetonas.

Precisamente sobre estas relaciones expuestas, se realizaron análisis de correlación entre las variables sensoriales y los grupos funcionales pero discriminando su origen metabólico. En este caso las variables metabólicas se redujeron, en base a las correlaciones significativas encontradas anteriormente, a aldehídos, alcoholes y cetonas provenientes de ácidos grasos, aminoácidos, terpenos y carotenoides, mientras que los ésteres se clasificaron como derivados de ácidos grasos y terpenos.

En la Tabla 3 se enumeran las nuevas variables mencionadas.

Tabla 3. Grupos funcionales discriminados según su origen metabólico.

Grupo Funcional	Origen	Código
Aldehídos	Ácidos Grasos	ALD-AG
Aldehídos	Aminoácidos	ALD-AA
Aldehídos	Terpenos	ALD-TER
Aldehídos	Carotenoides	ALD-CAR
Alcoholes	Ácidos Grasos	ALC-AG
Alcoholes	Aminoácidos	ALC-AA
Alcoholes	Terpenos	ALC-TER
Cetonas	Ácidos Grasos	CET-AG
Cetonas	Aminoácidos	CET-AA
Cetonas	Terpenos	CET-TER
Cetonas	Carotenoides	CET-CAR
Ésteres	Ácidos Grasos	EST-AG
Ésteres	Terpenos	EST-TER

El resultado del análisis se grafica en la Figura 9. En él, se detalla la región que involucra las correlaciones entre los grupos funcionales clasificados según su ruta metabólica y las variables sensoriales.

Las correlaciones significativas que se observaron permitieron discriminar en forma más específica cuales grupos de metabolitos demuestran su influencia sobre los distintos atributos sensoriales estudiados durante las cosechas de tomate.

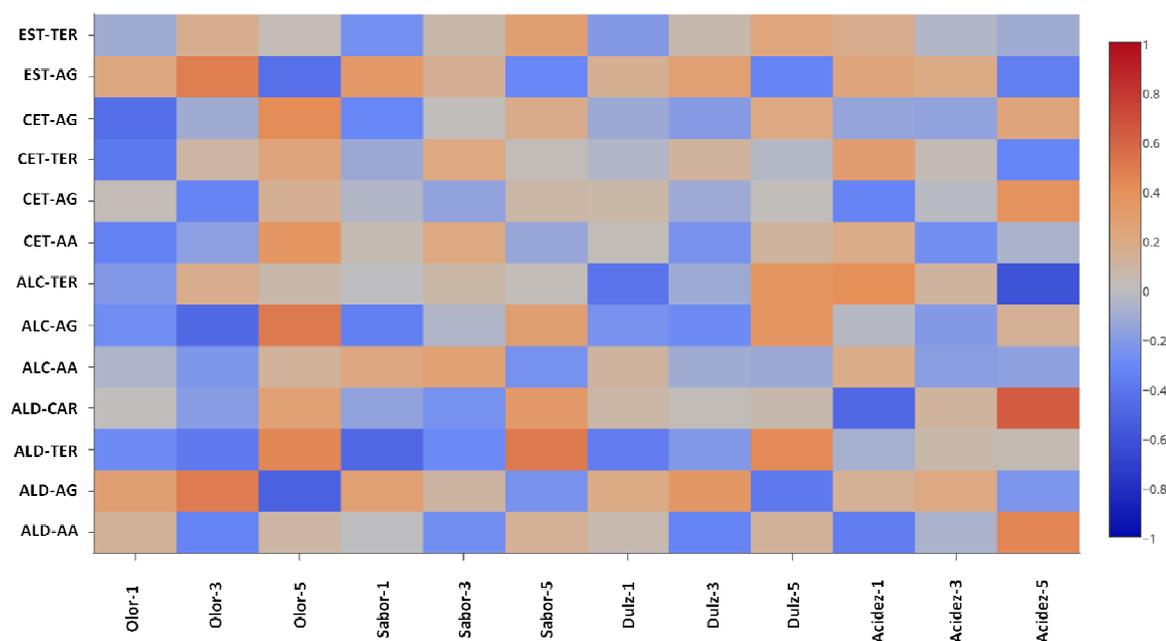


Figura 9. Detalle del gráfico de coeficientes de correlación de los grupos funcionales discriminados por su origen metabólico y las variables sensoriales.

Para simplificar la exposición de los resultados se graficó selectivamente las variables sensoriales y los grupos funcionales de diferente origen metabólico. En la Figura 10 se exponen los coeficientes de correlación estadísticamente significativos para los aldehídos de diferente origen metabólico.

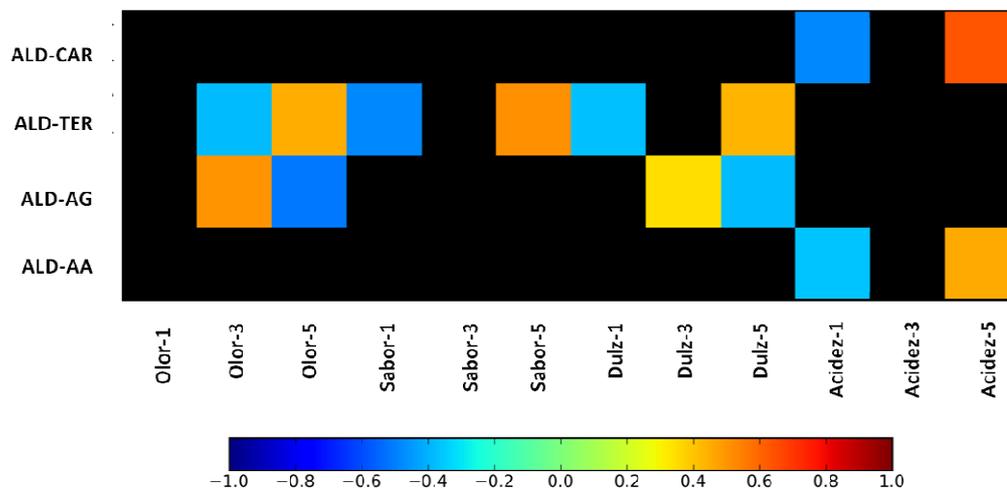


Figura 10. Detalle de correlaciones significativas entre los aldehídos de diferente origen metabólico y las variables sensoriales

Sobre los aldehídos pudo observarse que los metabolitos volátiles conteniendo este grupo funcional provenientes de ácidos grasos y terpenos presentaron correlaciones significativas con el olor característico y la dulzura. En el caso de los derivados de ácidos grasos las correlaciones fueron negativas y los derivados de terpenos presentaron relaciones positivas con el olor característico y la dulzura del fruto. Debe considerarse en este caso los porcentajes que aportan estas rutas metabólicas a los compuestos volátiles de este tipo. Como fue descrito en la Figura 8, los ácidos grasos fueron los contribuyentes mayoritarios de los aldehídos volátiles. Esto sugiere que la relación entre el aumento de los aldehídos y la disminución de la dulzura y el olor característico está dominada mayoritariamente por la expresión de los aldehídos volátiles derivados de los ácidos grasos.

Los aldehídos provenientes de terpenos fueron los únicos que presentaron correlaciones significativas con el sabor característico. La correlación expuesta tiene un carácter positivo demostrando que a medida que estos COVs derivados de terpenos aumentan favorece el desarrollo del sabor en el fruto.

La acidez expuso correlaciones significativas con los aldehídos derivados de aminoácidos y carotenoides. Estos presentaron una correlación positiva con la acidez en su categoría más aceptada, es decir que un aumento en los aldehídos derivados de estas rutas metabólicas favorece el desarrollo de una acidez aceptable para el consumo en los frutos de tomate.

Debe destacarse también en este análisis, la falta de correlación significativa entre los aldehídos derivados de aminoácidos y carotenoides con el olor y sabor característico. Como fue descrito en capítulos previos, estas vías metabólicas aportan importantes COVs, incluso algunos considerados como metabolitos volátiles de impacto, relacionados al desarrollo del aroma característico del fruto del tomate.

En la Figura 11 se detallan las correlaciones significativas entre los alcoholes y ésteres de diferente origen metabólico y las variables sensoriales.

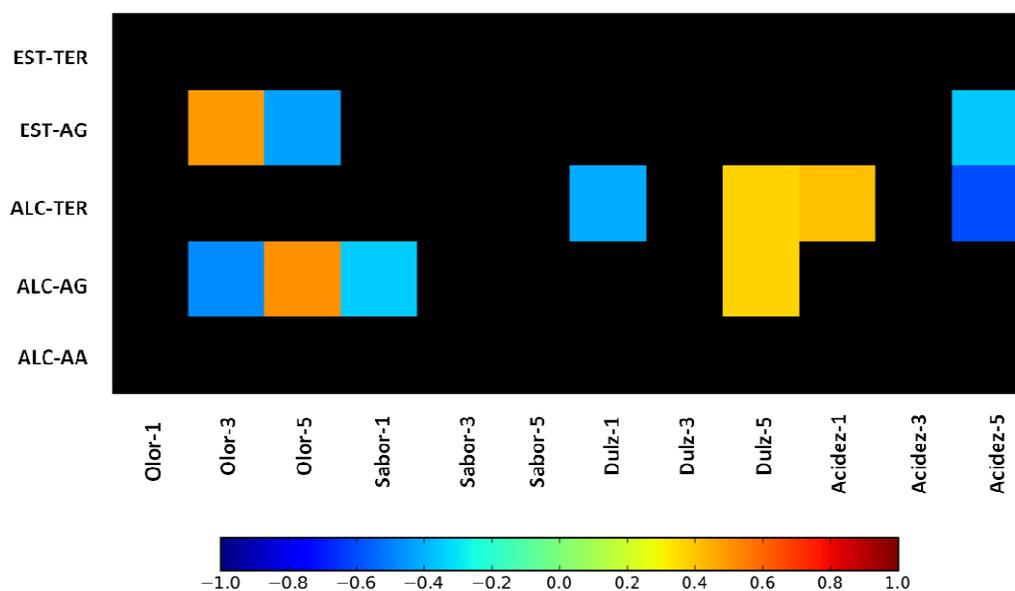


Figura 11. Detalle de correlaciones significativas entre los alcoholes y ésteres de diferente origen metabólico y las variables sensoriales

En esta gráfica puede observarse que sólo los derivados de ácidos grasos presentaron correlaciones significativas con el olor característico. En este caso, los alcoholes provenientes de este grupo metabólico presentaron una correlación positiva, mientras que los ésteres de ácidos grasos tuvieron un comportamiento invertido correlacionando en forma negativa con el olor característico.

Para el sabor en su categoría más baja se observó una correlación negativa con los alcoholes de ácidos grasos, si bien la única correlación significativa fue la mencionada, la tendencia sugiere que estos metabolitos favorecerían la aparición de buenas características medidas a través del sabor del fruto (Figura 9).

La dulzura presentó niveles significativos de correlación positiva con los alcoholes derivados de ácidos grasos y terpenos, en ambos casos estos derivados volátiles promueven el desarrollo de un sabor apreciado en los frutos que los contienen en mayor proporción.

Por último los ésteres de ácidos grasos y los alcoholes de terpenos demostraron una correlación negativa con la acidez. Una mayor expresión de estos COVs tiende a favorecer un aumento en la acidez del fruto disminuyendo su aceptación por los consumidores habituales.

Un dato relevante merece comentarse de este análisis realizado. Es necesario remarcar que a pesar del elevado porcentaje de contribución de los aminoácidos en los derivados alcohólicos (47,3 %) estos no presentaron ningún tipo de correlación significativa con las variables sensoriales estudiadas.

En la Figura 12 se detallan las correlaciones significativas entre las cetonas de diferente origen metabólico y las variables sensoriales.

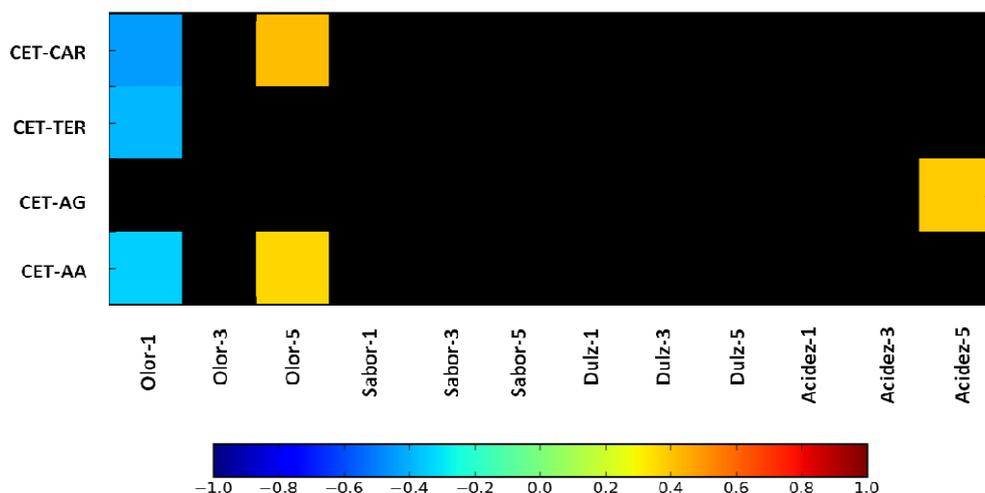


Figura 12. Detalle de correlaciones significativas entre las cetonas de diferente origen metabólico y las variables sensoriales

En este caso pudo observarse que las cetonas derivadas de aminoácidos y carotenoides presentaron correlaciones positivas con significancia estadística con el olor característico. Por otro lado las cetonas derivadas de ácidos grasos presentaron una relación significativa con la acidez del fruto. Las cetonas provenientes de terpenos presentaron correlación significativa de signo negativo con el olor en su mínima categoría. Sin embargo, a pesar de no exponer una relación con significancia estadística presentó una leve tendencia a correlacionarse en forma positiva con el Olor-3 y Olor-5 (Figura 9).

En forma general las cetonas derivadas de todos los orígenes metabólicos presentaron correlaciones significativas o tendencias a favorecer el desarrollo de características apreciadas en el olor y la acidez del fruto. Debe tenerse presente la contribución mayoritaria de los carotenoides en las cetonas volátiles del perfil de COVs de los frutos ensayados. Individualmente los carotenoides y las cetonas (Figura 4 y 6) presentaron la misma tendencia positiva a correlacionarse con las características sensoriales más apreciadas en el fruto.

Las correlaciones anteriores resaltaron que para el olor característico los aldehídos y alcoholes de ácidos grasos, aldehídos de terpenos, cetonas de carotenoides, aminoácidos y terpenos presentaron asociaciones estadísticamente significativas. En el caso del sabor característico sólo los aldehídos de terpenos y alcoholes de ácidos grasos presentaron relaciones consistentes.

Las variables metabólicas, con la combinación de un origen metabólico y grupo funcional definido, que presentaron correlación significativa con el olor o sabor característico coinciden con numerosos COVs del análisis. La serie de metabolitos considerados se presenta en la Tabla 4.

Tabla 4. COVs con los requisitos de grupo funcional y origen metabólico descriptos que presentaron correlación con el olor y sabor característico.

Olor Característico			Sabor Característico		
Código	Nombre	Grupo-Origen	Código	Nombre	Grupo-Origen
M10	4-pentenal	ALD-AG	M87	lilial	ALD-TER
M12	<i>cis</i> -3-hexenal	ALD-AG	M36	2-etil-1-hexanol	ALC-AG
M13	hexanal	ALD-AG	M47	2-nonen-1-ol	ALC-AG
M14	<i>cis</i> -2-hexenal	ALD-AG			
M15	<i>trans</i> -2-hexenal	ALD-AG			
M16	heptanal	ALD-AG			
M24	<i>trans</i> -2-heptenal	ALD-AG			
M38	2-octenal	ALD-AG			
M62	<i>p</i> -ment-1-en-9-al	ALD-TER			
M87	lilial	ALD-TER			
M36	2-etil-1-hexanol	ALC-AG			
M47	2-nonen-1-ol	ALC-AG			
M80	β -damascenona	CET-CAR			
M85	geranil acetona	CET-CAR			
M89	β -ionona	CET-CAR			
M90	β -ionona epóxido	CET-CAR			
M98	β -metil ionona	CET-CAR			
M6	metil butanoato	EST-AG			
M99	benzofenona	CET-AA			

A partir de los metabolitos presentados en la Tabla 4, puede observarse que todos ellos fueron asociados con el olor y/o el sabor característico en al menos una cosecha en los diferentes análisis multivariados (Capítulo 5). La congruencia de los candidatos surgidos desde esta estrategia de análisis y los metabolitos identificados por ACP-ARNeu, demostró que abordando distintos tratamientos de los datos metabólicos fue posible caracterizar una serie de COVs que presentaron una estrecha relación con el olor y sabor característico del fruto del tomate.

La comparación de los resultados de los análisis multivariados permitió observar también que en las diferentes cosechas estudiadas distintos metabolitos, con idéntico origen metabólico y grupo funcional, se asociaron a las variables sensoriales de interés. En otras palabras, los metabolitos correlacionados pueden cambiar entre las cosechas, sin embargo, prevalecen el origen y grupo funcional de los COVs asociados al olor y sabor característico. Por ejemplo, *cis*-3-hexenal se agrupó al olor característico en las 3 cosechas analizadas, pero otros COVs similares conteniendo la función aldehídica se asociaron selectivamente a una u otra cosecha. Pueden mencionarse a hexanal, *trans*-2-hexenal y *cis*-2-hexenal asociados a la cosecha 2010, heptanal a la cosecha 2009 y 2-octenal a las cosechas 2009-2012. Con otro grupo de metabolitos, como los derivados carotenoides con un grupo carbonilo, pudo observarse un patrón de asociación similar. Los COVs β -damascenona y β -ionona epóxido se asociaron al sabor característico en las cosechas 2009-2010 y geranil acetona a las cosechas 2009-2012.

El seguimiento de los diferentes metabolitos asociados permitió inferir que la expresión de un patrón de compuestos volátiles con características definidas, metabólicas y estructurales, se encuentra presente consistentemente en las diferentes variedades de tomates que se clasificaron como las más aceptadas en base a su olor y sabor en las cosechas estudiadas.

Si bien puede ocurrir un cambio en el aporte de los matices sensoriales de los diferentes COVs asociados que alternan entre las cosechas, la característica sensorial general de un grupo de metabolitos con un origen metabólico y grupo funcional común, se mantiene constante. Los aldehídos de cadena corta, provenientes de ácidos grasos, *cis*-3-hexenal, hexanal, 4-pentenal, *cis*-2-hexenal, *trans*-2-hexenal, heptanal, *trans*-2-heptenal y 2-octenal presentan notas sensoriales similares de tipo herbáceo, fresco, verde y tomate inmaduro. Los derivados de carotenoides β -damascenona, β -ionona, β -ionona epóxido, β -metil ionona y geranil acetona presentan notas de tipo frutal, tropical, dulce y floral. De esta manera, a partir de los datos obtenidos puede decirse que diferentes familias de COVs pueden otorgar a los frutos de tomate estudiados, características sensoriales específicas de la familia metabólica, con uno u otro metabolito de origen y función química similar.

En términos generales, se observó que la expresión de COVs con determinados orígenes y estructuras químicas asociados al olor y sabor presentó una gran consistencia y pudieron reconocerse diferentes metabolitos pertenecientes a una misma familia metabólica con impacto sobre las variables de interés en las distintas cosechas de tomate.

Por último, debe tenerse en cuenta que el olor y sabor de este fruto está constituido por una compleja interacción de compuestos químicos volátiles y no volátiles que resultan en diversas respuestas fisiológicas que se unifican con un resultado sin ambigüedad: agradable o desagradable. El estudio llevado a cabo en este trabajo de investigación ha tratado de descifrar, en mayor énfasis sobre la porción volátil, las interrelaciones de los compuestos volátiles con el desarrollo del olor y sabor característico de esta importante especie comestible.

Conclusiones

La información obtenida utilizando los análisis de correlación permitió determinar asociaciones entre variables sensoriales, orígenes metabólicos y grupos funcionales de los metabolitos volátiles presentes en el perfil de COVs del fruto del tomate.

El análisis de correlación entre las variables sensoriales demostró asociación entre el olor y el sabor, como así también entre el sabor y la dulzura. Estas asociaciones revelaron que el incremento en alguna de estas características tiene un efecto que potencia en igual sentido la otra característica sensorial relacionada.

Las familias metabólicas que presentaron asociaciones significativas con el olor característico fueron los ácidos grasos en forma negativa y los carotenoides en forma positiva. En cuanto a la dulzura fueron los terpenoides los que presentaron una relación en forma positiva con esta importante variable sensorial.

Los grupos funcionales con mayor relevancia presentaron para el olor característico fueron los aldehídos en forma negativa, por el contrario las cetonas y

ésteres se correlacionaron en forma positiva. En cuanto a los alcoholes, estos demostraron su influencia con correlaciones positivas sobre el incremento del olor característico, la dulzura y la acidez.

El análisis de correlación entre las variables sensoriales y los COVs discriminados por el grupo funcional y origen metabólico presentó un mayor número de asociaciones que los análisis por origen metabólico o por grupo funcional en forma individual. Los aldehídos y ésteres provenientes de ácidos grasos se relacionaron en forma negativa con el olor y la dulzura, por el contrario los alcoholes de este mismo origen lo hicieron en forma positiva. Los aldehídos de terpenos mostraron relaciones positivas con el olor, sabor y dulzura, mientras que los alcoholes terpénicos sólo se relacionaron en forma positiva con la dulzura. Además, las cetonas volátiles de todos los orígenes metabólicos presentaron una tendencia a asociarse en forma positiva contribuyendo al olor característico del fruto.

Los COVs que presentaron las características de origen metabólico y grupo funcional ligados al olor y sabor incluyeron 20 metabolitos diferentes que coincidieron con los candidatos volátiles expuestos en el Capítulo V. Los metabolitos volátiles descritos, pertenecen a una familia metabólica definida con notas sensoriales comunes que se expresaron en los distintos frutos en forma alternada en las cosechas. Los diferentes grupos de COVs, a pesar de poseer ligeros cambios estructurales, tendrían la capacidad de aportar un impacto organoléptico específico, dependiente de la familia metabólica, a partir de diferentes metabolitos expresados en forma variable en los frutos de las distintas cosechas de tomate.

El estudio de los datos de COVs en base a la discriminación por origen metabólico y grupos funcionales propuesto en este trabajo de investigación, es una novedosa estrategia de análisis para correlacionar los metabolitos volátiles con las propiedades organolépticas del fruto del tomate. Los resultados presentados en este trabajo, no sólo aportan en el conocimiento de la química que influye en el olor del fruto de tomate, sino que contribuye a identificar las vías metabólicas y etapas de síntesis, por ejemplo incorporación de grupo funcionales, que dan origen a los COVs de impacto. Un importante desafío biotecnológico para los mejoradores de este cultivo es identificar los puntos metabólicos regulatorios que permitan incrementar o balancear los COVs que aportan en mayor proporción el buen aroma y sabor del fruto en detrimento de aquellos que influyen negativamente.

Referencias

- [1] **Abraham MH, Sanchez-Moreno R, Cometto-Muniz JE, Cain WS.** A Quantitative Structure–Activity Analysis on the Relative Sensitivity of the Olfactory and the Nasal Trigeminal Chemosensory Systems. *Chem. Senses*, 2007, 32:711-719.
- [2] **Persuy M-A, Sanz G, Tromelin A, Thomas-Danguin T, Gibrat J-F, Pajot-Augy E.** Mammalian Olfactory Receptors: Molecular Mechanisms of Odorant Detection, 3D-Modeling and Structure–Activity Relationships. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Edited by Conn MP. Amsterdam, Países Bajos: Elsevier; 2014
- [3] **Tan Y, Siebert KJ.** Quantitative Structure-Activity Relationship Modeling of Alcohol, Ester, Aldehyde and Ketone Flavor Thresholds in Beer from Molecular Features. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52:3057-3064.
- [4] **Wakabayashi M, Wakabayashi H, Nörenberg S, Kubotaa K, Engelt K-H.** Comparison of Odour Thresholds and Odour Qualities of the Enantiomers of 4-mercapto-2-alkanones and 4-acetylthio-2-alkanones. *Flavour Fragr. J.*, 2015, 30:171-178.
- [5] **Tieman DM, Bliss P, McIntyre LM, Blandon-Ubeda A, Bies D, Odabasi AZ, Rodriguez GR, van der Knaap E, Taylor MG, Goulet C, et al.** The Chemical Interactions Underlying Tomato Flavor Preferences. *Curr. Biol.*, 2012, 22:1035-1039.
- [6] **Zanor MI, Rambla J-L, Chaïb J, Steppa A, Medina A, Granell A, Fernie AR, Causse M.** Metabolic Characterization of Loci Affecting Sensory Attributes in Tomato Allows an Assessment of the Influence of the Levels of Primary Metabolites and Volatile Organic Contents. *J. Exp. Bot.*, 2009, 60:2139-2154.
- [7] **Carli P, Arima S, Fogliano V, Tardella L, Frusciante L, Ercolano MR.** Use of Network Analysis to Capture Key Traits Affecting Tomato Organoleptic Quality. *J. Exp. Bot.*, 2009, 60:3379-3386.
- [8] **Uarrota VG, Moresco R, Coelho B, Nunes EdC, Peruch LAM, Neubert EdO, Rocha M, Maraschin M.** Metabolomics Combined with Chemometric Tools (PCA, HCA, PLS-DA and SVM) for Screening Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) Roots during Postharvest Physiological Deterioration. *Food Chem.*, 2014, 161:67-78.
- [9] **Abegaz EG, Tandon KS, Scott JW, Baldwin EA, Shewfelt RL.** Partitioning Taste from Aromatic Flavor Notes of Fresh Tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill) to Develop Predictive Models as a Function of Volatile and Nonvolatile Components. *Postharvest Biol. Technol.*, 2004, 34:227-235.
- [10] **Baldwin EA, Goodner K, Plotto A.** Interaction of Volatiles, Sugars, and Acids on Perception of Tomato Aroma and Flavor Descriptors. *J. Food Sci.*, 2008, 73:S294-S307.
- [11] **Tandon KS, Baldwin EA, Scott JW, Shewfelt RL.** Linking Sensory Descriptors to Volatile and Nonvolatile Components of Fresh Tomato Flavor. *J. Food Sci.*, 2003, 68:2366-2371.
- [12] **Vogel JT, Tieman DM, Sims CA, Odabasi AZ, Clark DG, Klee HJ.** Carotenoid Content Impacts Flavor Acceptability in Tomato (*Solanum lycopersicum*). *J. Sci. Food Agric.*, 2010, 90:2233-2240.

Capítulo VII

Conclusiones Generales

Conclusiones Generales

En el transcurso de esta tesis se estudiaron diferentes aspectos ligados a los frutos del tomate, *S. lycopersicum*. Se abordaron estudios basados en la información sensorial como así también un análisis metabolómico de la porción volátil de variedades criollas, autóctonas del noroeste argentino, que conforman un banco de germoplasma nacional de esta importante especie agronómica.

El presente trabajo de investigación se focalizó en determinar compuestos orgánicos volátiles presentes en diferentes variedades *criollas* de tomate que tuvieran influencia en el desarrollo de las buenas características sensoriales del fruto. Las variedades estudiadas no habían sido caracterizadas metabólicamente, en su porción volátil, en anteriores estudios. Este trabajo de investigación conforma el primer reporte sobre el análisis de los compuestos orgánicos volátiles de frutos pertenecientes al banco de germoplasma nacional de la especie *S. lycopersicum*.

Inicialmente se desarrolló una metodología de trabajo que permitió extraer en forma sencilla una gran cantidad de metabolitos volátiles presentes en la compleja matriz de la muestra. El protocolo de trabajo establecido contempló las necesidades de conservación de las muestras, priorizando maximizar el enorme abanico de metabolitos volátiles extraíbles en las determinaciones analíticas. Además fue posible obtener un buen desempeño analítico optimizando todos los parámetros críticos de la extracción de forma tal que la variabilidad obtenida sea mínima.

El diseño experimental logrado permitió determinar 101 compuestos orgánicos volátiles, de diferente origen metabólico, presentes en 22 cultivares distribuidos en tres cosechas de tomate. Muchos de estos metabolitos fueron coincidentes con estudios previos, mientras que también fue posible identificar otros compuestos volátiles que no habían sido asociados hasta la fecha a los perfiles metabólicos de la especie. Entre ellos puede nombrarse a *p*-metoxitolueno, óxido geránico, 2-metil-3-fenil-1-propeno, 3-metilheptil acetato, DMHEX: 3,6-dimetil-2, 3, 3a, 4, 5, 7a-hexahidrobenzofurano, dimetil benzaldehído, 2-feniletil acetato, 2-undecanol, duraldehído, (3E)-4-metil-3-hepten-2-ona, TRIMCICL: (1E)-1-(3,5,5-trimetil-2-ciclohexen-1-ilideno)-2-propanona, 2-metil-2-octen-4-ona, verdil acetato, ar-himachalen-2-ol, salicilato de propilo, salicilato de isoamilo, β -metil ionona, benzofenona, 8-pentadecanona, α -hexil cinamaldehído.

Los frutos sometidos a los paneles de degustación en cada cosecha ofrecieron resultados que fueron analizados mediante técnicas de análisis multivariados. Estos resultados permitieron determinar de forma sencilla y gráfica cuales variedades presentaron los mejores y peores atributos sensoriales en cada una de las campañas de cosecha.

El análisis metabolómico de los frutos de tomate permitió diferenciar químicamente, en base al contenido de metabolitos volátiles, las distintas variedades de tomate incluidos dentro de cada cosecha. La clasificación química y sensorial de los cultivares de tomate presentaron, en forma general, una buena correlación.

El análisis basado en Redes Neuronales Artificiales permitió identificar una serie de compuestos orgánicos volátiles que se asociaron específicamente al olor y sabor del

fruto del tomate. Esta metodología presentó la ventaja de resaltar las variables individuales que correlacionaron con el olor y sabor del fruto a partir de un gran volumen de información tratado por diferentes análisis multivariados.

La comparación de los resultados de las cosechas individuales de los años 2009, 2010 y 2012 permitió detallar 15 metabolitos volátiles que no han sido, hasta el momento, señalados como potenciales contribuyentes activos al olor y sabor del tomate. Los nuevos metabolitos postulados fueron 2-etil-1-hexanol, *p*-ment-1-en-9-al, DMHEX: 3,6-dimetil-2, 3, 3a, 4, 5, 7a-hexahidrobenzofurano, alcanfor, terpinoleno, 2-metilacetofenona, 1-fenil-1-propanol, óxido geránico, 2-dodecanona, decanal, *p*-metoxitolueno, 3-metilheptil acetato, benzofenona, β -metil ionona, salicilato de propilo y salicilato de isoamilo. Además, también fue posible distinguir 10 señales sin identificar que presentaron igual comportamiento. Las señales sin identificar ligadas a las características sensoriales fueron UNK m/z 120, UNK m/z 95, UNK m/z 131, UNK m/z 119, UNK m/z 68, UNK m/z 55, UNK m/z 57-2, UNK m/z 115, UNK m/z 43 y UNK m/z 93-2. Estas variables metabólicas pueden ser consideradas en un futuro proceso de mejoramiento como potenciales marcadores de calidad sensorial en el fruto del tomate.

Un estudio más generalizado sobre los metabolitos volátiles agrupados en bloques de acuerdo a su origen metabólico y grupo funcional permitió observar correlaciones estadísticamente significativas con las distintas variables sensoriales de mayor importancia. Estos análisis permitieron evidenciar la influencia de los ácidos grasos, los carotenoides y terpenos sobre el olor del fruto. Los grupos funcionales más involucrados en el olor del fruto resultaron los aldehídos de terpenos y ácidos grasos, los alcoholes de aminoácidos y las cetonas en general.

En forma más específica, fue posible destacar una serie de metabolitos que cumplen con todos los requisitos metabólicos y estructurales expuestos, asociados a las características ligadas al olor y sabor del tomate. Los metabolitos candidatos fueron 4-pentenal, *cis*-3-hexenal, hexanal, *cis*-2-hexenal, *trans*-2-hexenal, heptanal, *trans*-2-heptenal, 2-octenal, *p*-ment-1-en-al, lilial, 2-etil-1-hexanol, 2-nonen-1-ol, β -damascenona, geranil acetona, β -ionona, β -ionona epóxido, β -metil ionona, metil butanoato y benzofenona. En las diferentes cosechas estos COVs se correlacionaron al olor y sabor alternadamente. En un contexto menos específico, la prevalencia de la expresión de una familia metabólica particular, aportando matices sensoriales comunes, fue más consistente que la correlación específica de los metabolitos candidatos repetidamente en todas las cosechas analizadas.

Para concluir puede remarcarse que a lo largo de esta tesis, a partir de un extenso paquete de información, conteniendo aproximadamente 14,200 datos, obtenido del minucioso análisis de las tres cosechas ensayadas, fue posible destacar una serie de candidatos metabólicos que han resultado ser los compuestos volátiles con mayor relación sobre el olor y sabor del fruto del tomate. Esta breve, pero valiosa información podrá considerarse a futuro como punto de partida para eventuales investigaciones en diferentes áreas del conocimiento que involucren el estudio de este importante cultivo.

Presentaciones en Congresos y Reuniones Científicas

Los avances de esta tesis doctoral dieron origen a diferentes presentaciones donde los resultados alcanzados fueron expuestos en diferentes ámbitos académicos.

“Metabolic Patterns for Quality Traits in Tomato Fruits”

Ester Marina Insani, María Fernanda Godoy, **Pablo Cortina**, Ramón Asís, Iris Peralta, Ana Santiago y Fernando Carrari.

Poster a presentar en la 12th European Nutrition Conference 2015, 13 al 26 de octubre de 2015 en Berlín, Alemania.

“Perfiles Metabólicos como Herramientas para Determinar Rasgos de Calidad en Frutos de Tomate”

Ester Marina Insani, **Pablo Cortina**, Ramón Asís, Iris Peralta, Pablo Asprelli, Mariana López, Mariana Conte, Ana Santiago y Fernando Carrari.

Poster presentado en el 30^a Congreso Argentino de Química 22 al 24 de octubre de 2014 en Buenos Aires, Argentina.

“Análisis de Redes Neuronales Artificiales dirigido al estudio del aroma y sabor en el fruto del tomate”.

Pablo Cortina, Ramón Asís, Ana Santiago.

Poster presentado en el Simposio Nacional de Química Orgánica (SINAQO), 16 al 19 de noviembre de 2013 en Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.

“Determinación de metabolitos volátiles asociados al aroma y sabor en frutos de tomate por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con un analizador de trampa de iones”

Pablo Cortina, Ramón Asís, Ana Santiago.

Poster presentado en el Primer Congreso Argentino de Espectrometría de Masas (CAEM), 11 al 13 de noviembre de 2012 en la ciudad de Los Cocos, Córdoba, Argentina.

Mención Especial obtenida en la categoría mejor poster presentado en el congreso.

“Determinación de Metabolitos Volátiles Asociados al Aroma y Sabor en Frutos de Tomate”

Pablo Cortina, Virginia Molineri, Ramón Asís, Ana Santiago.

Exposición oral presentada en las Segundas Jornadas de Estudiantes Investigadores de la UNC, “Construcción y Difusión de Conocimientos desde la Universidad Pública”, 11 al 12 de octubre de 2012 en Ciudad Universitaria, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

“ Análisis de metabolitos volátiles de diversas variedades de tomate involucrados en el aroma del fruto ”

Pablo R. Cortina, Ramón Asís, Ana N. Santiago.

Poster presentado en el Simposio Nacional de Química Orgánica (SINAQO), 13 al 16 de noviembre de 2011 en Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina.

“Desarrollo de un método para determinar metabolitos volátiles del fruto del tomate por HS-SPME-GC/MS ”

Pablo R. Cortina, Ramón Asís, Ana N. Santiago.

Poster presentado en el Congreso Argentino de Química 13 al 16 de septiembre de 2010 en la Universidad Nacional de Lanús, Buenos Aires, Argentina.

Trabajos Científicos

Organoleptic Properties and Metabolic Profiling of Andean Tomato Fruits.

P. Cortina, M. D'Angelo, M. Sance, I. Peralta, A. Santiago, R. Asís and E. Valle.
Manuscrito en redacción.

A new Approach on the Analysis of Flavor in Andean Tomato Landraces.

P. Cortina, R. Asís, M. Sance, I. Peralta and A. Santiago
Manuscrito en redacción.

Influence of Metabolic Origin Compound and their Functional Group in Tomato Flavor of Andean Landraces.

P. Cortina, A. Santiago, M. Sance, I. Peralta and R. Asís.
Manuscrito en redacción.

El desarrollo de esta tesis doctoral no hubiera sido posible sin el apoyo de los diferentes investigadores y colaboradores a cargo de los centros de investigación incluidos en este proyecto en red. Debo extenderme en nombrar a cada uno de ellos y hacerles llegar el merecido reconocimiento a:

La Dra. Iris Peralta, Dr. Pablo Asprelli, Dra. María Sance y todo el personal técnico del Instituto de Horticultura de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo y de la Estación Experimental Agropecuaria INTA-La Consulta, Mendoza.

El Dr. Fernando Carrari, Dra. Marina Insani, Lic. Mariana Conte, Dra. Luisa Bermúdez y Lic. Carla Coluccio Leskow del Instituto de Investigaciones Biotecnológicas del Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas de la Estación Experimental INTA-Castelar (IIB-CICVYA-INTA), Buenos Aires.

La Dra. Estela Valle, Dra. Silvana Boggio, Dra. Carla González, Lic. Matilde D'Angelo del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR), Santa Fe.

El Dr. Diego Milone y la Dra. Georgina Stegmayer del Centro de Investigaciones en Señales e Inteligencia Computacional (sinc(i)), Santa Fe.

La Dra. Ana Santiago y al Dr. Ramón Asís del Instituto de Investigaciones en Físico-Química de Córdoba (INFIQC) y Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI), Córdoba.

A todos ellos debo agradecer afectuosamente por las arduas jornadas de cosecha, estancias laborales y extensas discusiones, seminarios y reuniones científicas que nos han juntado en los últimos años.