

Utilización de técnicas
analíticas de cromatografía y
espectrometría de masas
para autenticar
productos alimentarios de
calidad diferenciada.

Tesis Doctoral
Francisco Julián Cuevas Román
2019

TITULO: *Utilización de técnicas analíticas de cromatografía y espectrometría de masas para autenticar productos alimentarios de calidad diferenciada*

AUTOR: *Francisco Julián Cuevas Román*

© Edita: UCOPress. 2019
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

[https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/
ucopress@uco.es](https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/ucopress@uco.es)

Diseño y maquetación
Paloma Roldán Andújar

Used images
Created by Onlyyouqj
Freepik.com

Enero 2019



Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA Y PESCA

Programa de doctorado: Ingeniería agraria, alimentaria, forestal
y de desarrollo rural sostenible

Utilización de técnicas analíticas de cromatografía y
espectrometría de masas para autenticar productos
alimentarios de calidad diferenciada

Authentication of high added-value foodstuffs by mean
chromatographic and mass spectrometric techniques

Director/Directores:
José Manuel Moreno Rojas
María José Ruiz Moreno

Autor de la tesis: Francisco Julián Cuevas Román
Fecha de depósito tesis en el Idep: Enero 2019



TÍTULO DE LA TESIS: Utilización de técnicas analíticas de cromatografía y espectrometría de masas para autenticar productos alimentarios de calidad diferenciada.

DOCTORANDO: Francisco Julián Cuevas Román

INFORME RAZONADO DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

La presente Tesis ha supuesto un avance significativo para el conocimiento de la industria agroalimentaria en cuestiones tan importantes como la caracterización y autenticación de los productos y el control de calidad. Actualmente existe una creciente demanda por parte de los consumidores de productos alimentarios de calidad contrastada y seguros. Por este motivo las empresas deben invertir sus recursos en sistemas que garanticen esta calidad y que les permita cumplir con la normativa vigente: sistemas de trazabilidad, normas de calidad, certificaciones de productos, etc.

La investigación desarrollada en esta tesis posee el denominador común del estudio de la calidad y la trazabilidad aplicadas a diferentes áreas del conocimiento, en concreto a dos sectores productivos que generan alimentos de calidad diferenciada como son la producción ecológica y el cerdo ibérico. Ambos sectores se han caracterizado por mantener una producción de calidad con ausencia de técnicas analíticas que pudieran asegurar su trazabilidad y por tanto un control exhaustivo de los productos generados. Así, en este trabajo de investigación se ha abordado la aplicación de técnicas analíticas avanzadas (LC-MS, GC-MS, IRMS, ...) como herramientas para la caracterización de dichos productos y proponer mecanismos de control de dicha calidad diferenciada.

El doctorando ha utilizado diferentes técnicas e instrumentación analítica necesaria para desarrollar la presente tesis hecho que ha potenciado sus capacidades y habilidades en el campo de la caracterización de los alimentos. Adicionalmente, ha realizado una estancia de investigación que ha complementado su formación analítica.

Parte de los resultados de este Trabajo de Investigación han sido publicados en diferentes revistas científicas, tales como: Food Chemistry, Food Control y Plos One; estando el resto en revisión.

La Tesis se adapta a la metodología y diseño establecidos, derivando todo ello en la obtención de resultados de indudable relevancia científica, para los sectores e industrias implicadas.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Fdo.: José Manuel Moreno Rojas

Córdoba 15 de enero de 2019

Fdo.: María José Ruiz Moreno



TÍTULO DE LA TESIS: Uso de técnicas analíticas avanzadas para estudiar la influencia de los factores de producción sobre la calidad diferenciada y trazabilidad de productos alimentarios

DOCTORANDO: Francisco Julián Cuevas Román

INFORME RAZONADO DEL TUTOR

(Ratificando el informe favorable del director. Sólo cuando el director no pertenezca a la Universidad de Córdoba).

Dña. María Isabel López Infante, profesora asociada del Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos, del Area de Tecnología de los Alimentos, como tutora del mencionado doctorando

INFORMA

Que el trabajo de investigación titulado “Uso de técnicas analíticas avanzadas para estudiar la influencia de los factores de producción sobre la calidad diferenciada y trazabilidad de productos alimentarios”, realizado por el doctorando D. Francisco Julián Cuevas Román, bajo la dirección del Dr. José Manuel Moreno Rojas y la Dra. María José Ruiz Moreno, reúne los requisitos para ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en la Universidad de Córdoba y ratifico la consideración favorable emitida por los Directores de la tesis doctoral a tal efecto.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 11 de Enero de 2019

Firma del tutor de Universidad de Córdoba

Fdo.: María Isabel López Infante

Código:64oxu680KKN077BFsogX45UCi/Tfg+.
Permite la verificación de la integridad de este documento electrónico en la dirección: <https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/>

FIRMADO POR	MARIA ISABEL LOPEZ INFANTE	FECHA	11/01/2019
ID. FIRMA	64oxu680KKN077BFsogX45UCi/Tfg+	PÁGINA	1/1

Informe del factor de impacto de las publicaciones de la tesis

Publicación	Factor de impacto	Cuartil/Categoría
Effect of organic and conventional management on bio-functional quality of thirteen plum cultivars (<i>Prunus salicina</i> Lindl.). PloS one , (2015) <i>10</i> (8), e0136596.	Multidisciplinary Science 3.057 (2015)	Q1 (11/61)
Effect of management (organic vs conventional) on volatile profiles of six plum cultivars (<i>Prunus salicina</i> Lindl.). A chemometric approach for varietal classification and determination of potential markers. Food chemistry , (2016) <i>199</i> , 479-484.	Food Science & Technology 4.529 (2016)	Q1 (6/128)
Assessing a traceability technique in fresh oranges (<i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck) with an HS-SPME-GC-MS method. Towards a volatile characterisation of organic oranges. Food chemistry , (2017) <i>221</i> , 1930-1938.	Food Science & Technology 4.946 (2017)	Q1 (7/133)
Assessment of premium organic orange juices authenticity using HPLC-HR-MS and HS-SPME-GC-MS combining data fusion and chemometrics. Food Control , (2017) <i>82</i> , 203-211.	Food Science & Technology 3.667 (2017)	Q1 (12/133)
A holistic approach to authenticate organic sweet oranges (<i>Citrus Sinensis</i> L. cv Osbeck) using different techniques and data fusion. Journal of agricultural and food chemistry . Enviado	Food Science & Technology 3.412 (2017)	Q1 (18/133)
An update of isotopic fertilizer databases used in intensive organic farming. Case study: hydrolyzed protein and chelated nutrients Food Control . Enviado	Food Science & Technology 3.667 (2017)	Q1 (12/133)
The use of stable isotope signatures ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) from different organs to authenticate the Iberian pig carcass based on the feeding regime. Food chemistry . Enviado	Food Science & Technology 4.946 (2017)	Q1 (7/133)

Los resultados que se presentan en esta tesis doctoral han sido financiados por los siguientes proyectos:

- Utilización de la técnica de espectrometría de masas de relaciones isotópicas (IRMS) para la caracterización y trazabilidad de la canal y los productos del cerdo ibérico en función del régimen alimenticio. Establecimiento de una base de datos isotópica de referencia para el sector (ISOTIBER). P12-AGR-1564 otorgado por la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía (Investigador Principal: José Manuel Moreno Rojas).
- Caracterización organoléptica y funcional de productos ecológicos. Utilización de técnicas isotópicas para la diferenciación entre producto ecológico y convencional. PR.AVA.AVA201301.7 / PR.AVA.AVA201301 otorgado por el Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera de Andalucía (Investigador Principal: José Manuel Moreno Rojas)

El doctorando ha sido contratado a través de ambos proyectos:

- Contrato de investigación adscrito al proyecto “Caracterización organoléptica y funcional de productos ecológicos (PR.AVA.AVA201301.7 / PR.AVA.AVA201301)”.
- Contrato predoctoral (FPI) adscrito al proyecto “Utilización de la técnica de espectrometría de masas de relaciones isotópicas (IRMS) para la caracterización y trazabilidad de la canal y los productos del cerdo ibérico en función del régimen alimenticio. Establecimiento de una base de datos isotópica de referencia para el sector (ISOTIBER)” (P12-AGR-1564) por resolución de la secretaría General de Universidades, Investigación y Tecnología 24 de noviembre de 2014 (BOJA nº 235, de 2 de diciembre de 2014)



Unión Europea
Fondo Europeo de Desarrollo Regional



Unión Europea
Fondo Social Europeo



Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA Y PESCA

Índice de contenidos

Agradecimientos	10
Abreviaturas	12
Lista de figuras	16
Resumen	18
Summary	20
I.- Introducción	22
1. Los sistemas de aseguramiento de la calidad	25
1.1. La trazabilidad y la autenticación alimentaria	27
1.2. El dualismo calidad-trazabilidad	28
1.3. Técnicas analíticas para el aseguramiento de la calidad	29
2. Sectores singulares y la protección contra el fraude	37
2.1. El sector de la producción ecológica	38
2.1.1. Sector primario, secundario e industria auxiliar ecológica	43
2.1.2. Sistemas de aseguramiento de la producción ecológica	50
2.1.3. Los antecedentes analíticos de autenticación de la producción ecológica	54
2.1.4. El fraude en la producción ecológica. Antecedentes y actualidad	59
2.2. El sector del cerdo ibérico	61
2.2.1. Sistemas de aseguramiento de la calidad del cerdo ibérico	66
2.2.2. Los antecedentes analíticos de autenticación del cerdo ibérico	67
2.2.3. Los fraudes en el cerdo ibérico. Antecedentes y actualidad	70
II. Objetivos	72
II. Aim	74
III.- Material y métodos	76
III.1 Material biológico utilizado	77
III.2. Sistemas de preparación de muestra	79
III.3. Métodos de calidad básica	81
III.4. Métodos espectrofotométricos	83
III.5. Sistemas cromatográficos	84

III.6. Relaciones isotópicas de isótopos estables	88
III.7. Análisis de datos y software	89
IV. Resultados y discusión	90
IV. Capítulo I	91
IV. Publicación 1	93
IV. Publicación 2	109
IV. Capítulo II	119
IV. Publicación 3	121
IV. Publicación 4	135
IV. Capítulo III	137
IV. Publicación 5	139
IV. Capítulo IV	159
IV. Publicación 6	161
IV. Capítulo V	163
IV. Publicación 7	165
V. Conclusiones	167
V. Conclusions	171
VI. Bibliografía	174

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis, Dr. José Manuel Moreno Rojas y Dra. María José Ruiz Moreno, haber conseguido llegar a este momento.

Gracias José Manuel por enseñarme más allá de lo académico, por sacrificar parte de tu tiempo conmigo y por abrirme un mundo de personas que han sacado lo mejor de mí. Gracias María José por compartir todo tu conocimiento, por la paciencia, por la confianza, por enseñarme la perfección y darme ánimo cada día hasta que hemos conseguido llegar a puerto. También querría agradecer a Isabel López Infante la tutorización de esta Tesis.

Agradecer a la Consejería de Economía y Conocimiento de la Junta de Andalucía por concederme el contrato que me ha permitido desarrollar esta tesis doctoral y al IFAPA, Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera de Andalucía por permitirme haberme dejado unirme esta gran empresa y por haber ofrecido tantos medios y personas para la realización de la presente tesis.

A José Carlos, Alicia, a José Luis y a Mané a por compartir tanto tiempo en el desarrollo de la tesis en matadero, en campo, en el laboratorio o en el despacho. También a los que compartieron tiempo de laboratorio y fatigas conmigo, Vanessa, Fali y Almudena.

Gracias a la Dra. Inma Pradas, por toda la ayuda, por tu sinceridad y por compartir el conocimiento y trabajo en la preparación de parte del desarrollo experimental de la presente tesis. Gracias a la Dra. Gema Pereira por aportar parte de su conocimiento y trabajo a la presente tesis doctoral. Sin vosotras no hubiera sido posible gran parte del trabajo desarrollado en la tesis.

Gracias al Dr. Paco Arroyo y al Dr. Antonio Daza por haber proporcionado una parte importante del material, medios y personal para realizar la presente Tesis. Gracias a la Asociación Palmaecológica, en especial a María Reyes por involucrarse en los muestreos y trabajo de campo y hacerme colaborar con tantísimos agricultores. Gracias a COVAP, Sánchez Romero Carvajal y a la Diputación de Huelva por ofrecer tantos medios a favor del proyecto. En especial, a Vanessa, Fernando y Javier.

Gracias a la Dra. Emma Cantos por todo lo que me ha enseñado y porque me ha permitido participar y colaborar en tanta investigación llevada a cabo por la gente del IFAPA Rancho de la Merced en Jerez. Agradecer también a Juan Domínguez por sus valiosos consejos sobre estadística, ayuda y clarificación de dudas durante la realización de este trabajo. También me gustaría agradecer a Victor Ortiz por ayudarme a controlar situaciones difíciles y el cariño mostrado en momentos duros de la Tesis Doctoral. Gracias también a todo el personal de IFAPA que ha participado en el lado oscuro de la ciencia con burocracia y papeleo infinito que también han hecho posible la realización de la Tesis.

Quisiera agradecer a Auxi por haberme dado la oportunidad de conocerte y haber aprendido tantas cosas valiosas. Tu implicación en los proyectos te hace única y eres un ejemplo de sacrificio para todos los que te conocen. Agradezco también David Lozano por haberme dado la oportunidad de colaborar en su proyecto. A partir del cual, mis amigos me llaman cariñosamente “Doctor Melón”.

Gracias al profesorado del curso “University Specialist in Methods in Plant Ecophysiology” en el que descubrí la pasión por la ciencia, especialmente por el entusiasmo de Miquel Ribas-Carbó, a Jaume Flèxas y todos los estudiantes que nos convertimos en familia durante cinco semanas, en especial a Domenico, Tho, César y mi hermano italiano, Giacomo.

También querría agradecer a la Estación Biológica de Doñana y al CRA-W que me ha aportado tanto conocimiento, necesario para el desarrollo de la presente Tesis, en especial, a Juan Fernández que me acogió con cariño en Bélgica.

Quería aprovechar para agradecer a la Dra. Federica Camin por la oportunidad que me dio de trabajar en su laboratorio y dejarme conocer tanta gente que trabajaba con ellos. Gracias en involucrarte tanto para que estuviera a gusto. Gracias a Josep y a Leonardo por vuestros ratos y cervezas para que mi estancia la recuerde con mucho cariño.

Gracias a mis amigos, a todos ellos. Vuestras muestras de apoyo y ánimo en el duro tramo final de la tesis y por estar siempre conmigo. No lo olvidaré nunca.

Gracias a mis padres, por su amor sin límites, por todas las oportunidades que se han quitado para dármelas, sin condiciones, Gracias por todo el sacrificio para darnos siempre lo mejor a mí y a mi hermano. Gracias a mi hermano, por escucharme cuando los nervios me superaban. Gracias a los abuelos, a toda la familia, todos mis titos, mis titas, los primos y primas que tengo. Es un auténtico tesoro poder contar con vosotros.

Gracias a mi mujer, María, por estar siempre al lado, por calmarme, por el sacrificio que has tenido que pasar durante parte de esta tesis y por respetar mis cambios de humor Por estar siempre feliz e irradiar tanta alegría a tu alrededor. Gracias a mi familia política por la preocupación e interés.

Gracias a todos los que habéis hecho de esta travesía, un viaje más fácil.

Abreviaturas

°	grado
'	minuto
"	segundo
%	tanto por cien
‰	tanto por mil
α	alfa
γ	gamma
δ ¹³ C	delta 13 del carbono
δ ¹⁵ N	delta 15 del nitrógeno
δ ¹⁸ O	delta 18 del oxígeno
δ ² H	delta 2 del hidrógeno
μl	microlitro
μm	micrómetro
¹⁴ N	nitrógeno 14
¹⁵ N	nitrógeno 15
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
AES	espectroscopia electrónica Auger
AIJN	Asociación Europea de Fabricantes de Zumos
ANICE	Asociación Nacional de Industrias de la Carne de España
ANN	redes neuronales artificiales
CAAE	Comité Andaluz de Agricultura Ecológica
CaCl ₂	cloruro de calcio
CAPDR	Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural de Andalucía
CAR	carboxen
CE	Comisión Europea
CO ₂	dióxido de carbono
col.	colaboradores
COVAP	Cooperativa Ganadera del Valle de los Pedroches
CVA	análisis de correlación canónica
DA	análisis discriminante
DART	análisis directo en tiempo real

DESI	ionización por desorción con electrospray
DFA	análisis factorial discriminante
DOOR	Base de Datos de Origen y Registro
DOP	Denominación de Origen Protegida
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
DVB	Divinilbenceno
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EEUU	Estados Unidos de América
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
ELISA	ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ETG	Especialidad Tradicional Garantizada
eV	electrón voltio
Extenda	Agencia Andaluza de Promoción Exterior
	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la
FAO	Agricultura
FAOSTAT	Base de datos de la FAO
FRAP	poder antioxidante reductor del hierro
FSA	Food Standards Agency
GC	cromatografía de gases
HCA	análisis de agrupamiento jerárquico
HMBD	Human Metabolome Database
HPLC	cromatografía de líquidos de alta presión
HS	espacio de cabeza
Hz	hercio
IBM	International Business Machines Corporation
ICP	espectrometría de masas de plasma
	Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera de
IFAPA	Andalucía
IFOAM	Federación Internacional de Movimientos de Agricultura Orgánica
IGP	Indicación Geográfica Protegida
INE	Instituto Nacional de Estadística
INI	Procedimiento de Iniciativa
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

Kg	kilogramo
k-NN	k - vecinos más cercanos
LDA	Análisis discriminante linear
LIPIDMAPS	Lipid maps Lipidomics Gateway
m	metro
m ²	metro cuadrado
m/z	relación masa carga
	Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente de
MAPAMA	España
METLIN	METLIN Metabolomics Database
min	minuto
MIR	infrarrojo medio
ml	mililitro
mm	milímetro
M	molar
mM	milimolar
mm	milimetro
MS	espectrometría de masas
N	Norte
N ₂	Nitrógeno molecular
NaCl	cloruro de sodio
NaOH	hidróxido de sodio
NIR	infrarrojo cercano
NIRS	Espectroscopía de infrarrojo cercano
NIST	National Institute of Standards and Technology
nm	nanómetro
NMR	resonancia magnética nuclear
n ^o	número
NOSB	National Organic Standards Board
O	Oeste
°Brix	grados brix
OMS	Organización Mundial de la Salud
p.ej.	por ejemplo

Pa	pascal
PCA	análisis de componentes principales
PDMS	polidimetilsiloxano
PLS	mínimos cuadrados parciales
ppm	partes por millón
PTR	reacción de transferencia protónica
PVC	policloruro de vinilo
QDA	análisis discriminante cuadrático
Raman	espectroscopía Raman
RD	Real Decreto
ROC	característica operativa del receptor
s	segundo
S.C.A.	sociedad cooperativa andaluza
SIMCA	análisis de clases por modelado suave independiente
SNIF	fraccionamiento isotópico natural específico
SPME	micro-extracción en fase sólida
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SVM	máquinas de soporte vectorial
TG	triglicéridos
TOF	tiempo de vuelo
TPTZ	2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine
UNEQ	modelaje de clases inequívoco
USDA	United States Department of Agriculture
UV	ultravioleta
v.	version
v/v	volumen/volumen
V-PDB	Vienna Pee Dee Belemnite
VIS	visible
WOK	Web of Knowledge

Lista de figuras

Figura 1. Sellos distintivos de calidad alimentaria a nivel europeo.

Figura 2. Distribución del número total de DOPs, IGP y ETGs por clase alimentaria en España.

Figura 3. Superficie total dedicada a producción ecológica en el mundo (IFOAM 2016)

Figura 4. Evolución histórica de la superficie dedicada a ecológico en España (MAPAMA, 2017)

Figura 5. Superficie total de frutales dedicada a ecológico en España (MAPAMA, 2015)

Figura 6. Superficie total de cítricos dedicado a ecológico en España (MAPAMA, 2015)

Figura 7. Precios medios anuales de la producción ecológica con respecto a la convencional en A) hortícola protegido (tomate), B) cítricos (naranja) y C) transformados (aceite de oliva) (Fuente: Observatorio de precios de Andalucía 2017)

Figura 8. Procedimientos de registro e inspección de la producción ecológica

Figura 9. Serie histórica de la literatura encontrada sobre naranja (naranja) y ciruela (morado) ecológicas. Motor de búsqueda: Scopus, WOK y Google Scholar.

Figura 10. Sellos de calidad de los productos derivados del cerdo en España

Figura 11. Esquema de requisitos y certificación de los productos del cerdo ibérico amparados bajo la norma de calidad 4/2014 (Elaboración propia).

Figura 12. Evolución de los precios (€/Kg) por campaña percibido por categoría en origen (Fuente: Lonja de Salamanca 2017).

Figura 13. Número total de precintos emitidos por categoría y porcentajes anuales por campaña (Fuente: Asici, 2017)

Figura 14. Detalle del liofilizador

Figura 15. Detalle del sistema de extracción y separación de grasa

Figura 16. Detalle de la trituradora de vaso

Figura 17. Detalle del molino de bolas

Figura 18. Detalle del agitador vortex

Figura 19. Detalle del molino criogénico

Figura 20. Detalle del evaporador al vacío

Figura 21. Detalle del texturómetro automático

Figura 22. Detalle del valorador automático

Figura 23. Detalle del refractrómetro digital

Figura 24. Detalle del espectrofotómetro de placas (UV-VIS)

Figura 25. Detalle del cromatógrafo de líquidos acoplado al espectrómetro de masas de alta resolución

Figura 26. Detalle del cromatógrafo de gases acoplado al Combi-Pal y al espectrómetro de masas triple cuadrupolo

Figura 27. Detalle del analizador elemental acoplado al espectrómetro de masas de relaciones isotópicas

Resumen

Los ciudadanos y consumidores europeos demandan, cada vez más, productos de calidad basados en prácticas respetuosas con el medio ambiente (agricultura ecológica, sistemas ganaderos extensivos...). Estos productos con una calidad diferenciada representan una ventaja competitiva en los mercados internacionales y, además, contribuyen a preservar el patrimonio cultural y gastronómico del conjunto de la Unión. Motivo por el cual, la calidad y diversidad de las producciones agrícolas, pesqueras y alimentarias de Europa están protegidas bajo legislación comunitaria.

En este contexto, la agricultura ecológica y el sector del cerdo ibérico producen alimentos de calidad diferenciada de alto valor añadido que repercuten de manera notable sobre la economía y el tejido productivo agroalimentario andaluz, basándose en unos principios sostenibles.

Ambos sectores se han caracterizado por perseguir una producción de calidad y distintiva. Sin embargo, estos sistemas productivos carecen de normativas donde se expliciten herramientas analíticas que puedan asegurar la trazabilidad y autenticidad de sus productos.

En esta Tesis Doctoral, se ha evaluado la influencia del modo de producción (ecológico y convencional) sobre los compuestos bioactivos y volátiles en un cultivo alternativo en Andalucía como es el ciruelo japonés. Como resultado, se comprobó el incremento de ciertos compuestos bioactivos en las muestras ecológicas y la modulación del perfil volátil a causa del manejo agrícola.

Asimismo, se caracterizó y evaluó el impacto del manejo en el perfil volátil de un cultivo permanente en Andalucía como es la naranja. Se estudiaron las posibilidades de su autenticación, obteniéndose modelos de clasificación para naranjas ecológicas frente a las convencionales. Asimismo, se exploraron nuevas aproximaciones analíticas fusionando datos provenientes de diferentes técnicas (perfil fenólico, isótopos estables y

características físico-químicas) que ofrecen nuevas herramientas de autenticación de las naranjas en función de su modo de producción (ecológico o convencional).

Por otro lado, se demostró el potencial de las técnicas de fusión de datos de las fracciones volátil y no volátil para autenticar productos transformados como los zumos premium ecológicos. Este estudio, puso de manifiesto la complementariedad de ambas fracciones y la mejora de los modelos de clasificación complejos frente a los individuales.

Además, se caracterizaron isotópicamente nuevos fertilizantes ecológicos que han puesto de manifiesto la diversidad de valores isotópicos del nitrógeno de los que disponen los productores de la agricultura ecológica intensiva y sus posibles implicaciones en los productos finales obtenidos.

Finalmente, la presente tesis doctoral ha desarrollado un banco de datos de relaciones isotópicas de nitrógeno y de carbono de las fracciones lipídica y no lipídica de diferentes órganos del cerdo ibérico, obteniéndose un modelo capaz de clasificar correctamente las canales según el régimen alimenticio seguido por el animal de acuerdo a la normativa vigente.

Summary

European citizens and consumers are increasingly demanding quality foodstuffs based on sustainable and “green” agricultural practices (organic farming, extensive livestock systems, etc.). These high-quality foodstuffs represent a competitive advantage in international market, while also helping to preserve the cultural and gastronomic heritage of the Union as a whole. For this reason, the quality and diversity of agricultural, fishing and food production in Europe is protected under EU legislation.

In this context, organic farming and the Iberian pig sectors, based on sustainable principles, produce food with a differentiated quality and high added value, which has a significant impact on the Andalusian agri-food production economy.

Both sectors have been characterized for pursuing a common goal: the production of distinctive, quality produce. However, these production systems lack regulations that specify the analytical tools that are capable of ensuring the traceability and authenticity of their products.

In this Doctoral Thesis, the influence of the production management—organic and conventional—on the bioactive and volatile compounds in an alternative crop (Japanese plum) in Andalusia has been evaluated. The results confirmed the increase of certain bioactive compounds in the organic samples and differences in the volatile profile due to agricultural management.

Likewise, the impact of management on the volatile profile of oranges, a permanent crop in Andalusia, was characterized and evaluated. Authentication potential was studied, obtaining classification models for organic oranges versus conventional oranges. Furthermore, new analytical approaches were explored through the fusion of data from different techniques (phenolic profile, stable

isotopes and physical-chemical characteristics) that offer new tools for the authentication of oranges according to their agricultural management (organic or conventional).

In addition, the study showed the potential of the fusion of data of volatile and non-volatile fractions to authenticate processed foodstuffs such as organic premium juices. It revealed the complementarity of both fractions and how data fusion models improve the classification with regard to individual ones.

In addition, new organic fertilizers were isotopically characterized. The results showed the diversity of nitrogen isotope values available to intensive organic farmers and their possible implications for the final production obtained.

Finally, this thesis has developed a database of nitrogen and carbon isotope ratios of the lipid and lipid-free fractions of different organs of the Iberian pig, obtaining a model able to classify correctly the Iberian pig carcass according to the diet followed by the animal under the current regulations.



Introducción



Introducción

En España, el sector alimentario es un sector estratégico en términos sociales, económicos y medio ambientales (MAPAMA, 2016). En los últimos años, las preferencias de los consumidores europeos se mueven hacia alimentos de mayor calidad que requieren ser autenticados por algún mecanismo o sistema de control (Manning, 2016). Estos mecanismos de control se han convertido en una política clave en el acervo normativo desarrollado tanto en la industria alimentaria como en las instituciones de control alimentario a nivel autonómico (ley 2/2015 de 25 de marzo), estatal (ley 28/2015 del 30 de julio) como europeo (Reglamento (CE) n.º 882/2004). Asimismo, estos mecanismos se pueden desarrollar en base a su composición química que los hace únicos e inequívocos, o a través de parámetros analíticos que nos permitan autenticar un alimento sin necesidad de analizar su calidad intrínseca como permiten las técnicas de “fingerprinting” o la autenticación a través de isótopos estables (Esslinger et al., 2014).

Estos mecanismos de control están orientados a la autenticación de productos con alto valor añadido y, en nuestro caso, Europa cuenta con una gran cantidad de alimentos de extraordinaria y singular calidad derivados de técnicas tradicionales o manejos agrarios que los hacen únicos. Algunas de estas técnicas están basadas en un sistema de producción extensivo y sostenible, con una notable tecnificación de sus procesos o en una base genética excepcional. Como esta calidad es dependiente de los factores de producción, identificar y perfeccionar su conocimiento ayuda a focalizar las técnicas de producción hacia la excelencia alimentaria. Unido a esta riqueza de producciones, la Unión Europea ha desarrollado normativas que pretenden proteger esta diversidad y calidad de sus producciones agroalimentarias. De esta manera, La Unión Europea dispone de cuatro sellos de calidad alimentaria diferenciada que deben quedar garantizados mediante controles específicos. Dos de ellas, las DOPs (denominación de origen protegida) y las IGP (indicación geográfica protegida), tienen una marcada connotación geográfica mientras que las ETGs (Especialidad Tradicional Garantizada) están relacionadas con determinados métodos de producción tradicional.



Figura 1. Sellos distintivos de calidad alimentaria a nivel europeo.

De la misma manera, se tienen en consideración los “productos de montaña” y “productos de regiones ultra periféricas de Europa”. Por último, están los alimentos ecológicos que poseen un etiquetado diferente. Todos estos sellos están concretamente regulados bajo cuatro cuerpos normativos, correspondientes a los productos de calidad alimentarios (Reglamento (CE) nº 1151/2012), bebidas espirituosas (Reglamento (CE) nº 110/2008), vinos (Reglamento (CE) nº 555/2008) y productos ecológicos (Reglamento (CE) nº 834/2007).

Para su gestión, la Comisión Europea ha desarrollado una base de datos del sistema de etiquetado de calidad de la Unión Europea (DOOR). Según este registro, España cuenta con un total de 194 sellos distintivos de calidad, la mayoría de ellos en frutas y hortalizas, aceites, quesos y productos cárnicos (DOOR, consultado 19 de noviembre de 2018).

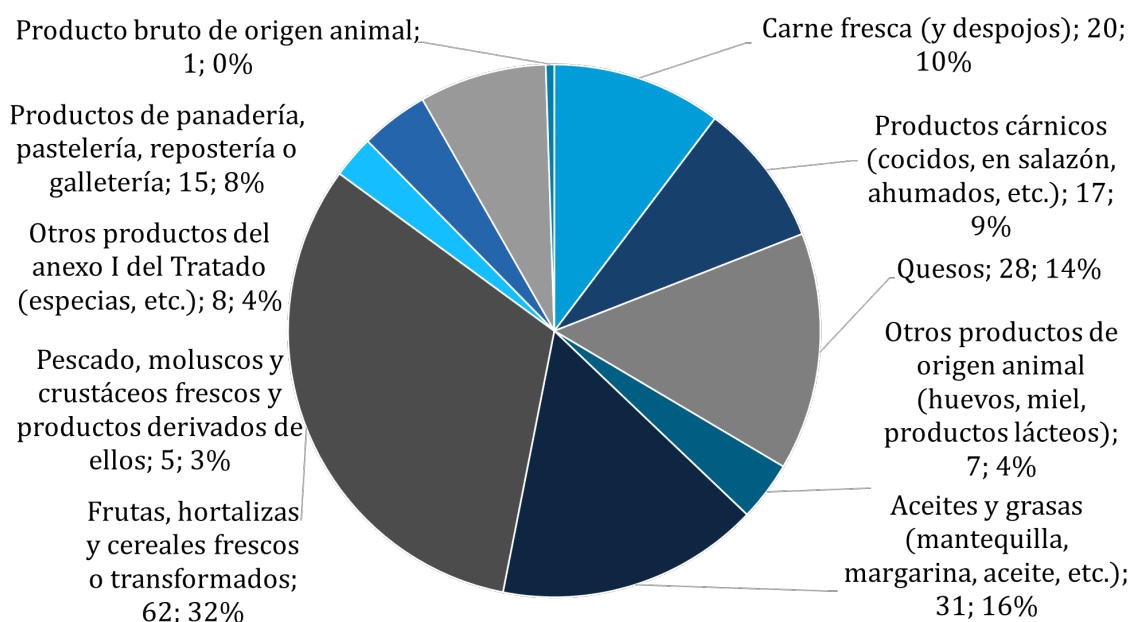


Figura 2. Distribución del número total de DOPs, IGP y ETG por clase alimentaria en España.

Todos estos productos que presentan una elevada calidad (nutricional u organoléptica) son más susceptibles de fraude, por lo que tanto el sector como los actores de la cadena deben trabajar en mejorar los sistemas de aseguramiento de

la calidad y sus procesos de autenticación. Desafortunadamente, evitar estas técnicas de fraude resulta especialmente complicado en determinados sectores como el del cerdo ibérico y el ecológico. En este marco, la introducción de esta tesis repasa bibliográficamente las posibilidades de discriminación a diversos productos andaluces de reconocido prestigio internacional como son la producción ecológica y el cerdo ibérico de bellota.

1. Los sistemas de aseguramiento de la calidad

El sistema de aseguramiento de la calidad es la estructura que gestiona el control y la verificación de determinadas propiedades físico-químicas de los alimentos. Así, es una herramienta que puede ser utilizada tanto por una empresa como por una institución pública o privada para asegurar las características de una producción.

Estos sistemas pretenden verificar algunos parámetros relacionados con su calidad, y ésta, ha estado ligada a la historia de la humanidad desde tiempos remotos. La calidad incluye todos los atributos que afectan al valor del producto para el consumidor incluyendo los atributos negativos como decoloraciones, defectos aromáticos etc... o atributos positivos como el color, el aroma, la textura o el origen geográfico (FAO OMS, 2003).

Los diferentes actores de la cadena alimentaria han otorgado diferentes definiciones al término calidad. Bajo la perspectiva del consumidor, la calidad es el nivel de desempeño de un alimento acorde a las características que se le suponen (Grunert, 2005). Esta calidad está relacionada con parámetros organolépticos, nutricionales o, incluso, con nuevos componentes de la calidad como son los aspectos sociales y medio ambientales (Cerri et al., 2019). Estos nuevos parámetros se han introducido en el espectro preferencial de los alimentos en los últimos años y son difícilmente medibles, por lo que representan un reto analítico para la autenticación debido a las similitudes físico-químicas que presentan. Por ejemplo, alimentos producidos con técnicas extensivas, con unos fertilizantes determinados o en una localización geográfica concreta.

Este reto analítico se une al reto de una creciente oferta de alimentos que ligado a la liberalización económica y la globalización de los mercados agroalimentarios está provocando un aumento de las importaciones. Así, además del reto analítico de medir las bondades medioambientales de un producto, la cadena alimentaria se

convertirá en una red cada vez más compleja, que incorporará nuevas técnicas agrarias y nuevos productos alimentarios. Esta tendencia es verificable con los nuevos tratados de comercio entre la Unión Europea con Canadá, Japón y México y los futuros acuerdos comerciales con Mercosur, Australia y Nueva Zelanda (EU Trade commerce agreements 2018). Además de la cantidad de actores y operaciones involucradas, el incremento de esta diversidad de productos y el continuo desarrollo de nuevas tecnologías de producción seguirán convirtiendo a los sistemas de aseguramiento de la calidad en un reto analítico permanente.

Ante este hecho, algunas organizaciones multilaterales, como la Organización Mundial de la Salud, ha declarado que “la complejidad de la cadena alimentaria y la globalización del consumo de muchos productos alimentarios están propiciando que aumenten la incertidumbre acerca de la procedencia de los mismos” y para evitar los riesgos asociados a esta incertidumbre, se propone mejorar y profundizar el conocimiento acerca de los sistemas de aseguramiento de la calidad. Un aspecto fundamental del aseguramiento de la calidad es evitar el fraude, por tanto, es necesario conocer previamente las tipologías de fraude alimentario existentes, ya que va a condicionar la técnica analítica que vayamos a poner en práctica. En primer lugar, hay que definir el concepto de fraude.

El fraude alimentario es un término generalizado (Esslinger et al., 2014) que engloba determinadas técnicas:

- Sustitución
- Adición
- Manipulación
- Tergiversación o falso etiquetado

Independientemente de las causas que las motiven, evitarlos o instrumentalizar barreras que lo eviten son responsabilidad del sector alimentario y de los gobiernos, por lo que se deben desarrollar normativas que lo minimicen. Podríamos destacar otras definiciones que se dan dentro del sector, como la de la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) que estima que no hay una definición armonizada acerca del fraude alimentario, aunque está ampliamente aceptado que es una violación de la normativa alimentaria europea, cometida de manera intencionada para conseguir un beneficio económico a través del engaño al consumidor (Informe del Parlamento Europeo 2013/2091(INI)).

En el caso concreto de los productos ecológicos y del cerdo ibérico, la tipología de fraude más común es el “mislabeling” o falso etiquetado. Esta estrategia consiste en etiquetar productos de una categoría “inferior” como si pertenecieran a otra “superior” o incumpliendo los requerimientos necesarios para haber obtenido la certificación de calidad “superior”, evitando los mayores costes de su producción y maximizando beneficios económicos (Spink & Moyer, 2011). Para evitar el fraude, se han creado sistemas de control, principalmente a través de un tercer actor, responsable de su autenticación, a través de numerosas técnicas. Aunque la mayoría están basadas en visitas a campo, con el coste y las limitaciones asociadas a estos controles “in-situ”.

1.1. La trazabilidad y la autenticación alimentaria

La trazabilidad y la autenticación alimentaria son complementarios para el aseguramiento de la calidad. Así, la trazabilidad es “la capacidad de seguir el movimiento de un alimento a través de etapas específicas de producción, procesamiento y distribución” (Comisión del Codex Alimentarius, 2005). En la Unión Europea, el reglamento (CE) nº 178/2002 define la trazabilidad como “la habilidad de rastrear y seguir un alimento, un pienso o sustancia que vaya a ser incorporada a lo largo de todas las etapas de producción, procesado y distribución de la cadena alimentaria”, mientras que la Agencia de Seguridad Alimentaria Americana (FSA, 2002) da una definición más concreta y especifica tres características básicas que debe poseer un sistema de trazabilidad:

- Identificación de unidades / lotes de todos los ingredientes y productos
- Información sobre cuándo y dónde se mueven y transforman
- Un sistema para vincular estos datos.

Dentro de esta habilidad de rastrear la historia de un producto se define la autenticación, que consiste en verificar puntualmente a través de una analítica o protocolo que sus características, propiedades y composición coinciden exactamente con aquellas que se asocian con el etiquetado (Danezis et al., 2016). La autenticación se suele situar previamente a su procesado o cercano al eslabón de la cadena donde existe mayor riesgo de fraude, con el fin de evitar los costes asociados.

Los procedimientos de trazabilidad y autenticación han ido ganando popularidad

en la última década ya que los ciudadanos y consumidores demandan productos que no solo sean de calidad, sino que además estén garantizados. Y este aseguramiento o garantía está ligado a un aumento de precio que pagan los consumidores. Este aumento de precio es asumido ya que las percepciones de los consumidores con respecto a la trazabilidad y la garantía, están asociados a salud, calidad, seguridad y control (Van Risjswijk et al., 2006). Por lo que los consumidores son capaces de asumir el sobre-coste a cambio de la confianza que obtienen a través de su consumo (Aung et al., 2014).

La autenticación se lleva a través de numerosas técnicas analíticas, para su elección es conveniente responder a una serie de cuestiones previas, como qué queremos autenticar, cómo lo vamos a hacer y en qué punto de la cadena hacerlo. En primer lugar, lo que queremos autenticar: es decir si queremos identificar alguna propiedad intrínseca del producto, como su origen geográfico, condiciones de procesamiento del alimento, especies o variedades vegetales (o animales) implicadas en el proceso, etc. A continuación, tendremos que decidir la tipología de análisis que vamos a realizar: las técnicas moleculares (si estamos realizando una búsqueda composicional), métodos dirigidos (si conocemos el compuesto previamente) o no dirigidos (si desconocemos el compuesto), etc. Por último, es necesario situar el protocolo o la analítica de control lo más cercano posible al fraude, con el fin de evitar por ejemplo un procesamiento del alimento que modifique o dificulte la tarea de autenticación.

1.2. El dualismo calidad-trazabilidad

El dualismo existente entre la calidad y la trazabilidad ha sido clave en los últimos años para entender por qué se han analizado parámetros relacionados con la calidad intrínseca para resolver su trazabilidad, o autenticar su origen o su pureza. El motivo que ha conducido a toda esta exploración es la consecución de un doble objetivo bajo un único plan de trabajo. Es decir, determinar la calidad diferenciada de algunos productos de valor (por ejemplo, un producto perteneciente a una DOP o una IGP) nos sirve para diferenciar nuestro producto, determinar su calidad y obtener información acerca de los factores que afectan a la misma. Consiguientemente, este proceso nos ayuda a entender mejor nuestro producto, contribuye a estandarizarlo y conseguir que esa calidad se concrete en términos de valor (p.ej. un perfil aromático diferente o un perfil de ácidos grasos).

Sin embargo, monitorizar estas propiedades a través de algunos compuestos no siempre es práctico o sencillo y en numerosas ocasiones, es un reto analítico ya que los compuestos y su concentración responde a numerosos factores externos e internos. Así, estos compuestos y su concentración varían según la variedad, la especie, el origen geográfico, el año de producción y el proceso de fabricación utilizado (Downey et al., 1998). La complejidad química de algunos alimentos y la respuesta de ciertos compuestos a estímulos agrarios o de transformación hacen que la tarea de identificar productos adulterados sea aún más complicada.

1.3. Técnicas analíticas para el aseguramiento de la calidad

Las técnicas analíticas que se utilizan en los controles oficiales suponen una herramienta fundamental para el arbitraje y la “forénsica” de los alimentos. De esta manera, estas técnicas pueden otorgar un marco legal para cada uno de las partes interesadas en una transacción comercial relacionada con los alimentos, dando una definición inequívoca de la composición del producto y su verificación.

Existe una enorme variedad de métodos y técnicas que pueden ser utilizadas para la autenticación de los alimentos, éstas las segmentaremos acorde a la distribución propuesta por Danezis et al., (2016):

Técnicas moleculares, genómica –proteómica

Estas técnicas se utilizan mayoritariamente en la detección del fraude basado en una adición o adulteración del alimento con otro de menor precio. Entre las aplicaciones más conocidas destacan la detección de organismos modificados genéticamente (Marmiroli et al., 2008), de especies vegetales de alérgenos (Pafundo et al., 2009), la detección de carne de cerdo en carne Halal (YBC Man et al., 2007) o la determinación de los orígenes botánicos de los alimentos (aceites, tomate, te, cacao) o de mezclas de especies (Madesis et al., 2014). Otras técnicas ampliamente utilizadas son las derivadas de la proteómica, que consisten en el estudio de las proteínas que se expresan en un determinado tejido o célula. Estas técnicas se han utilizado con éxito para la determinación de adulteraciones en leche y derivados (Sassi et al., 2015), carne (von Bargen et al., 2014), pescado (Wulf et al., 2013), vino (Chambery et al., 2009) e incluso en producto ecológico (Lehesranta et al., 2007).

Espectroscopia vibracional

La espectroscopía podría ser definida como la interacción entre la radiación electromagnética y la materia y se fundamentan en la determinación de la cantidad de radiación electromagnética absorbida por una muestra de acuerdo con la ley de Beer-Lambert. La espectroscopía agrupa un grupo de técnicas como el NIR, MIR o Raman. Entre las ventajas, destacan su rapidez y económico precio entre las actualmente disponibles para el aseguramiento de la calidad. Así, los espectros del MIR se fundamentan en vibraciones de estiramiento, flexión y rotación de ciertos enlaces, mientras que el NIR se basa en complejos sobretonos a longitudes de onda corta (Smyth & Cozzolino, 2012). En la técnica Raman el modo de vibración se asocia a un grupo funcional (Yang et al., 2011). Entre las aplicaciones, se encuentran la detección de adulteraciones en aceites de oliva (Downey et al., 2002), en leche (Sato et al., 1994), miel (Downey et al., 2003), zumo de naranja (Twomey et al., 1995) o en productos cárnicos (Arce et al., 2009).

Técnicas elementales

Las técnicas elementales hacen referencia a macroelementos (como el sodio, calcio o potasio), elementos trazas (como el cobre, zinc o selenio) o elementos poco comunes (como el lantano, samario). Algunos de estos elementos tienen un alto potencial en la determinación del origen geográfico y están principalmente determinados por el manejo agrario, el agua, la contaminación o la composición del suelo (Laursen et al., 2014). Principalmente se utilizan dos técnicas ICP-MS y ICP-AES. Entre las aplicaciones, se incluyen, la autenticación del origen geográfico (Coetzee et al., 2005), de la producción ecológica (Giannenas et al., 2009), de técnicas ganaderas extensivas (Coletta et al., 2012), del vino (Baxter et al., 1997), la miel (Chudzinka et al., 2011), de aceites vegetales (Llorent-Martínez 2011) o del café (Valentin & Watling, 2013).

Resonancia magnética nuclear

Esta técnica permite la obtención de una exhaustiva colección de perfiles metabólicos que pueden utilizarse para la autenticación de determinados alimentos. En este sentido, el análisis de SNIF-NMR se utiliza desde los años 90s como método oficial en Europa (Reglamento (CE) nº 2347/91 y 2348/91) para la determinación del origen geográfico del vino. Asimismo, la determinación de perfiles $^1\text{H-NMR}$ se ha utilizado para la determinación del origen geográfico en otros productos (Longobardi et al., 2013), o la adulteración de zumos (Ogrinc et al.,

2003), aceites vegetales (Shi et al., 2018) y aceites de oliva (Alonso-Salces et al., 2010a, Alonso-Sales et al., 2010b).

Análisis sensorial

El análisis sensorial incluye el conjunto de técnicas utilizadas para la medida precisa de la respuesta sensorial a la exposición de un alimento (Lawless & Heymann, 2010). Tradicionalmente esta técnica requiere un panel de expertos altamente entrenados, además del desarrollo de la estandarización de la respuesta sensorial. Esto supone un alto coste, numerosas replicaciones y complejos tratamientos estadísticos (Elortondo et al., 2007). Es por ello, que nuevas técnicas multi-sensores que imitan la percepción humana han aparecido con fuerza en los últimos años (Ouyang et al., 2014). Recientemente, se han publicado numerosas revisiones sobre las potencialidades en autenticación de este panel electrónico (Loutfi et al., 2015; Peris & Escuder-Gilabert 2016) y sobre la manera en la que fusionar esas matrices de datos (Borràs et al., 2015).

Espectrometría de masas por inyección directa

De entre ellas, destacan las técnicas de espectrometría de masas de inyección directa, que se caracteriza por la rapidez de su análisis y el alto flujo de muestras que es capaz de realizar (Harris et al., 2011). Estas características excepcionales son claves para su implementación en la industria y en los procesos de control y autenticación de alimentos (Hajslova et al., 2011). Entre éstas destacan; las técnicas DESI (Takats et al., 2004), DART (Cody et al., 2005) o PTR (Lindinger et al., 1998). Éstas se han utilizado para la autenticación en numerosos productos alimentarios como el aceite (Ruiz-Samblás et al., 2012), los productos cárnicos (DelPulgar et al., 2013), mantequillas (Van Ruth et al., 2008), aceites (Araghipour et al., 2008) y quesos (Galle et al., 2011).

Ensayos inmunológicos

Estas técnicas se basan en la interacción entre anticuerpos y antígenos. Estos inmuno-ensayos son altamente populares debido a su rapidez, sensibilidad, alta especificidad y coste. Los métodos ELISA son los más populares. Entre las aplicaciones destacan la autenticación de productos cárnicos, pesqueros y otros productos procesados como la leche, los zumos de frutas o los organismos modificados genéticamente (Asensio et al., 2008).

Técnicas cromatográficas

Las técnicas cromatográficas resuelven una gran diversidad de retos analíticos debido a su rapidez, estabilidad y habilidad para manejar matrices complejas, especialmente cuando están acoplada a espectrometría de masas (Esteki et al., 2018). La autenticación con estas técnicas se basa en la identificación de diferencias respecto a un perfil tipo y la identificación y/o cuantificación de marcadores característicos.

Un caso excepcional lo conforma la cromatografía de líquidos (Di Stefano et al., 2012), que posee un enorme potencial en la autenticación de alimentos (Cubero-Leon 2014). Numerosos ejemplos pueden encontrarse en bibliografía en mieles (Spiteri et al., 2016), vinos (Rubert et al., 2014), vegetales (Cubero-León et al., 2018), aceites (Aparicio & Aparicio-Ruiz 2000), bebidas espirituosas (Savchuk et al., 2001), café (Oliveira et al., 2009), leche (Nascimento et al., 2017), azafrán (Rubert et al., 2016), entre otros. Generalmente la autenticación de estos alimentos se realiza gracias a un valor “referencia” predeterminado del mismo. El hecho de buscar e identificar correctamente a esta muestra “referencia” de comparación ha sido un tema ampliamente discutido en literatura científica (Riedl et al., 2015). Estas técnicas cromatográficas viven un momento expansivo debido a las mejoras producidas en los espectrómetros de masas de alta resolución que han permitido un gran desarrollo de la metabolómica (Cevallos-Cevallos et al., 2009; Cubero-Leon et al., 2014). De esta manera, la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas de alta resolución es una tecnología clave para la autenticación de productos como el zumo de naranja (Jandric et al., 2015), té (Fraser et al., 2013), azafrán (Rubert et al., 2016) o cacao (Hori et al 2016) en otros.

La técnica predominante en el análisis de volátiles es la cromatografía de gases y su combinación con la micro-extracción en fase sólida (Souza-Silva et al., 2015). Esta técnica fue introducida por Arthur & Pawliszyn (1990) y ha demostrado un enorme potencial en la autenticación de los alimentos (Augusto & Zini 2002). Entre las ventajas que presenta, destacan su versatilidad, la robustez del análisis y la fácil preparación de muestra. Esta técnica ha mostrado un increíble potencial para la autenticación, como la determinación de los orígenes botánicos de mieles (Cuevas-Glory et al., 2012) de variedades de vino de diferentes variedades (Zhang

et al., 2010), sidras (Abrodo et al., 2010), vinagres (Cirlini et al., 2011). La combinación de HS-SPME-GC en combinación con análisis multivariantes también se ha utilizado en autenticación de aceite de oliva (Angerosa et al., 1999, Berlioz et al., 2006, Pouliarekou et al., 2011) o adulteraciones en aceites (Flores et al., 2006). Si bien esta técnica no se ha utilizado en análisis de alimentos ecológicos frente a los convencionales.

Técnicas isotópicas

Las técnicas isotópicas utilizadas para la trazabilidad de alimentos que atañen a la presente tesis están centradas en los isótopos ligeros ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$; $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$; $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$; $^2\text{H}/^1\text{H}$; $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$). Por otro lado, están los pesados, siendo el estroncio $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ de los más estudiados (Kelly et al., 2005). Los isótopos son átomos de un mismo elemento que difieren en masa entre ellos, así diferentes isótopos del mismo elemento tienen igual número de electrones y protones. Estas técnicas son aplicables a la autenticación de alimentos debido a que estas relaciones isotópicas cambian con las condiciones climáticas y geográficas, como ocurre en el caso del hidrógeno y del oxígeno. Mientras que en el nitrógeno y carbono estas variaciones están más relacionadas con las prácticas agrícolas utilizadas. Por último, la distancia al mar y la geología afectan a la relación $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ de una muestra (Drivelos et al., 2012).

Su potencial ha trascendido las fases experimentales. De hecho, existen métodos oficiales para la detección de adulteraciones en vino, miel, zumos de frutas o en el sirope de arce (Camin et al 2017). Además, esta técnica ha permitido autenticar vainilla natural (Bensaid., et al 2002), aguas minerales (Bowen et al., 2005), aceite de oliva (Camin et al., 2010), miel (White et al., 1989), huevos (Rock, 2012), café (Rodrigues et al., 2009) o carne procedente de régimen extensivo (Monahan et al., 2018).

Análisis de datos

El uso de herramientas estadísticas es clave para la autenticación de alimentos. El análisis de datos puede utilizarse en la planificación, evaluación e interpretación del trabajo experimental. En los últimos años, la enorme cantidad de datos obtenidos a través de la química analítica conduce a nuevos procedimientos estadísticos multivariantes. En concreto, denominamos quimiometría a la aproximación matemática y estadística que nos permite optimizar los diseños

experimentales y extraer información química relevante de bases de datos largas y complejas (Varmuza & Filzmoser, 2009). La quimiometría ha estado fuertemente ligada a estos procesos de autenticación y discriminación en los últimos años. Así, esta técnica engloba numerosos procedimientos y técnicas para la obtención de información, por lo que podríamos dividir las técnicas disponibles de la siguiente manera:

1. **Técnicas de datos exploratorias (exploratory tools):** Estas técnicas se denominan métodos no supervisados debido a que el desarrollo matemático de similitud se desarrolla sin conocimiento previo de las muestras (p.ej. clases y/o cantidad). Estas técnicas nos permiten obtener una imagen visual gráfica del conjunto de datos, así como identificar tendencias. Asimismo, podemos extraer las variables de interés, encontrar la similitud entre ellas y detectar posibles valores atípicos (Bro & Smilde 2014).

De esta manera, las técnicas exploratorias son las primeras técnicas que debemos implementar para aumentar el conocimiento que tenemos acerca de las muestras. Entre las técnicas más utilizadas, se encuentran el análisis de componentes principales (PCA) y el análisis de agrupamiento jerárquico (HCA) (Granato 2017).

2. **Técnicas de datos discriminantes (discriminant analysis):** Estas técnicas se denominan supervisadas debido a que estos métodos intentan clasificar o predecir la pertenencia a una clase o categoría, o la cantidad de una sustancia (análisis cuantitativo) utilizando la información disponible en el conjunto de datos. Así, la clasificación consiste en la asignación de un objeto a una categoría basada en las mediciones experimentales realizadas. En particular, la más popular de las técnicas utilizadas es el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) (Gromski et al., 2015). Asimismo, otros métodos han sido utilizados para problemas de autenticación o de calidad diferenciada como análisis discriminantes lineales y cuadráticos (LDA y QDA), análisis de correlación canónica (CVA), análisis factorial discriminante (DFA), vecinos cercanos (k-NN), redes neuronales (ANNs) o máquinas de vectores de soporte (SVMs) (Berrueta et al., 2007).

3. Técnicas de clasificación (class-modeling): Estos métodos también se conocen como clasificación en una clase, ya que están directamente modelados en clases individuales nuevas (Brereton, 2011). La técnica pionera en este tipo de análisis fue el análisis de clases por modelado suave independiente (Soft Independent Modeling of Class Analysis, SIMCA) (Wold, 1976). Este análisis se basa en que cada clase pertenece a un modelo de componentes principales y los límites están determinados por estadísticos. Por otro lado, existe el modelaje de clases inequívoco (UNEQ, Derde & Massart 1986) que se basa en una distribución gaussiana de los datos de las clases utilizadas. Existen numerosos ejemplos en autenticación de alimentos como en aceite de oliva (Gurdeniz & Ozen, 2009), queso (Rodríguez-Saona et al., 2006), vino (Barbaste et al., 2002), leche (Rodríguez et al., 2010) o uvas (Granato et al., 2015) entre otros.

Preprocesado

Esta técnica se ha aplicado históricamente en espectroscopía vibracional (Rinnan et al., 2009), sin embargo, el avance de la espectrometría de masas va consolidando un volumen de datos que hacen necesaria esta disciplina (Zeaiter et al., 2005). Esta técnica permite eliminar variaciones en los datos que no nos interesan y focalizarnos en los compuestos de mayor interés (Castillo et al., 2011). El preprocesado consiste básicamente en una modificación de la matriz de datos que nos permita obtener unos mejores valores de precisión y ejecución por parte de los modelos.

Entre, las técnicas de preprocesado más utilizadas se encuentran:

Escalado: encargado de ponderar cada variable hacia un nuevo valor, así las contribuciones individuales son re-ajustadas bajo el mismo parámetro en todas ellas: se pueden utilizar un centrado a la media (La media es restada de cada variable), estandarización (cada variable es centrada a la media y dividida por su desviación estándar), normalización (variables son divididas por la raíz cuadrada de las variables al cuadrado), suma de fila constante (cada variable es dividida por la suma de todas las variables para cada muestra), normalización externa (las variables son normalizadas con respecto a una variable predefinida),

transformación de rango (el valor mínimo de una variable es establecido como cero y el máximo como 1).

Además de las técnicas de escalado, se realizan también transformaciones logarítmicas o la normalización probabilística (Dieterle et al., 2006).

Técnicas de fusión de datos

La técnica de fusión de datos se define como estrategias para unir diferentes fuentes de información de instrumentos analíticos que resulten complementarios (Ouyang et al., 2014). Existen, varios niveles de fusión de datos como son el bajo, medio y alto nivel dependiendo de la estrategia que sigamos en la extracción de información y construcción de las sucesivas matrices (Borràs et al., 2015). Estas técnicas a sus diferentes niveles de concreción se utilizan para unir información de diferentes plataformas cromatográficas (Bajoub et al., 2017), espectroscópicas (Biancolillo et al., 2014) o instrumentales (Borràs et al., 2016).

Validación de resultados

La validación de los resultados es uno de los conceptos más importantes de la ciencia ya que nos permite comprobar la fiabilidad cuando el modelo está clasificando o prediciendo muestras desconocidas y en general, verificar que nuestro modelo funciona correctamente. Es un tema de especial interés ya que, en los últimos años, la pobre verificación y validación de numerosos modelos ha dado lugar a una crisis de reproducibilidad en la ciencia (Baker 2017).

La finalidad de la validación es evitar llegar a resultados excesivamente optimistas e irreales. La validación cruzada es probablemente el procedimiento de validación interna más extendido ya que divide y omite las muestras bajo un patrón (“leave-one-out”, “venetian blinds”, etc.) obteniendo unos resultados o estadísticos del modelo. La validación externa verifica que el modelo final es el más adecuado y utiliza para ello muestras que no han sido utilizada previamente para la construcción del modelo (Westad & Marini 2015). Numerosos estadísticos se utilizan para la evaluación del modelo. Entre los más usados se encuentran las curvas ROC, los valores de sensibilidad (capacidad de dar casos positivos que realmente lo son) y los valores de especificidad (que es la capacidad de dar casos negativos que realmente lo son) (Altman & Bland 1994).

2. Sectores singulares y la protección contra el fraude

El sector agroindustrial español ha crecido con más intensidad en 2017 que el total de la economía, siendo el primer sector industrial en España tras alcanzar máximos históricos en 2016. En Andalucía este subsector es el más importante, representando el 30% del empleo industrial de la comunidad andaluza. Dentro de este sector se encuentran principalmente, el oleícola, el cárnico y el hortofrutícola; por lo que son sectores clave en términos económicos, sociales y de desarrollo de la comunidad autónoma andaluza. Este sector agroindustrial está sostenido por un fuerte sector primario andaluz que supone el 5.9% del valor añadido bruto andaluz frente al 2.6% que representa el sector primario en España (INE, 2017).

Dentro de este sector, el **sector de la producción ecológica** ha aumentado año tras año hasta adquirir cuotas de mercado significativas que están alineadas con la creciente demanda de productos ecológicos en el resto del mundo. De hecho, este organismo afirma que existen más de 50 millones de hectáreas de producción ecológica en el mundo, de las cuales España posee cerca de dos millones de hectáreas siendo el cuarto país en el mundo con más superficie ecológica, detrás de Australia, Argentina y EEUU. Además, es un motor de desarrollo que mueve en torno a los 75 000 millones de euros y que se producen en 179 países (Willer & Lenourd 2016). El hecho de que los productos ecológicos estén a un precio muy superior en el mercado, promueve que tengan que existir mecanismos de control en el proceso de elaboración y a lo largo de la cadena alimentaria, así como en su etiquetado. Estos controles son necesarios debido a que, estos productos de mayor valor son objetivo de un mayor número de técnicas fraudulentas.

El **sector del cerdo ibérico** es un sector clave de desarrollo económico ligado a la dehesa y a las zonas rurales. Actualmente el sector ha crecido hasta niveles previos a la crisis superando los 1 300 millones de euros y contabilizando entre el 6-7% del total de la industria cárnica española (ANICE 2017). Así, este sector cuenta con 16 416 explotaciones ganaderas, 80 mataderos en España y más de 500 empresas de transformación.

En Andalucía, el sector del porcino ibérico y la producción ecológica representan dos sectores clave por la calidad de su producción y el prestigio internacional del que gozan. Por ello, estos sectores, a pesar de contar con protocolos de gestión y

supervisión de la calidad externos, resulta imprescindible dotar al sector de herramientas analíticas que mejoren los sistemas de control de calidad existentes.

2.1. El sector de la producción ecológica.

El Ministerio de agricultura define la agricultura ecológica como un compendio de técnicas agrarias que excluye normalmente el uso, en la agricultura y ganadería, de productos químicos de síntesis como fertilizantes, plaguicidas, antibióticos, etc., con el objetivo de preservar el medio ambiente, mantener o aumentar la fertilidad del suelo y proporcionar alimentos con todas sus propiedades naturales (MAPAMA, 2018).

Este tipo de agricultura vive un momento expansivo de sus mercados y sus producciones agrícolas en Europa y en el mundo (Willer & Lenourd 2016). Así se resume en algunas estadísticas de 2016 en las que Europa aparece como el segundo continente con mayor porcentaje de agricultura ecológica. A nivel global, este sector cuenta con 2.4 millones de productores y como consecuencia da lugar a una enorme variedad y diversidad de tratamientos agrícolas, genéticas diversas y prácticas culturales diferenciadas. Esto da lugar a una gran heterogeneidad del producto incluso dentro de Europa, que es el origen, como veremos más adelante, de la problemática sobre la identificación y trazabilidad del producto ecológico frente a otros sellos de calidad europeos.

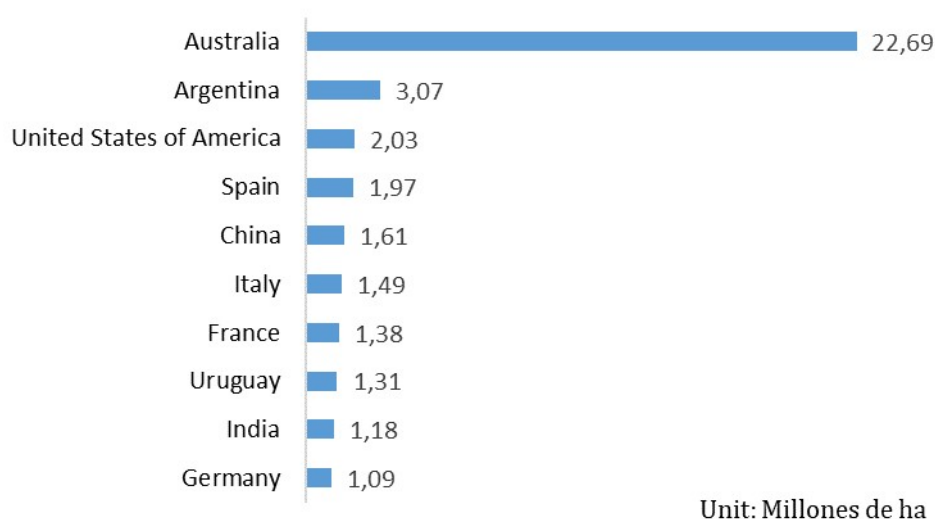


Figura 3. Superficie total dedicada a producción ecológica en el mundo (IFOAM 2016)

A nivel español, España cuenta con 1.97 ha de superficie de ecológico y se sitúa como el cuarto país con más superficie detrás de países más extensos en superficie como son Australia, Argentina o los Estados Unidos. Además, la superficie de

ecológico ha tenido un crecimiento sostenido en los últimos años con un leve freno provocado por la crisis económica a comienzos de la década.

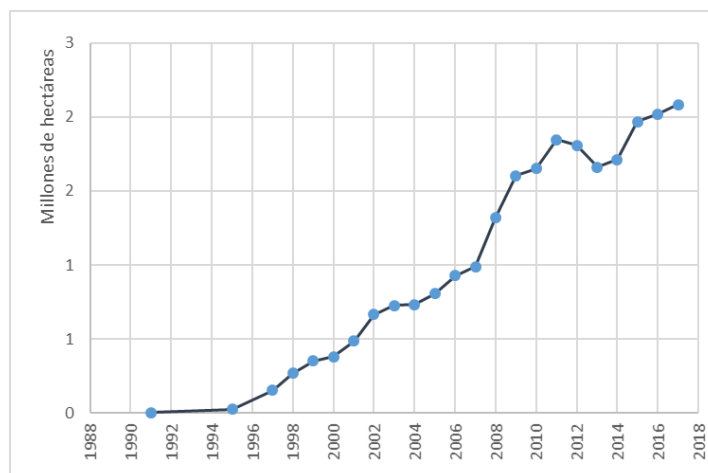


Figura 4. Evolución histórica de la superficie dedicada a ecológico en España (MAPAMA, 2017)

Volviendo a nuestro caso concreto, Andalucía es una región líder de Europa en producción Ecológica. A nivel nacional, supone más del 50% de la superficie total ecológica de España, con un más de un millón de hectáreas de ecológico.

Dentro de esta superficie total, destacan especialmente la proporción dedicada a pastos y a dehesa (contabilizando 678 426 ha) que representa un porcentaje superior al 60% con respecto al resto (MAPAMA, 2016). En particular, ese porcentaje elevado en pastos hace que el porcentaje en otros sectores, como el de frutales ecológicos en Andalucía no destaque. Como se puede observar en la figura 5, el reparto de superficie de frutales se reparte de manera atomizada entre las distintas comunidades. Así, Andalucía no muestra el potencial que le correspondería por superficie en este sector ecológico.

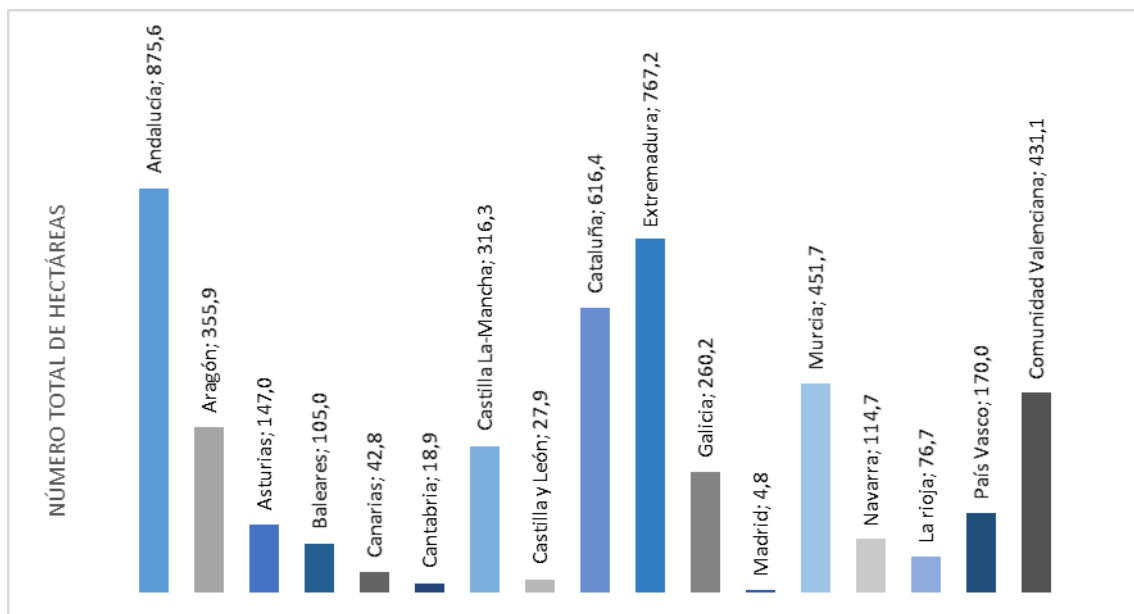


Figura 5. Superficie total de frutales dedicada a ecológico en España (MAPAMA, 2015)

Son numerosos los motivos que frenan el crecimiento de la fruticultura ecológica andaluza. Entre ellas, la dificultad técnica de sus cultivos o el coste de oportunidad que han tenido frente a otros cultivos, como el olivar o el almendro. Además, la prohibición del uso de plaguicidas de síntesis química en agricultura ecológica constituye el factor limitante para el desarrollo de los frutales de hueso debido al gran número de plagas y enfermedades que tienen una incidencia en las zonas de clima templado como España (Daza et al., 2012). En cambio, en otros cultivos como el sector de los cítricos ecológicos, Andalucía lidera con holgura su producción con el 60% de la superficie dedicada a la citricultura ecológica nacional (figura 6).

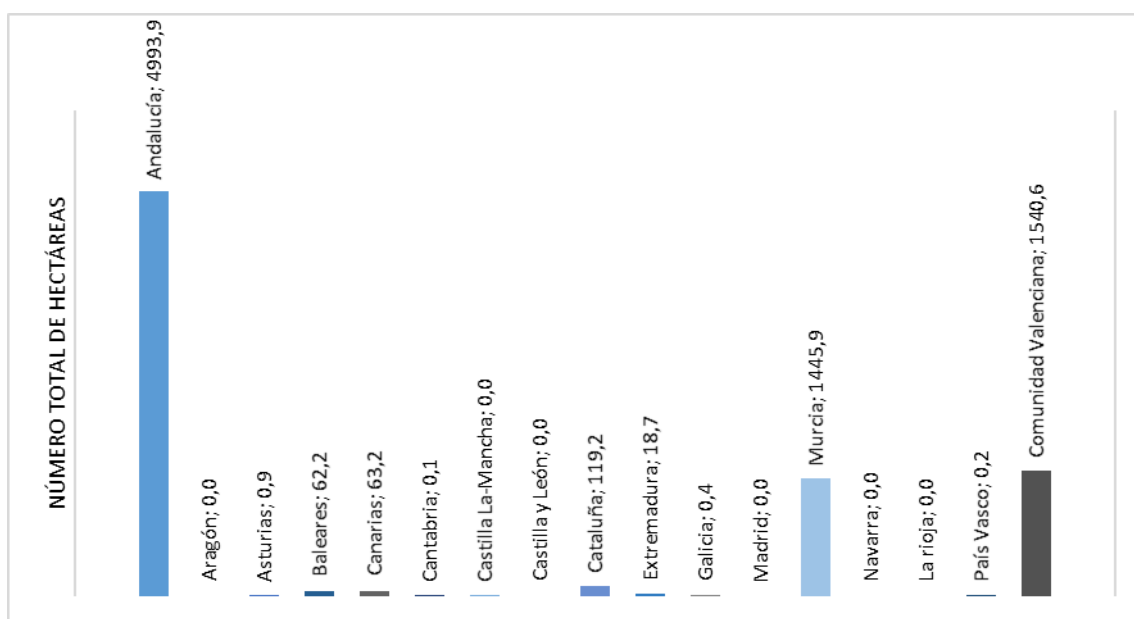


Figura 6. Superficie total de cítricos dedicado a ecológico en España (MAPAMA 2015)

Por otro lado, está la producción hortícola. Un producto que cotiza a mayor precio en los mercados internacionales. Así, Almería fue la provincia que más valor ingresó por las exportaciones de productos agroalimentarios en el primer semestre de 2018 (1 903 millones de Euros) siendo los países europeos los que concentran el 77% de estas exportaciones (Extenda, 2017). Así, Andalucía lidera las exportaciones agroalimentarias españolas con el 24% del total y un valor de 7 436 millones de euros.

El precio de los productos ecológicos es mayor que el de los convencionales. Y esta tendencia se puede observar en las cotizaciones en origen de varios productos agroalimentarios andaluces (figura 7). De media en productos hortícolas podríamos estar rondando los 10-20 céntimos de euros más en ecológico y entre 10 y 30 céntimos más en cítricos ecológicos. En el caso de los transformados ecológicos, solo disponemos de datos del aceite, que rondan los 50 céntimos y 1 euro de margen para el producto ecológico. En ninguna ocasión, el producto ecológico obtuvo un precio menor en ninguna de sus variantes (hortícola, cítrico o transformado) ni en ninguno de los años que se monitorizan desde el observatorio de precios de la Junta de Andalucía (Observatorio de precios de Andalucía, 2017).

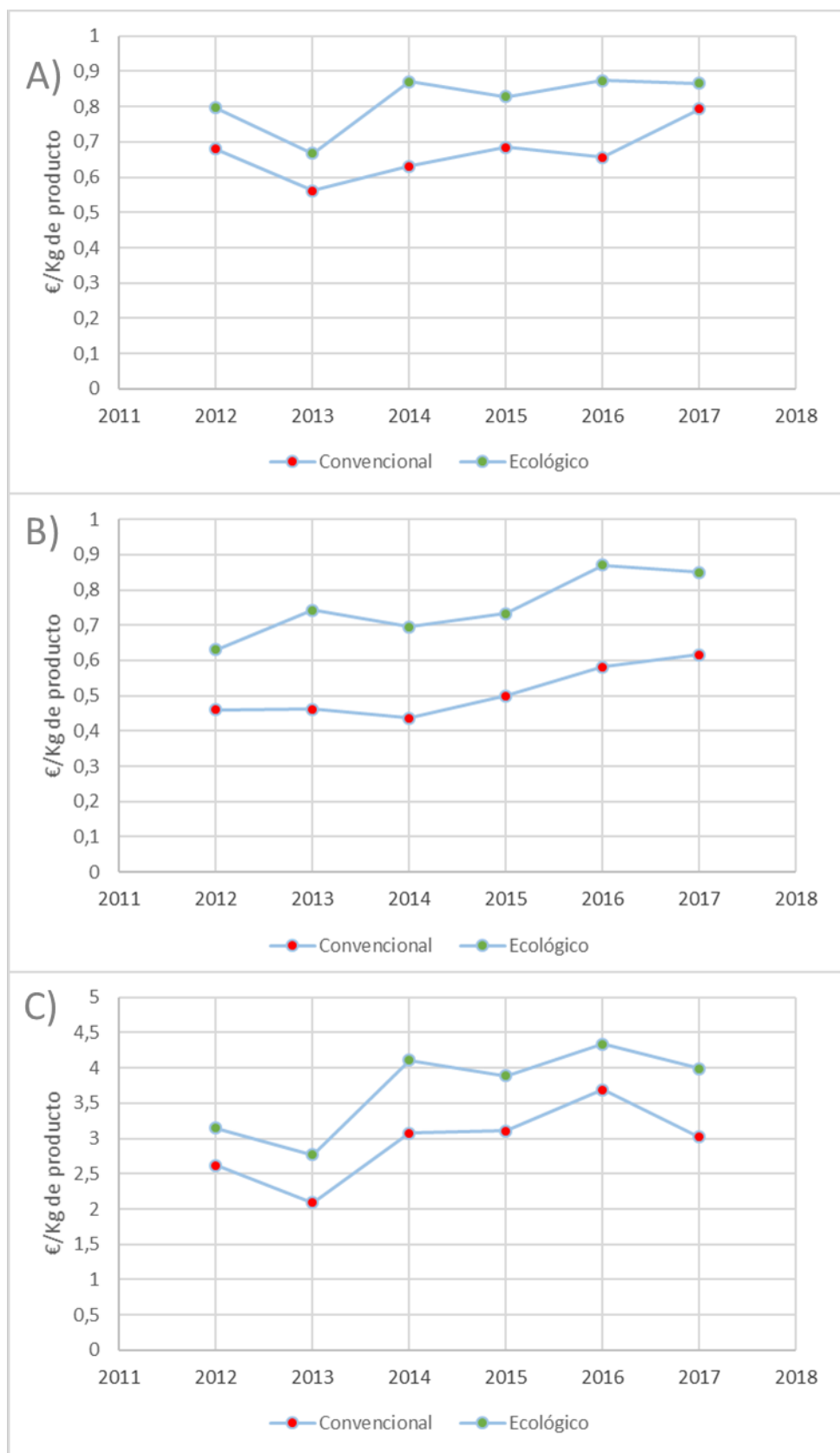


Figura 7. Precios medios anuales de la producción ecológica con respecto a la convencional en A) hortícola protegido (tomate), B) cítricos (naranja) y C) transformados (aceite de oliva) (Fuente: Observatorio de precios de Andalucía 2017)

A pesar del alto precio que tienen en los mercados los productos ecológicos frente

a los convencionales, numerosos autores han sugerido una creciente tendencia a la compra de productos ecológicos en los últimos años (D'Amico et al., 2016, Lee et al., 2016; McFadden & Huffman, 2017). Las razones que mueven al consumidor hacia su compra son:

- (1) el impacto medioambiental (D'Amico et al., 2016, Van Loo et al., 2017),
- (2) la relación entre los alimentos ecológicos y elementos como la salud y la justicia social (De Marchi et al., 2016)
- (3) El bienestar animal (Aetsens et al., 2009; Hasselbach & Rossen, 2015)
- (4) Los valores personales (Grebitus et al., 2015)
- (5) Las cuestiones identitarias (de Pelsmacker et al., 2016)

A continuación, presentaremos brevemente las secciones en las que está dividido el bloque de investigación sobre el producto ecológico de la presente tesis. En los cuales se ha incluido un cultivo alternativo, un cultivo tradicional, un producto transformado y un sector auxiliar de la industria agroecológica.

2.1.1. Sector primario, secundario e industria auxiliar ecológica

2.1.1.1. Cultivos alternativos ecológicos. El caso del ciruelo japonés

El nombre común del ciruelo japonés debe su origen a los Estados Unidos ya que este árbol fue primeramente importado desde Japón, aunque es originario de China. El más común de ellos es el *Prunus salicina* Lindl., aunque existen otros como *Prunus americana* Marsch., *Prunus angustifolia* Marsh., etc. El ciruelo es el cultivo de hueso más cultivado en el mundo, con más de 2,5 millones de hectáreas y una producción de 9,9 millones de toneladas, destacando China con 5,9 millones (FAOSTAT 2012). España, con una superficie de cultivo en torno a 16 000 ha y una producción en torno a 230 000 t ocupa la cuarta posición en producción en Europa y es el primer exportador (en el mercado de temporada) ya que la contra-temporada la lidera Chile. Actualmente en España, aproximadamente el 70% de la superficie de ciruelo son variedades de ciruelo japonés (*Prunus Salicina* Lindl.) y el 30% restante de ciruelo europeo (*Prunus domestica* L.).

En el caso andaluz, en 2013 hubo una producción de 36 000 t de ciruela en una superficie de unas 3 000 ha. Destaca Sevilla con la mitad de la superficie, seguida de Córdoba y Huelva. El cultivo sigue teniendo un gran potencial y desarrollo en el campo de la producción ecológica, no únicamente por los precios del mercado, sino

por la rusticidad del ciruelo japonés a numerosas enfermedades y a su adaptación pedoclimática (Daza et al., 2012).

En nuestro caso, el ciruelo ecológico no representa un porcentaje elevado con respecto a otros cultivos permanentes. Los elevados costes productivos de las plantaciones de frutales y su elevada susceptibilidad a plagas y enfermedades hacen que la superficie certificada sea limitada. Si bien, en los últimos años se viene realizando investigaciones para su adaptación al sistema agroecológico andaluz, como un cultivo permanente alternativo.

A nivel de fruto, son drupas medianas (2-8 cm de diámetro), ovoides o globosas, muy variables en tamaño. Consiste en un epicarpio cubiertos por una capa de cera que hace que su superficie sea impermeable y protege a los frutos de la pérdida de agua. Por otro lado, posee un mesocarpio carnoso de color variable y un endocarpio duro (Roussos et al., 2014).

A nivel composicional, las ciruelas son ricas en metabolitos secundarios como flavonoides o ácidos fenólicos con una alta capacidad antioxidante (Kim et al., 2003), siendo los compuestos fenólicos, los principales responsables de esta capacidad (Kristl et al., 2001; Ogah et al., 2014). Además, las ciruelas son abundantes en ácidos orgánicos (Lombardi-Boccia 2004 et al.), carotenos (Gil MI, 2002) y antocianinas (Díaz-Mula et al., 2008), aunque algunos factores agrarios como la posición de estos frutos en el árbol puede afectar a la cantidad de éstas (Murray et al., 2005). Existe cierta controversia en cuanto a cómo el ecológico afecta a los compuestos biofuncionales de la ciruela. Pese a que el cultivo ecológico tiende a incrementar estos valores o a no modificarlos, el estudio de Lombardi-Boccia (2004) encontró mayores concentraciones de polifenoles totales y algunos flavonoides y carotenos en la finca "convencional". A pesar de ello, este estudio se realizó únicamente en variedades amarillas, por lo que era necesario estudiar estos resultados más exhaustivamente con un mayor número de variedades y años.

Con respecto a los volátiles, numerosos compuestos se consideran claves en el aroma de ciruela (Louw & Theron, 2012) y dependen de numerosos factores como la variedad, la climatología, la maduración (Visai & Vanoli 1997; Vendramini & Turgo 2000) o la tecnología postcosecha (Botondi et al., 2003). La literatura en torno al perfil volátil en la ciruela y cómo interaccionan a nivel de manejo, con variedades y años es un campo científico por explorar. El estudio de estos perfiles

volátiles tiene una aplicación en el conocimiento de los manejos agrícolas, en los programas de mejora genética e incluso en sus posibilidades de ser trazadas.

2.1.1.2. Cultivos tradicionales ecológicos. El caso del naranjo dulce

La naranja es una de las frutas más populares en todo el mundo (Roussos, 2016). Cabe destacar algunos países productores, como Brasil que lidera la producción mundial con 17 millones de toneladas. En nuestro caso, España lidera a nivel europeo la producción de cítricos con una producción en torno al 1.5 millones de toneladas producidas cada año (FAOSTAT 2017). Hay que destacar la relevancia de los cítricos en Andalucía. Los cítricos son el segundo cultivo permanente más importante en Andalucía detrás del olivar, siendo la naranja dulce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) la más importante, con más del 70% de la superficie destinada (CAPDR, 2009). En Andalucía, la superficie dedicada a este cultivo ha experimentado un incremento en la última década desde las 50 000 ha (Anuario MAPAMA, 2006), hasta las 60 000 actuales (Anuario MAPAMA, 2016), si bien sus rendimientos han crecido en torno a un 40%.

En cuanto a su distribución varietal, la variedad ‘navelina’ es la más extendida dentro del grupo “navel” mientras que la ‘salustiana’ es la más extendida entre las que son de tipo “blancas”. En cuanto a la distribución provincial del naranjo dulce, la lidera Sevilla (23 000 ha), seguida de Huelva (11 000 ha) y Córdoba (7 000ha).

Los frutos producidos son de medianos a grandes (5-10 cm de diámetro), redondos, globosos o ligeramente ovalados, consistentes en un epicarpio (flavedo, usualmente amarillos o anaranjado con vesículas que contienen aceites esenciales), un mesocarpio (albedo, compuesto por una esponjosa capa blanca) y el endocarpio (la pulpa, formada por hesperidios que contienen el zumo). La pulpa es jugosa, amarilla, naranja o ligeramente rosada con sacos membranosos en 10-14 segmentos derivados de los lóculos del ovario.

El futuro del sector se encuentra con numerosas incertidumbres, por un lado, la viabilidad y desarrollo de las plantaciones existentes con la limitación de recursos hídricos (Directiva marco del agua, directiva (CE) nº 2000/60/CE) y por otro lado la búsqueda de nuevos mercados. Para afianzar el sector es necesario la modernización del mismo, incorporando nuevos sistemas de producción, diferenciándose a través de un distintivo de calidad (IGP, DOP, etc.), mejorando la

calidad de sus producciones o moviendo el sector hacia un plano de producto transformado que sea capaz de alcanzar un mayor valor en la cadena.

La mejora de esta calidad es fundamental como herramienta de diferenciación del resto de producciones, aunque las componentes que definen su calidad están en un proceso de cambio. Así, numerosos criterios nuevos se han ido incorporando como su contenido nutricional (compuestos fenólicos, carotenoides...) u organoléptico (aroma, dulzor, acidez).

Con respecto al perfil aromático, la naranja y el zumo de naranja han sido ampliamente estudiados en literatura, ya que este perfil aromático es un factor decisivo en la elección y aceptación por parte del consumidor (Pérez-Cacho & Rouseff 2008). El zumo de naranja es un sistema heterogéneo de dos fases, consistente en el serum, una fase acuosa que contiene los compuestos solubles en agua (como azúcares o ácidos orgánicos), y una fase insoluble que a su vez se divide en pulpa y nube dependiendo del tamaño de las partículas (mayor o menor de 2 μm). El aroma del mismo está compuesto por ambas fracciones, los compuestos de la pulpa son principalmente mono y sesquiterpenos hidrocarbonados, mientras que en el serum abundan los compuestos oxigenados (butirato de etilo y octanal) (Brat et al., 2003).

Una herramienta útil para la diferenciación de los cítricos, en un sector tan desarrollado y atomizado son las alternativas producciones agrícolas. En concreto, el caso de la producción ecológica. Así, este sector se ha ido adaptando hacia la producción ecológica principalmente por dos motivos: la alta rusticidad a plagas (comparado con los frutales de hueso) y el mayor margen comercial.

2.1.1.3. El producto transformado ecológico. El zumo de naranja

Según la Directiva (CE) nº 2001/112/CE, el zumo de frutas se define como un producto susceptible de fermentación, pero no fermentado, obtenido a partir de frutas sanas y maduras, frescas o conservadas por el frío, de una o varias especies, que posea el color, el aroma y el sabor característicos de los zumos de la fruta de la que procede. En el caso de los cítricos, el zumo debe proceder del endocarpio de la fruta.

De acuerdo con la legislación actual (Real Decreto nº 1050/2003), dependiendo del tratamiento industrial al que son sometidos, se pueden encontrar distintos tipos de zumos:

- Zumos frescos de fruta: Son zumos obtenidos directamente a través de frutos sanos, frescos, maduros y lavados que son obtenidos mediante procesado industrial autorizado. Estarán constituidos por el líquido solo, clarificado, o por el líquido y pulpa en suspensión correspondientes al endocarpio y estarán exentos de restos de epicarpio, mesocarpio y semillas.
- Zumo de frutas a base de concentrado: es el producto obtenido mediante la incorporación de agua al zumo de frutas, la restitución de los aromas y la pulpa (recuperados del proceso productivo de la misma especie). El agua añadida deberá presentar características adecuadas.
- Zumo de frutas concentrado: Es el producto obtenido a partir del zumo de frutas de una o varias especies en las que previamente se ha eliminado físicamente el agua. Cuando el producto sea para consumo humano, la eliminación de agua será de al menos de un 50%.
- Zumo deshidratado o en polvo: producto obtenido tras la eliminación de la práctica totalidad del agua.
- Néctar de frutas: es el producto que se obtiene por adición de agua y azúcares de las categorías anteriores.

La Asociación Europea de Productores de Zumos (AIJN) ha publicado que, en 2018, el consumo de zumos ascendió a 9 187 millones litros, de los cuales los mayores consumidores fueron Alemania (2 342 millones litros) y Francia (1 406 millones de litros). Dentro de los zumos, el transformado de naranja es el mayoritario, con un 36% del total de los zumos producidos (AIJN, Informe anual de consumo 2018). En este mismo documento, destacan las oportunidades y desafíos a superar en el sector de zumos ecológicos y que a pesar de que la producción de zumos “premium” es limitado, este tipo de zumos es una tendencia en países como España y Francia (AIJN, Informe anual de consumo 2018).

En cuanto a la autentificación de zumos de naranja, las investigaciones se han centrado en la verificación y autentificación de las variedades utilizadas (Abad-García et al., 2012); el origen geográfico (Simpkins et al., 2000) y las adulteraciones de los mismos (Vigneau & Thomas, 2012; Jandric et al., 2014), no existiendo literatura sobre zumos de naranja ecológicos y convencionales.

2.1.1.4. La industria auxiliar ecológica. El caso de los fertilizantes

Andalucía también es líder en cultivo protegido, superando las 36 000 hectáreas de cultivo protegido (CAPDR, 2017). En el que destacan principalmente la horticultura protegida y los frutos rojos. La horticultura ecológica almeriense destaca por sus rendimientos y dependencia de los fertilizantes ecológicos. Así, a nivel mundial, los rendimientos de los cultivos han aumentado constantemente y la seguridad alimentaria ha mejorado debido al incremento de los fertilizantes químicos y la tecnificación agrícola (Tilman et al., 2002). Por contrapartida, los fertilizantes químicos causan deterioro del suelo, emisiones de gases efecto invernadero y la contaminación de aguas subterráneas (Zhang et al., 2013; Stuart et al., 2014). Entre las soluciones técnicas disponibles, están los fertilizantes de liberación lenta, la rotación de cultivos, la agricultura de precisión o el uso de fertilizantes orgánicos (Boli et al., 2011). Estas soluciones técnicas y el incremento de la agricultura ecológica y de los fertilizantes orgánicos de bajo impacto medioambiental han estimulado los rendimientos, a la vez que han minimizado los impactos medioambientales.

A pesar de que la filosofía de la producción ecológica está basada en la reducción de los inputs que se incorporan desde el exterior, este hecho es particularmente difícil en regiones semiáridas o áridas que tenemos en las producciones de Almería. Así, la mayoría de agricultores suplementan la fertilidad del suelo con el uso de fertilizantes ecológicos adquiridos comercialmente y que cumplen la normativa Reglamento (CE) nº 889/2007 sobre los fertilizantes utilizables en la producción ecológica.

A lo anteriormente expuesto, se une que la legislación de fertilizantes es compleja, ya los fertilizantes, por el hecho de ser fertilizantes deben estar recogidos en alguna de las dos normas reguladoras, la europea (Reglamento (CE) nº 2003/2003), o la nacional (Real Decreto nº 999/2017). Éstas regulan la producción, composición y etiquetado de los mismos. A su vez, en casos excepcionales dependen de otras legislaciones, como el caso del Real Decreto nº 476/2014. Por último, en el caso de los fertilizantes ecológicos deben cumplir además con el anexo I del Reglamento (CE) nº 889/2008 que regula los fertilizantes y acondicionadores de suelo permitidos en agricultura ecológica. Asimismo, algunos fertilizantes se registran en el anexo II (fitosanitarios

ecológicos) de este mismo reglamento en vez de estar en el anexo I (fertilizantes ecológicos) ya que es posible atribuirle algún atributo fitosanitario.

Los acondicionadores de suelo y fertilizantes pueden estar permitidos en cultivo ecológico (Reglamento (EC) nº 834/2007) y, por tanto, se aplica un reglamento específico en el que se detallan las condiciones que deben alcanzar los mismos (Reglamento (CE) nº 889/2008).

La caracterización de la firma isotópica del nitrógeno de los fertilizantes se trató anteriormente en numerosos artículos (Vitoria et al., 2002; Girard et al., 2011, Zielinski et al., 1997, Freyer 1974, Bateman et al., 2007) en base a su impacto en la producción final e incluso en los paisajes en los que se aplican (Choi et al., 2017). El nitrógeno atmosférico posee por convenio internacional un valor $\delta^{15}\text{N}=0\text{‰}$ y pasa a los paisajes agrícolas a través de la fijación biológica de microorganismos y plantas, así como a través de fertilizantes sintéticos obtenidos mediante el proceso Haber-Bosch (Schlesinger, 2009). Estos dos procesos no generan fraccionamiento en el nitrógeno, por lo que la fijación biológica y los fertilizantes de síntesis tienen un valor cercano a 0‰ (Shearer & Kohl 1989). Por otro lado, los fertilizantes ecológicos obtenidos a través de estiércoles, purines o tejidos animales y vegetales dan lugar a fertilizantes enriquecidos con ^{15}N (Bateman et al., 2005, Bateman & Kelly, 2007) y poseen valores $\delta^{15}\text{N}$ altos.

Históricamente, Kendall et al., (1998) propuso que los fertilizantes ecológicos tenían una firma isotópica mayor que los convencionales con unos valores que se movían entre el $\delta^{15}\text{N}=2\text{-}30\text{‰}$. Posteriormente, Bateman & Kelly (2007) evaluaron por primera vez un gran número de fertilizantes ecológicos cuyos valores se movieron entre los $\delta^{15}\text{N}=0.6\text{-}16.4\text{‰}$. En este estudio ya se incluyeron fertilizantes derivados de las algas y derivados de huesos y sangre. Si bien, desde 2007, el sector de los fertilizantes ecológicos ha avanzado conjuntamente con la agricultura ecológica, especialmente en la última década, en la que la agricultura ecológica ha experimentado la gran expansión, doblando superficie en medio mundo (Willer & Lenourd, 2016).

Sorprendentemente, los fertilizantes ecológicos utilizados en la actualidad, incluyen los derivados de hidrólisis proteica (conocidos como aminoácidos) o correctores cálcicos y de micronutrientes que no han sido caracterizados hasta la fecha, aunque su uso está ampliamente extendido. Es por ello, que urge conocer la

firma isotópica de la que parten los agricultores ecológicos como paso previo a estudiar la composición isotópica que tendrán sus producciones hortícolas con el consiguiente aseguramiento de las producciones.

2.1.2. Sistemas de aseguramiento de la producción ecológica

La agricultura ecológica prohíbe el uso de fertilizantes y pesticidas de síntesis química, y para ello, la agricultura ecológica, como sello de calidad, tiene un sistema que asegura la producción. Así, Andalucía ha desarrollado el Decreto nº 166/2003 por el cual se desarrolla el Reglamento (CE) nº 834/2007 a nivel europeo. Este decreto garantiza que la producción ecológica es una actividad sometida a control. Así se crea la figura de las “certificadoras”, que trabajan en la verificación de los requisitos de producción a través de un tercer actor (designado por autoridad competente) independiente a los intereses del agricultor.

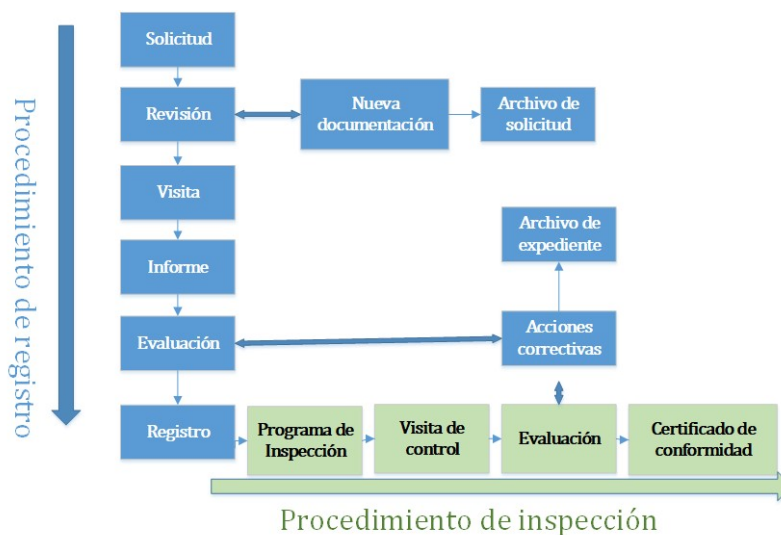


Figura 8. Procedimientos de registro e inspección de la producción ecológica

En la figura 8 muestra el esquema de procedimiento de registro e inspección de la norma. Así, la certificadora realiza el acto de inspección. Por tanto, la certificadora es la entidad en la que se ha delegado la responsabilidad de inspeccionar y certificar la producción ecológica. En concreto, puede certificar productos agrícolas y ganaderos provenientes de la producción primaria, las algas, productos de la acuicultura, transformados alimentarios, levaduras y piensos para animales (Decreto nº 166/2003).

La certificación se realiza a través de la “evaluación de conformidad” en el que la certificadora emite un documento con los procedimientos establecidos por el

operador y de los procesos que tienen lugar en cada unidad de producción. Así, los operadores ecológicos se someten a un régimen de control. Finalmente, si el resultado (informe) no es conforme, se comunica al operador para que pueda resolver los aspectos considerados. A continuación, se le notifican las acciones correctivas a realizar. Por el contrario, si el informe es positivo se emite el certificado de conformidad.

El procedimiento de certificación se puede resumir en cuatro pilares:

1. Identificar la localización de la finca
2. Realizar la descripción de la finca
3. Tener actualizados los registros
 - a. Proveedores (materias primas recibidas en la unidad de producción).
 - b. En la recepción (semillas, fertilizantes y fitosanitarios).
 - c. En el almacenamiento (locales acondicionados).
 - d. En destino (productos ecológicos producidos).
 - e. En expedición: Cantidades y naturaleza de producto que sale de la unidad de producción.
4. Disponer de la trazabilidad de la producción

A pesar del procedimiento (Decreto nº 166/2003), estos organismos de control carecen de técnicas instrumentales de análisis para verificar que se ha llevado a cabo una fertilización correcta acorde a legislación (Reglamento (CE) nº 834/2007). De esta manera, el sector de la producción ecológica urge de técnicas analíticas avanzadas que les permita resolver las situaciones de conflicto que puedan presentarse a lo largo del proceso de certificación.

2.1.2.1.- Los parámetros de calidad en la producción ecológica

Con respecto a la calidad de la producción ecológica se busca principalmente la ausencia de tóxicos y pesticidas más que un valor nutricional diferente (Lairon 2011).

A pesar de ello, el estudio de la calidad nutricional u organoléptica de los productos ecológicos ha sido un tema recurrente en la literatura científica (Brandt et al., 2011, Rembiałkowska 2007). Asimismo, los resultados encontrados en la bibliografía son dispares y sin consenso científico (Barànski et al., 2017). En este sentido, merece la pena aclarar que existe una considerable variación de estudios y

de diseños de investigación que dan lugar a resultados que difícilmente son comparables. Los autores Bourn & Prescott (2002) especificaron que existen cuatro principales aproximaciones según el material biológico y métodos utilizados, que se pueden realizar cuando se investiga sobre la producción ecológica:

1. Productos ecológicos y convencionales adquiridos en “retail”.
2. Ensayos de tratamientos de fertilizantes.
3. Ensayos en fincas ecológicas y convencionales.
4. Ensayos en nutrición humana (etiquetados ecológicos y convencionales).

Por lo tanto, estos distintos enfoques pueden dar resultados que difícilmente puedan ser extrapolables entre las diferentes categorías. Los ensayos “en retail” tienen una perspectiva hacia el consumidor, aunque no nos dan conclusiones certeras del impacto del manejo sobre la calidad, ya que desconocemos la historia del producto. Por otro lado, algunos ensayos de fertilización, dan un conocimiento fundamental del efecto de la fertilización, pero no responden a cómo un complejo sistema de manejos (pesticidas, manejo de suelo, rotaciones, etc.) afectaría al valor nutricional de los cultivos. Por otro lado, los ensayos en fincas experimentales en los que se desarrolla un manejo integral de ecológico y convencional son estudios caros, a largo plazo y que requieren de numerosos colaboradores con un cierto nivel de tecnificación. Estos estudios son los potencialmente más útiles para determinar el efecto global (whole-system effect) del manejo ecológico y convencional (Bourn & Prescott 2002). Aun así, los requisitos necesarios hacen que este tipo de estudios sean especialmente limitados en la literatura científica (Bourn & Prescott 2002). Por último, existen los ensayos de consumo de productos ecológicos en nutrición humana, siendo estudios clave para determinar su impacto en la nutrición humana. Desafortunadamente, estos estudios son complejos y costosos de realizar y la literatura existente, es aún más escasa (Hurtado-Barroso et al., 2017). Asimismo, dentro de los estudios de nutrición humana, existen estudios observacionales y de intervención controlada con el objetivo de determinar el efecto del consumo de alimentos ecológicos en la salud humana (Barànski et al., 2017). Los estudios controlados son especialmente limitados y se han realizado en niños (Bradman et al., 2015; Curl et al., 2003; Lu et al., 2005) y

adultos (Curl et al., 2015, Oates et al., 2014) obteniéndose como resultado reducciones en la concentración de pesticidas en orina por el consumo de alimentos ecológico. Y recientemente, un estudio observacional llegó a las mismas conclusiones (Baudry et al., 2018).

En cuanto a la literatura científica sobre el contenido nutricional, Dangour et al., (2009) realizaron la primera revisión sistemática. Este estudio determinó diferencias nutricionales (en nitrógeno, fósforo y acidez titulable) entre los productos ecológicos y convencionales, aunque eran biológicamente plausibles y de poco interés para la salud pública debido a su baja magnitud y naturaleza. Posteriormente, Brandt et al., (2011) observaron un mayor contenido en metabolitos secundarios en las muestras ecológicas (a excepción de los carotenos) y lo relacionaron con la diferente fertilización llevada a cabo en ambos sistemas. A continuación, en otra revisión focalizada en nutrición humana (Smith-Spangler C. 2012) determinó que no existía una fuerte evidencia del potencial nutritivo de los productos ecológicos, si bien, la ingesta podría reducir la exposición a pesticidas y a bacterias resistentes a antibióticos. Posteriormente, a los productos ecológicos se les volvió a atribuir un mayor contenido de compuestos fenólicos. Ya que Baranski et al., (2014) volvieron a publicar otro artículo en el que volvieron a determinar una mayor concentración de compuestos fenólicos y menores concentraciones de cadmio en los productos ecológicos. Recientemente, Brantsaeter et al., (2017) realizaron una revisión sobre los meta-análisis realizados y otras revisiones sistemáticas realizadas hasta la fecha, en el que los productos ecológicos mostraron una mayor capacidad antioxidante (Baranski et al., 2014; Brandt et al., 2011, Hunter et al., 2011, Lairon et al., 2010; Rembiałkowska et al., 2007) y contenido fenólico (Baranski et al., 2014; Brandt et al., 2011, Smith-Spangler C. 2012). Si bien, hay que considerar numerosos aspectos. A pesar de estas diferencias en los compuestos fenólicos y en algunos parámetros nutricionales, las diferencias de estos compuestos no resultaron ser de gran magnitud (Magkos et al., 2003). Además de la poca magnitud de las diferencias, otros autores han puntualizado además que el impacto de los nitratos que han sido determinados en estos estudios es poco representativo en la salud (bajas concentraciones en ambos sistemas) y que las toxinas naturales y el impacto de los pesticidas ecológicos no han sido profundamente estudiadas (García et al., 2016; Magkos et al., 2006). De

esta manera, Baranski et al., (2017) indicaron que no existen aún certezas para otorgarle a los productos ecológicos unas propiedades positivas sobre la salud humana.

2.1.3. Los antecedentes analíticos de autenticación de la producción ecológica

Numerosas técnicas se han utilizado para la diferenciación de productos ecológicos y convencionales, entre las que podemos destacar: los isótopos estables (Rapisarda et al., 2010), los elementos mayoritarios y trazas (Laursen et al., 2011), la metabolómica (Cubero-León et al., 2018), la proteómica (Zorb et al., 2009), el patrón de cristalización de cloruro de cobre (Szulc et al., 2015), la espectroscopía de rayos X (Bortoleto et al., 2008), la transcriptómica (Van Dijk et al., 2012), el análisis multi-residuos (Hoefkens et al., 2018), los compuestos volátiles (Van Ruth et al., 2011), los compuestos fenólicos (Vallverdú-Queralt et al., 2016) y los ensayos in-vitro de capacidad antioxidante (Faller & Fialho, 2009).

De entre todas ellas, el $\delta^{15}\text{N}$ se ha convertido en el “gold-standard” para la autenticación del producto vegetal ecológico (Rogers et al., 2008, Bateman et al., 2007a, Flores et al., 2007). Rapisarda et al., (2010) encontraron un mayor valor de $\delta^{15}\text{N}$ en las naranjas cultivadas sin fertilizantes sintéticos, mientras que el resto de isótopos ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$, $\delta^{18}\text{O}$, $\delta^{34}\text{S}$) no respondieron al tratamiento de fertilización.

A pesar de todas sus ventajas, esta técnica presenta algunas limitaciones como son el uso de cubiertas vegetales (leguminosas) en fincas ecológicas, el uso de estiércoles en fincas convencionales y la variabilidad existente de $\delta^{15}\text{N}$ de los fertilizantes ecológicos (Bateman et al., 2007b)

Bajo un marco teórico, el manejo ecológico implica una serie de operaciones que podrían afectar tanto a la calidad nutricional como a la fertilidad del suelo (Clark et al., 1998), la fertilización (Lee & Kader, 2000) o los tratamientos fitosanitarios (Rembiałkowska et al., 2007), si bien, el efecto global que pudiesen tener en campo estos parámetros podría ser contrapuesto o sinérgico. Es decir, que mientras algunos factores incrementan una variable, otro factor puede disminuirla, de ahí se deduce la importancia de entender como los factores de producción ecológica afectan a la calidad. Asimismo, existen cultivos con unas necesidades nutricionales diferentes de otros, así como una mayor susceptibilidad a infecciones y/o fisiopatías que otros.

De los resultados de estos análisis, se deduce que los productos ecológicos pueden presentar una mayor concentración de compuestos bioactivos. Si bien, la cantidad y calidad de los mismos está fuertemente relacionada con su genotipo, el riego, la salinidad, el patrón utilizado, el acolchado y sus tratamientos post-cosecha (Reilly K. 2013)

En el caso de las frutas, estos productos carecen de valor elevado en los mercados, por lo que el fraude potencial en frutas sin indicación geográfica o de calidad diferenciada se concentra en la producción ecológica.

En nuestro caso concreto, la investigación sobre los productos ecológicos está en aumento. Sin embargo, a pesar de esta tendencia alcista, esta investigación sigue siendo limitada cuando nos enfocamos a un cultivo o un producto. Asimismo, los estudios existentes en naranja ecológica son más numerosos que los que podemos encontrar en ciruela ecológica (figura 9). Esto nos hace enfocarnos de manera diferente en ambas investigaciones ya que el conocimiento de la citricultura ecológica es mucho más amplio que la relativa a la ciruela ecológica.

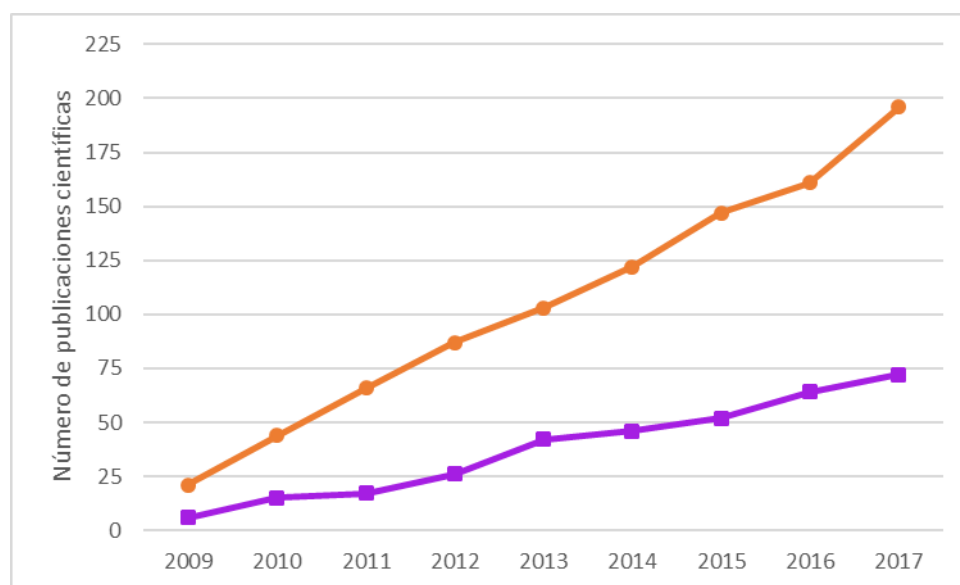


Figura 9. Serie histórica de la literatura encontrada sobre naranja (naranja) y ciruela (morado) ecológicas. Motor de búsqueda: Scopus, WOK y Google Scholar.

En el caso de la naranja, el uso de parámetros de calidad como la acidez, los grados Brix o la capacidad antioxidante han sido utilizados en numerosos estudios para diferenciar la calidad de las naranjas ecológicas (Roussos 2011; Letaief et al.,

2016), si bien, estos parámetros deben ser usados en conjunto con otros para mejorar las clasificaciones (Karabagias et al., 2014).

El contenido fenólico de las naranjas ecológicas frente a las convencionales ha sido ampliamente estudiado (Tarozzi et al., 2006; Faller & Fialho, 2010) si bien, esta técnica posee numerosas limitaciones, ya que estos fitoquímicos responden a las condiciones medioambientales, a técnicas culturales como el riego, la salinidad, la nutrición vegetal (fertilizantes), la interacción con pesticidas (disruptores metabólicos), al genotipo y a las características pedoclimáticas del entorno (Tiwari & Cummins, 2013); aumentando la variabilidad y dificultando su diferenciación. La técnica de isótopos estables ha mostrado una potencialidad para la diferenciación del producto ecológico debido a que se basa en la asunción de que el radio $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ de la planta refleja la fuente nitrogenada utilizada, convencional o ecológica (Laursen et al., 2014).

Camín et al., (2011) demostraron que la determinación de algunos parámetros físico-químicos de calidad junto con el análisis del $\delta^{15}\text{N}$ permitió con éxito la diferenciación entre naranja ecológica y convencional.

Además, numerosos autores han ratificado que estas plataformas analíticas basadas en múltiples parámetros (profiling, fingerprinting, etc.), junto a un apropiado análisis multivariante de datos representarán los resultados más prometedores hacia la autenticación de los productos ecológicos (Capuano et al 2013).

En el caso de la ciruela, los estudios de diferenciación entre ecológico y convencional se centraron principalmente, sobre parámetros agrícolas (Pérez-Romero et al., 2017) o resistencia a plagas y enfermedades (García-Galavís, 2009). Con respecto a la calidad, Daza et al., (2012) estudiaron el color, el peso, tamaño y algunos parámetros de calidad básica como los sólidos solubles totales y la acidez total, la firmeza o materia seca. En la mayoría de las variedades, la producción ecológica produjo frutos más pequeños de peso y tamaño. También confirmó que las variedades negras fueron más oscuras en ecológico, pero no mostraron diferencias en el resto de parámetros de calidad. Pérez-Romero et al. (2014) determinaron la calidad de las ciruelas estaban por el patrón en el que estaba injertado y el manejo ecológico o convencional utilizado.

Los resultados de Lombardi-Boccia et al., (2004), con variedades amarillas, no encontraron diferencias en los macronutrientes, mientras que algunos compuestos y metabolitos secundarios presentaron diferencias debidas al manejo. Asimismo, las ciruelas convencionales presentaron un mayor contenido de polifenoles totales (en torno a un 33 %). En cuanto al perfil volátil, no existe literatura científica referente a ciruela ecológica y convencional. De hecho, las referencias bibliográficas existentes en la literatura sobre ciruela y perfiles volátiles son escasas. En este sentido, Louw & Theron (2012) lo abordaron en algunas variedades y su interacción en procesos de maduración y almacenaje.

Si nos referimos a los productos transformados del zumo de naranja, no existe literatura acerca de los modos de producción realizados a excepción del origen geográfico (Jandrić et al., 2014).

Por otro lado, están los insumos agrícolas. La agricultura ecológica trata de minimizar el impacto medioambiental mediante la fertilización del suelo, reduciendo la dependencia de los cultivos de los fertilizantes inorgánicos y minimizando la contaminación de las aguas subterráneas por nitratos (Di & Cameron, 2002). Así, la agricultura ecológica se enmarca en un modelo de economía circular en el que la revalorización de subproductos agrícolas pueda convertirse en insumos agrícolas sustituyendo de esta manera los fertilizantes de síntesis actuales. A pesar de ello, existen casos en los que la aplicación de fertilizantes externos es necesaria como es el caso de la agricultura intensiva de Almería. Por lo que la demanda de productos ecológicos está estimulando la industria auxiliar como el sector de los bio-fertilizantes y están impulsando así, los rendimientos agrícolas de la producción ecológica. Sin embargo, algunos retos agrícolas deberían abordarse en este crecimiento de la agricultura ecológica. En la actualidad, la agricultura ecológica se enfrenta el desafío de asegurar el suministro de alimentos para una población humana en rápido crecimiento (Forster et al., 2013). Para 2050, la población mundial superará los 9 mil millones y la demanda de alimentos aumentará. Con las tierras cultivables disponibles en retroceso, el objetivo solo se conseguirá intensificando la producción e intentando minimizar el impacto ambiental asociado con este aumento.

De este modo, la agricultura ecológica está moviéndose hacia posiciones más cercanas a los pronósticos poblacionales y agrícolas y los retos de la agricultura

futura. Es decir, hacia métodos de intensificación sobre la base de una agricultura de bajo impacto medioambiental, en definitiva, una agricultura sostenible (Reganold & Watcher, 2016). En este contexto, el papel de la investigación es fundamental para identificar las causas de la brecha de rendimiento existente entre la agricultura convencional y ecológica y poder conseguir rendimientos similares. De hecho, intentar superar esta brecha de rendimiento o la introducción de elementos agro-ecológicos (algunos conceptos de producción integrada, laboreo de conservación o rotación de cultivos entre otros) en las fincas convencionales respondería al desafío que plantea el aumento de la población mundial en las próximas décadas (Ponisio et al., 2015, Gabriel et al., 2013).

En la actualidad, existen diversos tipos de producción ecológica (Nakajima & Ortega, 2015), la mayoría enfocada en la eficiencia de los recursos utilizables (Smith et al., 2015), siendo la nutrición nitrogenada el factor limitante del rendimiento en los sistemas (Seufert, Ramankutty & Foley, 2012). Pero no solo los fertilizantes nitrogenados son necesarios, la mejora de los rendimientos pasa también por los acondicionadores del suelo que mejoran la microbiología del suelo y los micronutrientes, responsables de evitar numerosos estreses abióticos relacionados con la nutrición vegetal.

El uso de cualquier fertilizante en la agricultura orgánica debe ser autorizado por los organismos de inspección apropiados. Las numerosas sustancias permitidas en la agricultura orgánica están reguladas por organizaciones tales como el Reglamento del Consejo Europeo en Europa, el National Organic Standards Board (NOSB) en los Estados Unidos y los Servicios de Acreditación Nacional para la Evaluación de la Conformidad en China. En el caso de Europa, el Anexo I del Reglamento (CE) nº 889/2008 establece las denominaciones específicas, el origen, los requisitos de composición y las condiciones para el uso de fertilizantes y acondicionadores del suelo. Europa está promoviendo su desarrollo y comercialización para impulsar aún más el sector con un reciente documento: "Economía circular: Nuevo reglamento para impulsar el uso de fertilizantes orgánicos y basados en desechos" (15 de marzo de 2017). Una vez adoptado, será directamente aplicable, sin la necesidad de transposición a una ley nacional y las medidas aumentarán y normalizarán el uso de fertilizantes orgánicos por parte de los operadores europeos. Este nuevo reglamento permitirá el reconocimiento de

los fertilizantes orgánicos permitidos en los países europeos para hacer frente al rápido desarrollo del sector.

Debido al número creciente de productos utilizados para la producción de fertilizantes, se han detectado numerosos casos fraudulentos en el campo de los productos fertilizantes y sus mezclas (Verenitch & Mazumder, 2012), por lo que el control parte de la supervisión de los procesos de producción de los fertilizantes.

Así, varios artículos de investigación evaluaron las firmas isotópicas de nitrógeno de los fertilizantes y su correlación en frutas y verduras en diferentes sistemas agrícolas (Inácio et al., 2015, Bateman et al., 2005). Esta diferente firma isotópica de los fertilizantes hace posible discriminar entre productos ecológicos y convencionales (Bateman et al., 2007). Aunque esta firma isotópica depende de numerosas variables, se reconoce ampliamente que las relaciones entre fuente y sumidero (fertilizante-cultivo) en sistemas de producción intensivos son dependientes. A pesar de esta dependencia, este análisis de isótopos estables presenta limitaciones, tales como las firmas isotópicas de nitrógeno para varios fertilizantes ecológicos que podrían caer bajo $\delta^{15}\text{N}=1\text{‰}$ (Bateman & Kelly, 2007).

Otro aspecto importante con respecto a estos estudios es la reciente aparición de acondicionadores del suelo. Hasta la fecha, estos insumos agrícolas no se han caracterizado isotópicamente, pero su contenido de nutrientes influye directamente en la absorción y disponibilidad del nitrógeno suministrado (Fageria & Baligar, 2005). Por ejemplo, cuanto más nitrógeno haya en el fertilizante, más rápida será la tasa de mineralización (Barker & Pilbeam, 2015) y afectará a la firma isotópica. Además, hay un gran número de nuevos bioestimulantes o fertilizantes (varias proteínas hidrolizadas, acondicionadores de suelo) que no se han caracterizado hasta la fecha.

2.1.4. El fraude en la producción ecológica. Antecedentes y actualidad

Principalmente, existen dos técnicas de fraude que se pueden realizar en finca, la aplicación de un fitosanitario no permitido en ecológico y la aportación de fertilizantes no permitidos en agricultura ecológica. En el primer caso, los análisis multi-residuos han avanzado enormemente en la última década, modificando las técnicas de protección de cultivos. Así la implementación de los máximos niveles de residuos permitidos (Reglamento (CE) nº 396/2005) y los protocolos oficiales de control (Reglamento (CE) nº 882/2004) ha reducido este tipo de fraude.

Aunque hasta la fecha, muy poca información acerca de los residuos de pesticidas presentes en los productos ecológicos existe. Éste, es un tema reconocido por la comisión europea (2013/2091 (INI)).

Por otro lado, el control de la fertilización en ecológico sigue siendo una pieza angular para las técnicas de fraude ya que no existe ningún procedimiento normativo que permita conocer que el producto ha seguido una fertilización realmente ecológica.

Los alimentos ecológicos y sus equivalentes convencionales son prácticamente indistinguibles para los consumidores, si bien, puede haber diferencias de precios muy importantes, lo que los convierte en objetivos atractivos al fraude por sustitución del etiquetado. Así lo constató el parlamento europeo en 2013 a través de la aprobación del documento “sobre la crisis alimentaria, los fraudes en la cadena alimentaria y el control al respecto (2013/2091(INI))” en el cual el fraude de alimentos ecológicos era uno de los 10 más expuestos a técnicas de fraude alimentario en Europa. Así, existen numerosos ejemplos de fraude, como el caso del trigo de Rumanía donde se vendieron toneladas de trigo y cereales con certificados falsos de ecológico. En estados Unidos, el ministerio de agricultura (USDA) en 2012 detectó que el 43% de los productos ecológicos estaban contaminados por pesticidas, aunque se le atribuyó a la contaminación cruzada. Además, se han detectado numerosos casos de fraude de productos convencionales etiquetados como ecológicos. El USDA ya ha identificado más de 90 empresas que han vendido productos convencionales como ecológicos (USDA, Fraudulent Organic Certificates; Database 2018).

Aunque este hecho es global y, recientemente, se han identificado fraudes masivos cuyos productos convencionales han pasado como ecológicos en Europa (Gionarle Di Sicilia, 2017, RTL 2018), América Latina (La Republica 2017) o Asia (Shangai Daily 2017). Esta entrada de productos fraudulentos en Estados Unidos y Europa es un hecho que preocupa cada vez más a las autoridades portuarias americanas (USDA, National Organic Program 2017) y al sector ecológico europeo (IFOAM 2012).

Por otro lado, no solo la producción ecológica es susceptible de fraude. El mayor vector de producción en el sector ecológico es la nutrición nitrogenada y se conocen casos de fraude en compañías de fertilizantes. El caso más famoso fue la

compañía Californiana que vendió un producto “fortificante” sintético con cloruro de amonio como ecológico facturando en torno a los 6 500 millones de dólares de ventas (Federal Bureau of Investigation 2012).

2.2. El sector del cerdo ibérico

El sector porcino es el primer sector de la ganadería española con una importancia clave en la economía de nuestro país ya que supone el 12,7% de la producción final agraria y más del 60% de la producción total de carne en España (ANICE 2017). A nivel mundial, España es la cuarta potencia productora después de China, Estados Unidos y Alemania y durante los últimos años, el sector ha crecido notablemente, alcanzando una tasa de autoabastecimiento superior al 170% (MAPAMA 2017). Este autoabastecimiento enfatiza que el sector exterior es elemental para su equilibrio en el mercado. Dentro del sector porcino español, destaca el porcino ibérico que cuenta con el 10% del censo porcino nacional y un reconocido prestigio internacional.

El cerdo ibérico es una especie porcina del suroeste de la península ibérica que incluye una gran variedad de razas o líneas (Diéguez 2000). Este animal está especialmente adaptado al sistema agro-silvo-forestal de la dehesa y está caracterizada por numerosos parámetros ganaderos como su baja prolificidad, un bajo índice de conversión y un lento crecimiento graso.

Esta especie porcina ha estado ligada al dualismo cerdo ibérico-dehesa, siendo éste el único implantado hasta finales de la década de los ochenta proporcionando productos de altísima calidad. Este hecho provocó que el concepto de “ibérico” se relacionase con un producto de alta calidad. Una calidad nombrada incluso desde la época romana (Vargas y Aparicio, 2011).

Posteriormente, otros productores relacionados con el cerdo blanco (El Pozo Alimentación[®]) o empresas provenientes de otros sectores (Bodegas Williams Humbert[®]) se hicieron valer de este prestigio mundialmente conocido e implementaron sistemas productivos más intensivos, principalmente limitando su manejo extensivo y a través de cruces con estirpes blancas como el Duroc más productivas (una raza introducida en los setenta). Estos cruces se realizan a través de vía paterna a fin de mejorar los bajos índices de conversión y prolificidad de los animales ibéricos (Serrano et al., 2008). Si bien, estos cruces terminan afectando a la calidad de los productos frescos y derivados obtenidos (Ramírez- y Cava 2007).

Asimismo, existe una tendencia a incrementar el número de cabezas de ganado intensivo ibérico con respecto a los sistemas extensivos.

Entre las carnes frescas y los productos cárnicos porcinos destacan de manera especial los dedicados al jamón, un producto altamente valorado por el consumidor español (Ruiz et al., 1999). Con respecto a los sellos de calidad garantizada europeas existen 8 sellos dedicados a la producción porcina (5 DOPs, 2 IGP y 1 ETG). De los cuales, cuatro DOPs utilizan exclusivamente al cerdo ibérico (DOP *Guijuelo*, DOP *Jabugo*, DOP *Pedroches* y DOP *Dehesa de Extremadura*). Por otro lado, están los sellos de calidad del cerdo blanco: la DOP Jamón de Teruel, la IGP Jamón de Serón, la IGP Jamón de Trevélez y la ETG Jamón Serrano (presente en todo el territorio). Existe otra denominación DOP referente al cerdo ibérico fuera del territorio español, la DOP Barrancos, localizada en Portugal. En ella se utiliza exclusivamente cerdo ibérico “Porco Alentejano”.

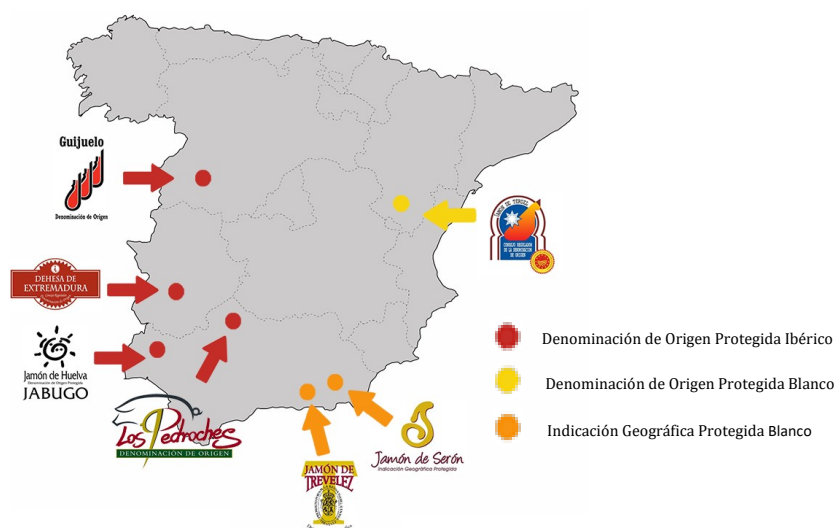


Figura 10. Sellos de calidad de los productos derivados del cerdo en España

En el caso del cerdo ibérico, además de estas cuatro denominaciones de origen y sus propias regulaciones de calidad, en España ha existido un gran número de acervo normativo basándose en las demandas de los consumidores y del propio sector. De esta manera, en el año 2001 el Ministerio de Agricultura publicó el Real Decreto nº 1083/200 (modificado posteriormente en los Reales Decretos nº 144/2003 y nº 1781/2004) donde se aprobaba la norma de calidad para el jamón, la paleta y la caña de lomos ibéricos elaborados en España.

La última norma apareció en 2014, la “Norma de calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomo ibéricos” (Real Decreto nº 4/2014). Esta norma regula la transparencia del sector, estableciendo distintas categorías comerciales y sistemas

de control para evitar fraudes, si bien, ya existían anteriores normas encargadas de garantizar la calidad de sus producciones. Esta norma ha presentado numerosas críticas en el sector, como la exclusividad del Duroc como inseminador eliminando el Duroc Jersey (una especie más adaptada al extensivo) o la homogeneización de categorías, incluyendo manejos diferentes bajo una única categoría, el cebo campo.

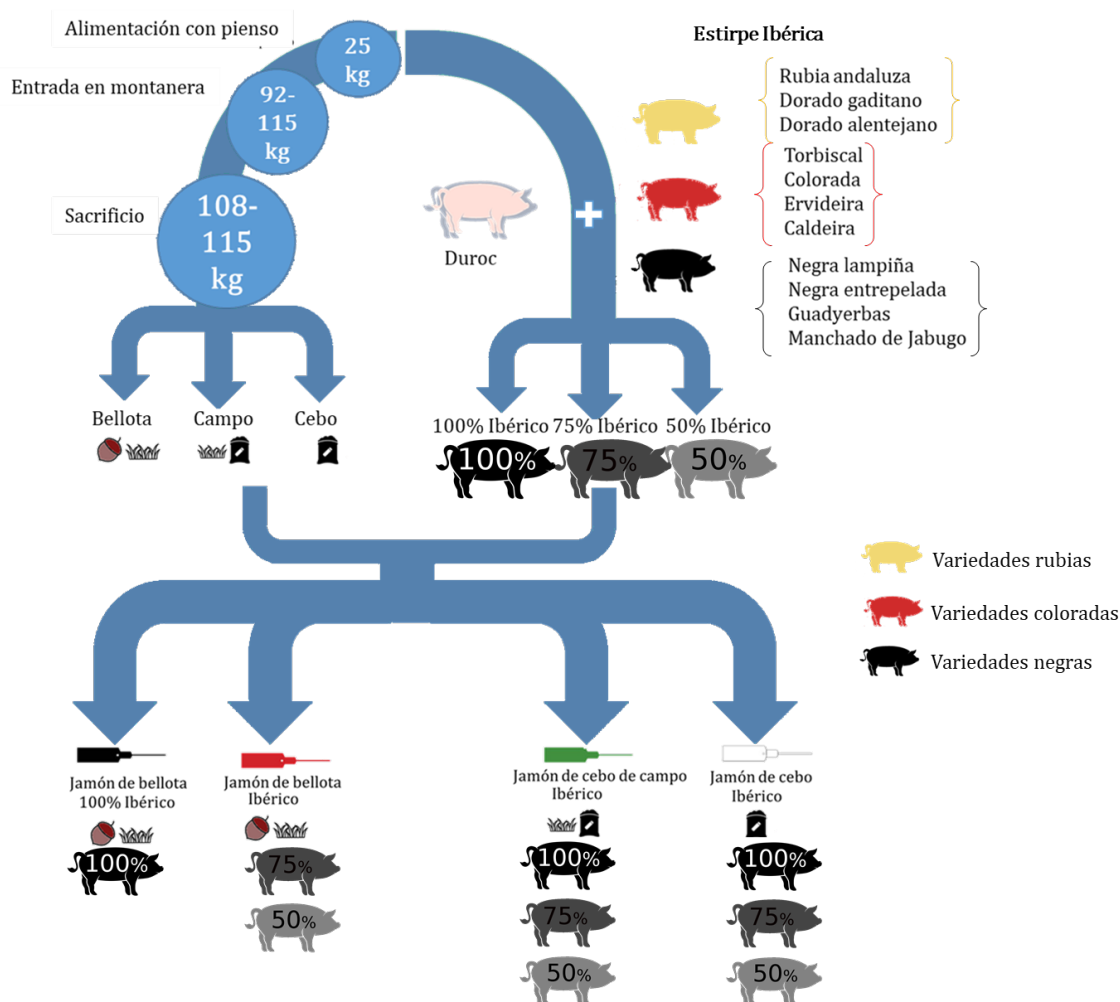


Figura 11. Esquema de requisitos y certificación de los productos del cerdo ibérico amparados bajo la norma de calidad 4/2014 (Elaboración propia).

La norma (Real Decreto nº 4/2014) tuvo varios objetivos, entre ellos, mejorar el etiquetado confuso para el consumidor y armonizar las diferentes categorías existentes entre las diferentes denominaciones de origen. Persiguiendo así, estructurar la oferta de los productos mediante una mayor transparencia. Así, la incorporación de la raza, no solo persigue la protección del ecosistema al que está ligado, sino también las diferentes categorías raciales del cerdo ibérico.

Para todo ello, desarrolló unos precintos de colores y realizó cambios en el etiquetado para mejorar su comprensión en el que se deberían de agrupar el resto

de denominaciones de origen con el fin de conseguir identificar más claramente las cuatro diferentes categorías de calidad acorde a la alimentación seguida por el animal y la pureza racial de los animales. Esta norma establece a su vez las tres designaciones de venta y etiquetado siguientes:

1. Designación por tipo de producto:

Producto **elaborado**: Jamón, paleta, caña de lomo o lomo embuchado o lomo.

Producto **fresco**: obtenido del despiece de la canal, comercializado en fresco.

2. Designación por alimentación y manejo:

- **Bellota**: productos procedentes de animales sacrificados inmediatamente después del aprovechamiento exclusivo de bellota, hierba y otros recursos naturales de la dehesa, sin aporte de pienso suplementario.
- **Cebo de campo**: animales que han podido aprovechar recursos de la dehesa o del campo, han sido alimentados con piensos, constituidos fundamentalmente por cereales y leguminosas, y cuyo manejo se realice en explotaciones extensivas o intensivas al aire libre pudiendo tener parte de la superficie cubierta.
- **Cebo**: animales alimentados con piensos, constituidos fundamentalmente por cereales y leguminosas, cuyo manejo se realice en sistemas de explotación intensiva.

3. Designación por tipo racial:

- **100% ibérico**: productos procedentes de animales con un 100% de pureza genética de raza ibérica, con progenitores con un 100% de pureza racial ibérica y estén inscritos en el libro genealógico.
- **Ibérico**: productos procedentes de animales con al menos el 50% de su porcentaje genético correspondiente a la raza porcina ibérica.
 - 75% ibérico: hembra progenitora de raza 100% ibérica inscritas en libro genealógico y macho procedente del cruce de madre de raza 100% ibérica y padre de raza 100% duroc, ambos inscritos en el correspondiente libro genealógico de la raza.
 - 50% ibérico: hembra progenitora de raza 100% ibérica y macho 100% duroc, ambos inscritos en el correspondiente

libro genealógico de la raza.

Estas diferencias de alimentación y raciales dan lugar a diferentes precios en los mercados, por lo que las categorías superiores son susceptibles de fraude. La evolución de los precios a los ganaderos puede ser seguida a través de la Lonja de Salamanca. De la evolución de los precios con respecto a las vitolas (categorías), cabe destacar la ligera diferencia de precio pagado al ganadero entre el cebo y el cebo de campo y la ligera diferencia existente entre el 100% ibérico de bellota y los cruzados ibéricos de bellota.

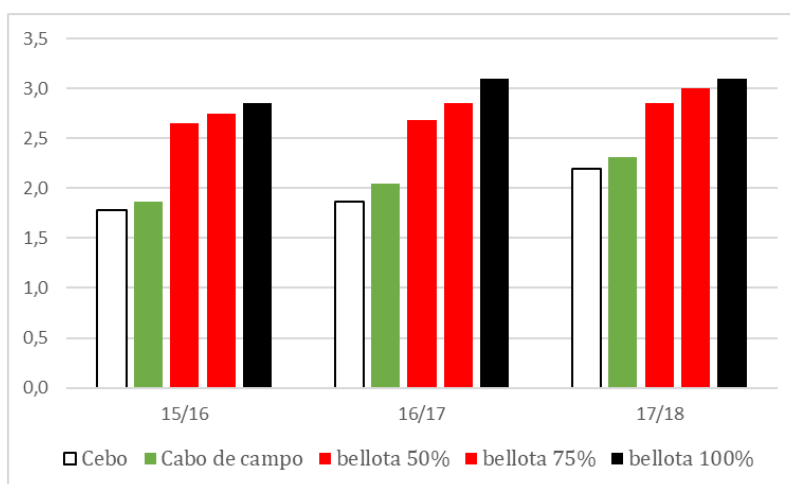


Figura 12. Evolución de los precios (€/Kg) por campaña percibido por categoría en origen (Fuente: Lonja de Salamanca 2017).

En cuanto al número total de vitolas emitidas, el mayor número representa la categoría cebo ibérico con porcentajes en torno al 60-70% del total de las emitidas anualmente. Mientras que en el caso del 100% ibérico de bellota ha habido un crecimiento constante en las tres últimas campañas llegando aproximadamente a doblar su número total y porcentaje con respecto al total de vitolas emitidas a costa del cebo intensivo.

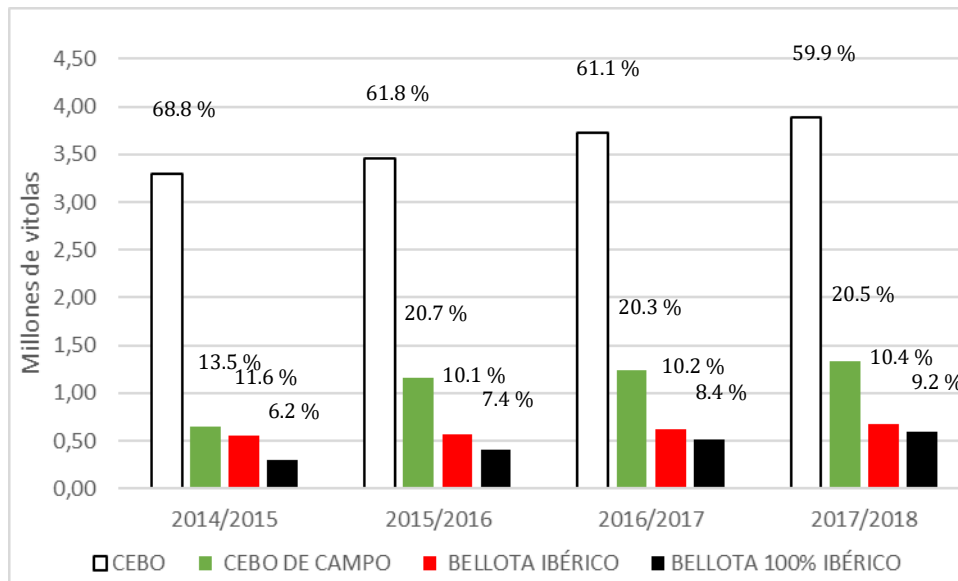


Figura 13. Número total de precintos emitidos por categoría y porcentajes anuales por campaña
(Fuente: Asici, 2017)

Por todas estas razones, es imprescindible la existencia de sistemas objetivos y fiables que permitan controlar la calidad de los productos derivados del cerdo ibérico y que estén englobados en la norma general, independientemente de la DOP que utilicemos.

2.2.1. Sistemas de aseguramiento de la calidad del cerdo ibérico

Actualmente, la norma Real Decreto 4/2014 determina el sistema de control oficial vigente para certificar el régimen alimenticio de los animales, la cual se basa en la inspección visual de los animales en las explotaciones por parte de inspectores autorizados por ISO/IEC 17020. Bajo esta norma, los autorizados demuestran que poseen un sistema de gestión, que son técnicamente competentes y capaces de generar resultados válidos. En el procedimiento, se realiza un cálculo de la superficie arbolada, un estudio del aforo y la carga ganadera máxima admisible y de la documentación. Hoy día se han desarrollado métodos estadísticos y matemáticos de aforo, cuantitativos y cualitativos, basados en estimaciones directas o indirectas para frutos maduros e inmaduros en el suelo. A pesar de que el protocolo de inspección es exhaustivo, el método actual de inspecciones tiene dos grandes debilidades, por un lado, el alto coste que supone el número de técnicos necesarios para cubrir las inspecciones, más recientemente reconocido por el sector por las nuevas exigencias de la ENAC (ABC Sevilla 2018) y, por otro lado, la poca exactitud de algunos cálculos como el del aforo de bellota.

2.2.2. Los antecedentes analíticos de autenticación del cerdo ibérico

Anteriormente a este sistema de inspecciones, históricamente, diferentes grupos de investigación han evaluado diferentes métodos analíticos para autenticar productos derivados del cerdo ibérico según el régimen alimenticio:

-Determinación de grasas: El cerdo ibérico posee un mayor porcentaje de ácidos grasos insaturados, como oleico o linoleico, debido al efecto que el régimen alimenticio tiene en la composición grasa (Flores et al., 1988; Petrón et al., 2004; Pérez-Palacios 2009). Los primeros análisis consistían en la determinación del **punto de fusión** de la grasa, que llegó a ser un método oficial en la campaña 1988-1989. El procedimiento más simple y extendido para la determinación del punto de fusión es el método de tubos capilares (método AOAC, nº 920.157). Así cuanto mayor es la presencia de ácidos grasos insaturados (dobles enlaces) frente a los saturados, menores puntos de fusión se obtienen.

El **índice de yodo** (método AOAC nº 28.023) es una técnica rápida para determinar el nivel de moléculas insaturadas. Este índice de yodo es mayor cuanto mayor es la cantidad de dobles enlaces. Así los productos de bellota tienen un mayor índice de yodo.

El **perfil de ácidos grasos** fue un método oficial en la norma del ibérico, aunque solo aguantó la primera campaña tras la entrada en vigor (Real Decreto nº 1469/2007), la norma anterior establecía el procedimiento de muestreo (Orden nº PRE/3844/2004) y los valores límites para clasificar los animales. Este método presentaba unos buenos valores de repetitividad y reproducibilidad entre los laboratorios (García-Olmo 2002). Los buenos resultados obtenidos por Flores et al., (1998), Cava et al., (1997), Ruiz et al., (1998) y Tejerina (2012) fueron el precedente científico. En ellos, el perfil lipídico de la “bellota” era diferente al “recebo” o “cebo”, mientras que en estas dos categorías solo se observaron diferencias en determinados ácidos grasos (Flores et al., 1998) como el palmítico, linoleico y oleico. Ruiz et al., 1998 indicaron que la zona de muestreo seleccionada influía en los resultados, debido a que la grasa del músculo y del hígado mostraban la ingesta en el corto plazo anterior (semanas) frente a la ingesta en el largo plazo (meses) que se reflejaba en las muestras de grasa subcutánea, que algunos autores situaron en torno a los dos meses precedentes (Ruiz y Petrón 2000). Algunos

autores también han determinado que la posición y lugar del músculo en la que se realiza el análisis también podría resultar diferente (Narváez-Rivas et al., 2009).

Asimismo, la aparición de los nuevos piensos, la dependencia de estos perfiles a lo largo de los años de los recursos disponibles de las dehesas (Tejerina et al., 2011, 2012), del genotipo (Petrón et al., 2004) o del período de montanera (Carraspiso et al., 2017) afectan también a sus valores. Todo esto provocó su derogación.

-Determinación de antioxidantes: Muchos de los recursos disponibles en las dehesas son ricos en antioxidantes (pastos y bellotas) como tocoferoles. Estos compuestos se depositan en el tejido graso y muscular sin sufrir alteraciones en la digestión o metabolismo. Las bellotas (más ricas en γ -tocoferoles) y los pastos (más ricas en α -tocoferoles). Desafortunadamente, esta acumulación de tocoferoles está influida por el régimen alimenticio seguido por el animal por lo que animales en régimen intensivo mostraron similares niveles de γ -tocopherol que los alimentados por bellota (Rey et al., 2006). La determinación de sus formas esteroisoméricas podría ser viable para la discriminación, si bien, éstos varían según la zona anatómica de muestreo y la variabilidad anual de los recursos disponibles en la dehesa y el tiempo de curación (Rey et al 2010).

-Determinación de compuestos volátiles: El perfil de compuestos volátiles puede verse afectado por diversos factores como son el genotipo, sexo y edad de los animales, las especies utilizadas en la elaboración/curación de los productos o el régimen alimenticio (López-Bote 1992, Narváez-Rivas et al., 2011). Actualmente, se han desarrollado nuevas técnicas como describieron Del Pulgar et al., (2013), basada en reacciones de transferencia protónica (PTR-TOF-MS). Esta técnica resulta adecuada, aunque tiene algunas limitaciones como la identificación de los compuestos responsables (marco teórico).

Actualmente, existen otros métodos basados en movilidad iónica que han demostrado un alto potencial diferenciando hasta el 100% de las categorías, pero utilizando las categorías más dispares (cebo VS bellota). Otros estudios realizados con nariz electrónica también obtuvieron resultados prometedores, aunque estos estudios tenían un número de muestras muy limitado. Asimismo, a pesar de ser una técnica más barata y rápida que las tradicionales de cromatografía de gases, también requieren de mucha preparación de muestra como pueden ser el control de la humedad, las altas temperaturas del gas portador, etc.

-Determinación de hidrocarburos lineales: Son compuestos que se encuentran presentes en las fracciones lipídicas. Estos hidrocarburos lineales no sufren modificación durante su ingesta y digestión. Por ejemplo, el neofitadieno es un compuesto presente exclusivamente en los pastos, aunque estos compuestos se podrían incorporar a la dieta o incluso alguno de éstos podrían generarse por medio de reacciones oxidativas de los tejidos (Tejada et al., 2001).

-Determinación de triglicéridos: los triglicéridos (TG) son los lípidos mayoritarios en el tejido adiposo del cerdo ibérico (Perona et al., 2005). La determinación de triglicéridos es más simple que las anteriormente citadas. Esta determinación se realiza actualmente mediante instrumentación de cromatografía de gases (Gallardo et al., 2012). Un total de 17 TG se han identificado en muestras de grasa del cerdo ibérico. Algunos autores han utilizado esta determinación para caracterizar los regímenes alimenticios del cerdo (Díaz et al 1996, Viera-Alcaide 2009; Gallardo et al., 2012) y los distintos genotipos (Petrón et al., 2004, Viera-Alcaide et al., 2009), poniendo de relieve el impacto de la alimentación sobre este perfil. Sin embargo, no existen estudios acerca del perfil de TG con respecto a la alimentación con piensos especiales. Una reciente publicación (Jurado et al., 2013) puso de manifiesto la importancia de técnicas de inteligencia artificial acopladas a técnicas GC obteniendo un porcentaje de acierto en torno al 92%.

-Determinación de ultrasonidos: Esta técnica está basada en la diferente velocidad de las ondas con respecto a la diferente composición grasa existente. Por lo que se presenta como una medida útil al ser no destructiva y económica para controles en línea. Si bien, la temperatura de análisis es un parámetro crucial, además de ser necesario el uso de un acoplante (medio de contacto ultrasonidos-muestra). Niñoles et al., (2010) indicaron que el historial térmico tiene un efecto en las medidas.

-Determinación por tratamiento de imágenes: El análisis de imágenes tiene un largo recorrido desde los sus inicios con imágenes en blanco y negro (Petrón et al., 2003), pasando por el análisis multifractal (Serrano et al., 2012) en el que usaron imágenes RGB de alta resolución y la utilización de otras aproximaciones como son las imágenes de resonancia magnética (Pérez-Palacios et al., 2010, 2011) o la imagen hiperespectral NIR (Garrido-Novell 2015).

-Infrarrojo cercano: De Pedro et al., (1992) demostraron por primera vez el potencial del análisis NIRS para desarrollar modelos multivariantes cuantitativos que permitían predecir el perfil de ácidos grasos de grasas fundidas. Posteriormente, otros autores consiguieron mejores resultados (García-Olmo et al., 2001, 2002, González-Martín 2002; Fernández-Cabañas et al., 2007), incluso en análisis in vivo (Pérez-Marín et al., 2009).

-Determinación de isótopos estables: Diferentes estudios previos evaluaron el potencial de los isótopos estables para la diferenciación del régimen alimenticio del cerdo ibérico. Gonzalez-Martín et al., publicaron en (1999) y (2001) las primeras aproximaciones de isótopos estables del cerdo ibérico utilizando el isótopo estable del carbono ($\delta^{13}\text{C}$). Los resultados mostraron potencial en torno a su régimen alimenticio, si bien, no se especificaba el número de muestras, no se utilizaron animales ibéricos al 50%, ni tampoco se explicó el pre-tratamiento de la muestra, siendo fundamental una fase de extracción de la materia grasa. Posteriormente, otros estudios se centraron en los isótopos del carbono y del nitrógeno, obteniendo un enorme potencial, como el caso de Nieto y Aguilera (2009). Si bien, los autores del trabajo indicaron que “requieren un estudio más profundo y sistemático, antes de que pueda ser efectivamente un método alternativo o complementario a los ya existentes en análisis de trazabilidad”.

Su utilización como método oficial no sentaría precedente ya que, de hecho, algunas técnicas isotópicas se utilizan actualmente técnicas oficiales de la AOAC o la propia UE. Entre los productos se encuentran el vino (Reglamento (CE) nº 555/2008), algunos zumos de frutas (AOAC nº 995.17, AOAC nº 2004.01), o vinagres (Reglamento (CE) nº 555/2008). Habiéndose estudiado en otros productos de interés como lácteos, derivados, aceites o agua mineral.

2.2.3. Los fraudes en el cerdo ibérico. Antecedentes y actualidad

El fraude en el cerdo ibérico se focaliza en malas prácticas ganaderas. Entre las malas prácticas más utilizadas, se encuentran las aplicaciones puntuales de pienso cuando no hay suficiente bellota o es de mala calidad. Otra mala práctica consiste en incorporar al cerdo más tarde a la montanera minimizando el engorde que deben realizar los animales en libertad (montanera). El crecimiento del volumen del cerdo ibérico cabría estar vinculado a la disponibilidad inter-anual de bellota y no parece que este volumen de carga ganadera tenga un efecto en la temporalidad

de las dehesas. Si bien, existen otros factores que limitan la capacidad de bellotas de las dehesas como son la edad, la genética, la vecería, la meteorología y la densidad entre otros (Rodríguez-Estévez, 2007).

A pesar de que el sector ha ganado claridad y transparencia con la nueva norma de calidad del cerdo ibérico (Real Decreto nº 4/2014), ciertas limitaciones como los protocolos de verificación del aforo de bellota, los conflictos relacionados con la pureza racial (Süddeutsche Zeitung 2017), la crisis de los jamones ibéricos en mal estado (El Confidencial 2018a) o las retiradas de los permisos de verificación a certificadoras (Certicalidad y Celtiberico Charro) por parte de ENAC por “supuestas irregularidades” (El Confidencial 2018b) han generado desconfianza dentro y fuera del propio sector.

A pesar de ello, el crecimiento del sector se mantiene en cotas altas ya que el sacrificio de animales de montanera ha aumentado hasta los 720.000 cabezas de ibérico de bellota (Asici 2017). Este gran crecimiento ha provocado que la ENAC obligue a las certificadoras a multiplicar sus inspecciones, con el coste que este tipo de técnicas representan tanto para los ganaderos como para los consumidores finales. Por ello, urge un método analítico que verifique con fidelidad la alimentación de los mismos que evite la subjetividad y los altos costes de las visitas a las explotaciones.

Objetivos

La presente tesis doctoral tiene por objetivo general contribuir al ámbito de la calidad y la trazabilidad alimentaria en productos de alto valor añadido procedentes de dos sectores claves en Andalucía; el sector ecológico y el del cerdo ibérico. Para la consecución de este objetivo general se han utilizado diferentes plataformas analíticas en función de cada objetivo concreto, entre las que se encuentran técnicas cromatográficas y de espectrometría de masas, así como la utilización de técnicas avanzadas de tratamiento de datos, indispensables en algunos casos para el manejo de los datos generados y para la obtención de conclusiones.

Del objetivo general, se derivan los siguientes objetivos específicos englobados en los dos grandes bloques en los que se ha dividido esta tesis doctoral:

Bloque 1: Estudios relacionados con la producción ecológica andaluza, sus características y trazabilidad:

- **Objetivo específico 1:** caracterización del potencial bio-activo y del perfil volátil de un cultivo alternativo en Andalucía como el ciruelo en función de su manejo en modo ecológico o convencional.
- **Objetivo específico 2:** abordar la autenticación de la producción de cultivos tradicionales andaluces como la naranja en función de su manejo ecológico o convencional.
- **Objetivo específico 3:** autenticación de zumos de naranja de calidad diferenciada (Premium) utilizando técnicas analíticas avanzadas junto con análisis multivariante y fusión de datos.
- **Objetivo específico 4:** Clasificación de los fertilizantes ecológicos y convencionales utilizados en agricultura intensiva en función de su $\delta^{15}\text{N}$.

Bloque 2: Estudios relacionados con la normativa aplicada a la producción del cerdo ibérico.

- **Objetivo general 5:** Estudiar la potencialidad de la firma isotópica de las fracciones lipídica y no lipídica de diferentes órganos del cerdo ibérico con objeto de distinguir el régimen alimenticio seguido por el animal.

Aim

The **overall scope** of this PhD Thesis is to contribute to the field of quality and food traceability in high added value products from two key productive sectors in Andalusia; the organic farming and the Iberian pig sectors. In order to achieve this general objective, several analytical techniques have been used, including chromatographic and mass spectrometry techniques. Moreover, the use of advanced data handling techniques is essential for obtaining conclusions.

The general objective derived from the following specific objectives included in the two main blocks in which this PhD Thesis has been divided:

Block 1: Studies related to the organic foodstuffs production of Andalusia, its characteristics and traceability.

- **Specific objective 1:** To characterize the bioactive potential and the volatile profile of an alternative crop in Andalusia, such as the plum fruits, according to the organic or conventional management.
- **Specific objective 2:** To address the authentication of foodstuffs provided by a traditional Andalusian crop, such as orange based on their organic or conventional management.
- **Specific objective 3:** To authenticate organic orange premium juices using advanced analytical techniques coupled with multivariate analysis and data fusion.
- **Specific objective 4:** To classify the organic and conventional fertilizers used in intensive agriculture based on their $\delta^{15}\text{N}$.

Block 2: Studies related to the regulations applied to the Iberian pig production •

- **Specific objective 5:** To study the isotopic signatures of the lipid and lipid-free fractions of different organs of the Iberian pig in order to distinguish the diet followed by the animal.



Material y métodos



Material y métodos

La presente tesis doctoral está constituida por un compendio de publicaciones y estudios en los cuales se detallan los materiales y métodos utilizados. No obstante, con el objeto de dar una visión global de la investigación realizada y facilitar su lectura y comprensión, se ha considerado oportuno incluir este capítulo en el que se detallan de forma concisa tanto el material biológico como la diversa instrumentación utilizada para el desarrollo de todos los estudios incluidos en la presente tesis doctoral.

1. Material biológico utilizado

Para el desarrollo de la investigación en su bloque 1 (producción ecológica) y el bloque 2 (cerdo ibérico) se han utilizado cinco tipos de muestras: naranjas, ciruelas, transformados de naranja, fertilizantes y animales certificados de cerdo ibérico. Las características de los materiales biológicos utilizados se detallan a continuación:

Capítulo 1: Los ensayos se realizaron en fincas experimentales del Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera de Andalucía posee en el centro “Las Torres-Tomejil”. Las fincas convencionales y ecológicas se situaron próximas, en parcelas similares, en el término municipal de Alcalá del Río (37° 30' N 5° 58' O). Ambas parcelas tenían una superficie de 5.500 m² y estaban separadas unos 200 m. Los parámetros edafológicos y climáticos se encuentran detallados en Daza et al. (2012). Los tratamientos fitosanitarios y fertilizantes utilizados en las fincas ecológicas siguieron la normativa comunitaria (reglamento (CE) nº 834/2007 del Consejo, de 28 de junio de 2007, sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos).

Capítulo 2: Los muestreos se realizaron a numerosos agricultores de la zona del Guadalquivir previa reunión y coordinación con responsables del IFAPA de Palma del Río (Córdoba) y con la asociación de productores de cítricos “Palma-ecológica”. Todas las muestras provenían de una zona productora tradicional del valle del

Guadalquivir (37° 43' N 5° 04' O). Los parámetros edafológicos y climáticos resultaron similares en fertilización, manejo de suelo, patrón y clima. Los tratamientos fitosanitarios y fertilizantes utilizados en las fincas ecológicas siguieron la (reglamento (CE) nº 834/2007 del Consejo, de 28 de junio de 2007, sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos).

Capítulo 3: Para el caso de los transformados de naranja, las muestras consistieron en zumos de naranja convencionales y ecológicos 100% exprimidos, con pulpa y pasteurizados conforme al Real Decreto 781/2013 que lo define como “el producto susceptible de fermentación, pero no fermentado, obtenido a partir de las partes comestibles de frutas sanas y maduras, frescas o conservadas por refrigeración o congelación, de una o varias especies mezcladas, que posea el color, el aroma y el sabor característicos del zumo de la fruta de la que proceden”. Estos productos fueron adquiridos en mercados de España y Francia.

Capítulo 4: En el caso de los fertilizantes, la caracterización isotópica se focalizó en los fertilizantes más utilizados y vendidos en la zona de los invernaderos de Almería. Esta información se realizó gracias a la colaboración de empresas comercializadoras de fertilizantes, certificadoras (Comité Andaluz de Agricultura Ecológica, CAAE), agricultores participantes en el proyecto “*Viabilidad de la relación de isótopos estables de nitrógeno ($^{15}N/^{14}N$) como metodología para la caracterización de la producción ecológica frente a la convencional*” y el asesoramiento del IFAPA “La Mojonera”.

Capítulo 5: En este capítulo se muestrearon el hígado, riñón y lomo de animales que fueron seleccionados previamente por la empresa y/o la denominación de origen. Los muestreos “*in-situ*” se llevaron a cabo durante 5 años, en las campañas 2014, 2015, 2016, 2017 y 2018 en los mataderos de Sánchez Romero Carvajal localizado en Jabugo (Huelva), COVAP S.C.A. localizado en Pozoblanco (Córdoba) y en las instalaciones de la Diputación de Huelva localizadas en Huelva.

2. Sistemas de preparación de muestra

Para la preparación de muestras, se utilizaron sistemas de tipo discontinuo que se detallan a continuación:

Equipo de liofilización: Se utilizó un liofilizador “Stoppering Tray Dryer” (Labconco) para llevar a cabo la liofilización de las muestras (Figura 14). El colector trabajó a una temperatura de -80°C y en la zona de desecación se trabajó con un programa automático de temperaturas, partiendo de -40°C con un incremento progresivo hasta los 10°C . La liofilización se daba por terminada cuando la presión era igual a 1 Pa.



Figura 14. Detalle del liofilizador

Equipo de extracción mediante filtrado con solventes: La extracción se realizó usando como extractante isopropanol-hexano (60:40 v/v). El sistema de extracción se diseñó y construyó en el laboratorio (Figura 15) a partir de los siguientes elementos: filtros buncher con un poro de sílice de $5\text{-}15\ \mu\text{m}$, una bomba de vacío Roker 500 (Today's) para impulsar el extractante desde la boca del filtro hasta los colectores, un manómetro de presión y tubos de PVC para construir las zonas de succión desde los filtros hasta los colectores. La extracción consistió en tres ciclos previa verificación de obtener una firma isotópica estable



Figura 15. *Detalle del sistema de extracción y separación de grasa*

Trituración: Las muestras se trituraron en una trituradora SK-3 (Sammic) como paso previo a la liofilización (Figura 16). La trituración se realizó a media potencia (33.3 Hz) durante 30 segundos.



Figura 16. *Detalle de la trituradora de vaso*



Figura 17. *Detalle del molino de bolas*

Molienda: Se utilizó un molino de bolas MM200 (Restch) para la molienda de los productos salientes de la liofilización hasta conseguir un sistema homogéneo adecuado (Figura 17). Se realizó un ciclo de 30 s a 25 Hz.

Agitación: Se utilizó un agitador Vortex V 3 S000 (IKA) en el proceso de extracción y homogeneización de la muestra (Figura 18). En los procesos de mezclado se utilizó a máxima potencia.



Figura 18. *Detalle del agitador vortex*



Figura 19. *Detalle del molino criogénico*

Molienda criogénica: Se utilizó un molino criogénico 6870 Freezer/Mill (SPEX). La molienda se realizó en tres ciclos discontinuos con una frecuencia de 20 Hz. El polvo extraído del molino se congeló a -80°C (Figura 19).

Sistemas de evaporación al vacío: Se utilizó un evaporador de vacío (Figura 20) RapiVap (Labconco). El sistema suministró calor mediante un sistema de calefacción en bloque seco a 30°C sin agitación. El proceso duró 360 min con una rampa progresiva de vacío desde 20000 Pa a 5000 Pa en 180 min y un vacío constante de 5000 Pa durante el mismo tiempo.



Figura 20. *Detalle del evaporador al vacío*

3. Métodos de calidad básica

Estos métodos de calidad básica solo se utilizaron en la experimentación de la naranja a fin de determinar que las calidades entre los manejos ecológicos y convencionales eran similares.



Figura 21. *Detalle del texturómetro automático*

Firmeza: Se determinó la firmeza utilizando un texturómetro Texture Analyser TA.XT Plus (Stable Micro systems). Las muestras de naranja se pelaron y se eliminó el flavedo y el albedo. La medición consistió en la determinación de la fuerza máxima de penetración durante la rotura de tejidos. Se utilizó una sonda de 5 mm de diámetro con una célula de carga de 5 kgf. La profundidad de la medición fue de 5 mm y la velocidad del ensayo fue de 5 mm s^{-1} (Figura 21).

Acidez: La acidez se determinó mediante valoración volumétrica a partir de un valorador automático T70 (Mettler Toledo). Para ello, 10 ml de zumo de naranja se mezclaron con 30 ml de agua destilada y se valoraron con NaOH al 0.1 N (Figura 22). Los resultados de acidez titulable se expresaron como porcentaje de equivalentes de ácido cítrico, el ácido mayoritario en naranja.

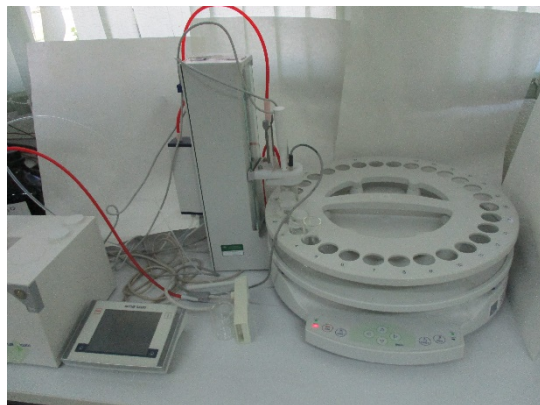


Figura 22. *Detalle del valorador automático*



Figura 23. *Detalle del refractómetro digital*

Sólidos solubles totales: El contenido de sólidos solubles totales en la naranja se determinó mediante refractometría. Para ello, unas gotas de zumo de naranja se depositaron en el refractómetro digital Palette PR-201 α (Atago) (Figura 23) previo calibrado con agua destilada. Los resultados se expresaron en grados $^{\circ}$ Brix.

4. Métodos espectrofotométricos

Espectrofotómetro de placas: Se utilizó un espectrofotómetro de pocillos Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific) UV-vis (Figura 24). El instrumento tiene un rango de trabajo entre los 200-1000 nm siendo capaz de realizar 96 lecturas en segundos. Las mediciones se realizaron en placas de pocillos transparentes



Figura 24. *Detalle del espectrofotómetro de placas (UV-VIS)*

Antocianinas totales: Las antocianinas totales se midieron según el método del pH diferencial previamente descrito por Giusti y Wrolstad (2001). Este método se utiliza para cuantificar antocianinas monoméricas y se basa en una transformación reversible del grupo cromóforo de las antocianinas según los cambios de pH, provocando un cambio en la absorbancia.

Polifenoles totales: Los polifenoles totales se determinaron utilizando el reactivo de Folin-Cicolteau siguiendo el método descrito por Slinkard & Singleton (1977). Este método se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidativos. El reactivo contiene molibdato y volframato sódico. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfowolfrámico a óxidos de wolframio y molibdeno que son cromógenos de azul intenso.

Ensayo por FRAP: Esta metodología se basa en la reducción del complejo de la tripiridiltriazina (TPTZ) férrica al complejo ferroso por la acción de un antioxidante a bajo pH. Esta reacción provoca un cambio de color proporcional en intensidad a la actividad reductora de la muestra antioxidante que se monitoriza. Esta actividad se determina midiendo la absorbancia a 595 nm. Este método está basado en el procedimiento descrito previamente por Benzie y Strain (1996).

Ensayo por DPPH: Este método se basa en el procedimiento descrito por Brand-Williams et al., (1995). En él, se utiliza el radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) que es capturado por los antioxidantes provocando una disminución en la absorbancia medida a 515 nm.

Ensayo por ABTS: Este ensayo se basa en la reducción de la absorbancia de disoluciones de concentración conocida de ABTS 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid). El radical catiónico obtenido es un compuesto estable con un espectro de absorción en el UV-visible. A pesar de no ser un método que mimetice con las situaciones in vivo (bajo potencial redox de reacción) puede realizarse en muestras hidrosolubles y liposolubles, mostrando una alta reproducibilidad. La activación se realizó químicamente con persulfato de potasio.

5. Sistemas cromatográficos

Los métodos e instrumentos utilizados en la parte experimental de esta Tesis Doctoral se describen a continuación:

Cromatografía de líquidos

Se utilizó un equipo HPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific) acoplado a un detector de masa exacta de alta resolución Exactive® Orbitrap (Figura 25). El equipo estaba equipado de un automuestreador y un sistema de inyección automático. Para la adquisición de los espectros y el procesado de los datos, se utilizó el software Xcalibur® y Compound Discoverer® y se realizaron las siguientes determinaciones:

1. Determinación de ácidos orgánicos: La separación se llevó a cabo por medio de una columna cromatográfica Acclaim (4.0 x 250 mm, 5 μ m) y una precolumna Acclaim (4.6 x 10 mm, 5 μ m). La fase móvil fue agua acidificada con 0.2% de ácido metafosfórico (v/v) ajustada a un pH 2.5. Se trabajó en flujo isocrático (0.6 ml min⁻¹) con una inyección de 20 μ l. La temperatura de la columna fue de 35 °C y los picos se integraron a 210 nm excepto para el ácido ascórbico que se realizó a 260 nm. La identificación y cuantificación de los compuestos se realizó mediante curvas de calibrado con estándares.
2. Determinación del perfil fenólico:
 - Análisis dirigido (targeted): Se utilizó el método de Pereira et al., (2014) adaptado a nuestras condiciones. Brevemente, la separación se llevó a cabo con una columna C18 Phenomenex (4.5 x 150 mm y 5 μ m). La fase móvil fue metanol acidificado (0.1% v/v). Se trabajó con un flujo de 1.0 ml min⁻¹ en gradiente de 45 min del 3-50% con metanol acidificado al 0.1% con ácido fórmico (v/v). La temperatura de columna fue de 40 °C. Tras pasar por el detector de diodos (UV-VIS, 200-600 nm), 0.2 ml min⁻¹ fueron introducidos al espectrómetro de masas Excative® Orbitrap. Se operó en ionización negativa. Se analizaron en modo escáner de 100 000 m/z con una fuente de colisión inducida de disociación a 25 eV. La temperatura del capilar fue de 300 °C, la temperatura de la fuente fue de 150 °C. El gas de envoltura y el auxiliar fue de 20 unidades, el gas de barrido de 3 unidades y el voltaje utilizado de 3 kV.

La identificación se realizó comparando la masa exacta y el tiempo de retención con los estándares disponibles o mediante el valor de la masa exacta teórica y la medida. La identificación se realizó acorde al "Metabolite Standards Initiative Metabolite Identification Levels". La cuantificación se llevó a cabo mediante la integración de esos espectros a las longitudes de onda de 280 y a 325 nm.
 - Análisis no dirigido (untargeted): Se realizó utilizando el software Compound Discoverer 2.0 (Thermo Fisher Scientific). Este software permite la detección automática de analitos basándose en la masa exacta y los iones precursores, con una tolerancia de 5 ppm. El máximo número de posibles elementos seleccionados para el C, H, O, N, P y S fueron 80, 100,

50, 42 y 4. Asimismo se seleccionó una intensidad umbral de 100 000 para cada compuesto detectado, una variación del tiempo de retención menor o igual a 0.5 min y un cociente señal/ruido (signal-to-noise) mayor de 3. Los analitos fueron identificados tentativamente empleando bases de datos online, tales como METLIN, HMDB, KEGG y LIPIDMAPS. La anotación se realizó comparando la similitud entre la masa obtenida y la masa mono-isotópica obtenida en al menos, 3 de las bases de datos mencionadas y con un margen de error en ppm menor de 5.



Figura 25. Detalle del cromatógrafo de líquidos acoplado al espectrómetro de masas de alta resolución

Extracción en fase sólida:

En la ciruela, 1.0 g de muestra pulverizada y 2.2 g de CaCl_2 se añadieron a un vial de 10 ml. A continuación, se añadió 1 ml de AEDT (200mM y pH=7.0 ajustado con NaOH) y 2 μl de patrón interno 3-octanol (10 mg l^{-1} en etanol). En la naranja y zumos, 10 ml de muestra se diluyeron previamente con 50 ml de AEDT (200mM y pH=7.0 ajustado con NaOH) y 10 ml de la mezcla se transfirieron a un vial de 20 ml que contenía 3.5 g de NaCl. En todos los casos, las muestras se homogeneizaron durante un periodo de 30 s en un agitador Vortex (IKA) previo a su análisis por duplicado. Para la extracción de los volátiles se utilizó un auto-muestreador Combi-Pal[®] (CTC Analytical) que portaba una fibra de 65 μm de polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB) en el caso de la ciruela y otra fibra de Divinilbenceno/Carboxen/Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) en el caso de la naranja y los zumos premium. En todos los casos, la incubación y

extracción de los volátiles se realizó a 60 °C durante 10 y 30 minutos respectivamente. La desorción de los volátiles se realizó a 250 °C durante 15 min en modo de inyección splitless.

Cromatografía de gases:

Los análisis se realizaron en un cromatógrafo de gases modelo Trace GC ultra acoplado a un espectrómetro de masas ISQ simple cuadrupolo (Thermo Fisher Scientific). Para la separación de los compuestos se utilizó una columna cromatográfica DB5-MS J&W Scientific (60 m x 0.25 mm x 0.25 µm). El flujo fue de 1 ml min⁻¹. La temperatura inicial del horno fue de 45 °C. A continuación, una rampa de de 6 °C min⁻¹ hasta alcanzar los 90 °C, otra rampa de 3 °C min⁻¹ hasta 210 °C y una rampa final de 6 °C min⁻¹ hasta los 250 °C que fueron mantenidos durante 16 min. La detección se realizó en modo scan a una energía de ionización de 70 eV. La fuente de ionización se mantuvo a 200 °C y la línea de transferencia a 240 °C.

La identificación se realizó mediante la comparación de los espectros de masas y tiempos de retención de los compuestos, con los de estándares puros. Cuando no se disponía de estándares, la identificación se realizó a través de la librería NIST 05 y la comparación de los índices lineales de retención, obtenidos mediante la inyección de una mezcla de n-alcános en las mismas condiciones cromatográficas, con los de la bibliografía. En el caso de la ciruela, la cuantificación se realizó mediante el uso de un patrón interno a través de la comparación del área de iones característicos, seleccionados para cada volátil, con respecto al área del estándar interno. En el caso de la naranja y los zumos, se integraron las áreas de iones característicos seleccionados para cada volátil. En todos los análisis, una muestra de referencia, de la misma naturaleza que las muestras, se analizó en cada secuencia para verificar la repetibilidad y reproducibilidad de los análisis.



Figura 26. *Detalle del cromatógrafo de gases acoplado al Combi-Pal y al espectrómetro de masas triple cuadrupolo*

6. Relaciones isotópicas de isótopos estables

Las muestras liofilizadas fueron pesadas en microbalanza de precisión XP6 (Metler Toledo). Para la determinación de las relaciones isotópicas se utilizó un analizador elemental Flash 2000 (Thermo Fisher Scientific) acoplado a un espectrómetro de masas de relaciones isotópicas Delta plusV (Thermo Fisher Scientific) y una interfaz universal para análisis en flujo continuo ConFlo IV (Thermo Fisher Scientific). El analizador elemental estuvo compuesto por dos reactores, uno de oxidación y otro de reducción. Los resultados de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ fueron expresados en ‰ referidas a los



Figura 27. *Detalle del analizador elemental acoplado al espectrómetro de masas de relaciones isotópicas*

estándares internacionales: V-PDB para el carbono y nitrógeno atmosférico para el nitrógeno, siguiendo la siguiente ecuación:

$$\delta (\text{‰}) = [(R_{\text{muestra}} / R_{\text{referencia}}) - 1] \times 1000$$

Donde R es el cociente entre el isótopo pesado y el ligero, por ejemplo, $R = {}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N}$. Para el procesado de los datos se utilizó el software Isodat 3.0[©] (Thermo Fisher Scientific) y los estándares utilizados fueron proporcionados por la Estación Biológica de Doñana, IVA Analysentechnik y la Agencia Europea de la Energía Atómica.

7. Análisis de datos y software

El software estadístico que se utilizó fue diferente para los análisis univariantes que para los multivariantes. En el caso de los univariantes, se utilizaron el paquete estadístico SPSS (IBM Corp v. 12.0 Chicago, EEUU) y el Statistix (Analytical software v. 9.0 Tallahassee, EEUU). En el caso de los análisis multivariantes se utilizaron la PLS toolbox SOLO[©] (Eigenvector Research Inc. v. 7.9.3 Wenatchee, EEUU) y Matlab[©] (MathWorks v. 2008b Massachusetts, EEUU).



Resultados y discusión



Capítulo 1

Cultivos alternativos

Capítulo 1 Cultivos alternativos: la ciruela ecológica

La ciruela es una fruta menos conocida y estudiada que otras. En el caso andaluz, la bondad de adaptación de numerosas variedades de ciruelo, y más en concreto, en otros manejos (ecológico) han superado la fase experimental. Así, ha demostrado ser una especie que presenta bastante rusticidad y algunas variedades han mostrado una buena respuesta frente a plagas y enfermedades habituales de frutales de hueso. Esto hace que exista un nuevo cultivo alternativo en el valle del Guadalquivir con una rentabilidad que, en definitiva, hace más viable el agro-sistema andaluz y, por ende, las poblaciones rurales y agrícolas. Además de ser viable, este cultivo debe poseer un mayor valor añadido que les permita competir con otros cultivos tradicionales como el olivar entre otros, por ello, se han estudiado parámetros relacionados con su calidad diferenciada.

El desarrollo de nuevos sistemas de autenticación en la producción ecológica es actualmente uno de los principales desafíos de la química analítica y de la ingeniería agroalimentaria ya que permite aportar información acerca de los productos ecológicos y como su manejo termina afectando a su calidad. Esta búsqueda de los parámetros de calidad nos puede posibilitar la autenticación a través de su propia calidad intrínseca.

Para todo ello, en esta sección se presentan dos de los sub-objetivos perseguidos por la presente tesis doctoral. Primero, determinar el potencial bioactivo de las ciruelas ecológicas. Así, incorporamos más valor añadido a las producciones ecológicas. El hecho de tener unas condiciones muy controladas nos permitirá tener una respuesta exhaustiva del objetivo utilizando numerosas variedades a lo largo de dos cosechas para tener en cuenta la variabilidad interanual. En segundo lugar, determinar si el manejo ecológico afectó a su calidad aromática. En este caso se seleccionaron numerosos compuestos volátiles que han presentado actividad aromática en publicaciones previas y se determinaron con el fin de evidenciar si el manejo ecológico afecta a la producción final de estos compuestos.

Publicación 1

Effect of organic and conventional management on bio-functional quality of thirteen plum cultivars (*Prunus salicina* lindl.).

**Francisco J. Cuevas, Inma Pradas, María José Ruiz-Moreno, Francisco T.
Arroyo, Luis F. Perez-Romero, José C. Montenegro, & José M.
Moreno-Rojas.**

Plos One 10(8), e0136596 (2015)

Q1: 11/61 (JCR-ISI, Multidisciplinary Science, 2015)

Impact Factor: 3.057

The final published journal article (PJA) is included with the permission of Elsevier editorial

RESEARCH ARTICLE

Effect of Organic and Conventional Management on Bio-Functional Quality of Thirteen Plum Cultivars (*Prunus salicina* Lindl.)

Francisco Julián Cuevas¹, Inmaculada Pradas¹, María José Ruiz-Moreno¹, Francisco Teodoro Arroyo², Luis Felipe Perez-Romero², José Carlos Montenegro¹, José Manuel Moreno-Rojas^{1*}

1 Postharvest Technology and Agrifood Industry Area, Andalusian Institute of Agricultural and Fishing Research and Training (IFAPA), Alameda del Obispo, Córdoba, Spain, **2** Organic Production and Natural Resources, Andalusian Institute of Agricultural and Fishing Research and Training (IFAPA), Las Torres-Tomejil, Seville, Spain

* josem.moreno.rojas@juntadeandalucia.es



OPEN ACCESS

Citation: Cuevas FJ, Pradas I, Ruiz-Moreno MJ, Arroyo FT, Perez-Romero LF, Montenegro JC, et al. (2015) Effect of Organic and Conventional Management on Bio-Functional Quality of Thirteen Plum Cultivars (*Prunus salicina* Lindl.). PLoS ONE 10(8): e0136596. doi:10.1371/journal.pone.0136596

Editor: Andrea Motta, National Research Council of Italy, ITALY

Received: May 6, 2015

Accepted: August 6, 2015

Published: August 27, 2015

Copyright: © 2015 Cuevas et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work has been funded by internal funds from Andalusian Institute of Agricultural and Fishing Research and Training (IFAPA) through Project 'Caracterización organoléptica y funcional de productos ecológicos. Utilización de técnicas isotópicas para la diferenciación entre producto ecológico y convencional' (PP.AVA.AVA201301.7), European Commission with European Social Fund (ESF) and European Rural Development Fund (ERDF). Francisco Julián Cuevas is granted by the

Abstract

In this study, thirteen Japanese plum cultivars (*Prunus salicina* Lindl.) grown under conventional and organic conditions were compared to evaluate the influence of the culture system on bioactive compounds. Their organic acids content (malic, citric, tartaric, succinic, shikimic, ascorbic and fumaric acid), total polyphenols, total anthocyanins, total carotenoids and antioxidant capacity (FRAP, ABTS) were evaluated. The study was performed during two consecutive seasons (2012 and 2013) in two experimental orchards located at the IFAPA centre Las Torres-Tomejil (Seville, SW Spain). The culture system affected all the studied parameters except for total carotenoid content. The organic plums had significantly higher polyphenol and anthocyanin concentrations and a greater antioxidant capacity. Additionally, significant differences between cultivars were also found. 'Showtime' and 'Friar' were the cultivars with the highest polyphenol concentration and antioxidant capacity. 'Black Amber' had the highest anthocyanin content and 'Larry Ann' and 'Songold' the highest carotenoid content. 'Sapphire' and 'Black amber' were the cultivars with the highest concentration of ascorbic acid. Our results showed a strong year effect. In conclusion, organic management had an impact on the production of phytochemical compounds in plums.

Introduction

The genus *Prunus* includes an important number of fruit crops: peach (*P. persica*), apricot (*P. armeniaca*), cherry (*P. avium*), almond (*P. dulcis*) and plum (*P. salicina*). Plums are mainly consumed fresh and are becoming increasingly popular as a result of their attractive appearance and extraordinary flavour. Spain produces about 8% of the total European plum production (3rd position) and is the main exporter (seasonal market) in the world [1].

research contract funding by Andalusian Institute of Agricultural and Fishing Research and Training (IFAPA) and European Social Fund (ESF). Maria José Ruiz Moreno is granted by a postdoctoral research contract funding by Andalusian Institute of Agricultural and Fishing Research and Training (IFAPA) and European Social Fund (ESF).

Competing Interests: The authors have declared that no competing interest exist.

Europeans demand high quality fresh products, especially those with high organoleptic quality and nutritional value [2]. For this reason, those characteristics have been important targets for breeding during the last decade [3]. A recent survey showed that the demand for organic products by European consumers increased fourfold during the last decade while the area devoted to their cultivation only doubled [4]. In Andalusia, a huge increase in the land dedicated to organic farming took place (sevenfold in the period, 2001–2013). At present, Andalusia produces more than 50% of the total Spanish production of organic fruit and vegetables [5].

European Union guidelines regarding organic production [6] forbids the use of synthetic products (fertilisers and plant protection methods). The principles for organic agriculture are similar in the different European countries and the inputs permitted are regulated by law.

On the one hand, several reviews and articles generally state that organic fruits and vegetables have a higher amount of micronutrients and health-related secondary metabolites, such as phenolic compounds [7], carotenoids [8], vitamins [9, 10] and glucosinolates [11]. On the other hand, other studies have not found the same effect on the final fruit quality [12, 13], emphasising the importance of the environmental parameters (i.e. temperature, irradiation incidence, ripeness, irrigation, etc.) and nutrient dilution (different fruit moisture).

The use of pesticides was reported to affect the secondary metabolism of plants, increasing or decreasing the concentrations of phenolic compounds, depending on the mechanism of action of the pesticide [14]. Several herbicides reduce carbon fixation by plants, decreasing the proportion of carbon available for the synthesis of primary and secondary metabolites. Other herbicides block the shikimate pathway, reducing the synthesis of aromatic amino acids at the onset of the synthesis of phenolic compounds [15].

The quantity and quality of the bioactive compounds in fruit is strongly related to its genotype [16–19]. Plums have a wide genetic basis that is reflected in different contents of antioxidant compounds [20–22]. The nutritional quality of plums also depends on several pre-harvest and post-harvest factors such as irrigation [23], salinity [24], the rootstock used [25], mulching [26] and postharvest treatments [27] such as methyl jasmonate and methyl salicylate [28].

Plum fruits contain important secondary metabolites such as flavonoids and phenolic acids with a high antioxidant capacity [29]. Phenolic compounds are primarily responsible for plums' antioxidant capacity [30, 31]. The main group of phenolic compounds in plums are hydroxycinnamic acid derivatives (chlorogenic acid, neochlorogenic acid and quercetin) [32].

Anthocyanins are abundant in peel [33]; they are responsible for its colour [34] and are affected by factors such as tree position and shading [35]. Carotenoids are natural fat-soluble pigments with an antioxidant capacity [36], the main one in plums being β -carotene, which is mainly found in peel [37].

Material and Methods

Plant material, experimental design and treatments

The study was carried out in 2012 and 2013 in two experimental orchards located at IFAPA 'Las Torres-Tomejil' (Seville, Spain) (37°30' 48" N; 5°57' 46" W). IFAPA is the owner of the fields used for the experiment and they are intended for research purposes. Thirteen different plum cultivars were chosen (Table 1). The experimental design was a total randomized design with three replicates. The fertilisation applied in the organic orchards was animal manure and cover crop, while the fertilizer used in the conventional orchards is detailed in Daza et al. [38]. The plant protection in the conventional orchards followed integrated management guidelines.

Table 1. Harvesting date and colours of peel and flesh of plum cultivars

Genotype	Colour ¹		Harvesting date	
	Peel	Flesh	2012	2013
G. Japan	Yellow	Yellow	28/06	25/06
Showtime	Red-Purple	Yellow	19/06	21/06
Sapphire	Purple	Yellow	09/07	25/06
Santa Rosa	Red	Yellow	02/07	26/06
Souvenir	Red-pink	Yellow	09/07	11/07
Black Amber	Dark-purple	Amber	09/07	01/07
Fortune	Red	Amber	26/07	17/07
Friar	Dark-purple	Amber	30/07	31/08
Primetime	Dark-purple	Red	24/07	15/07
F. Larry Ann	Dark Red	Yellow	13/08	05/08
Laetitia	Red	Orange-Yellow	20/08	05/08
Songold	Green-Yellow	Yellow	27/08	06/08
Plumlate	Dark-purple	Amber	17/09	02/09

¹Daza et al. 2012

doi:10.1371/journal.pone.0136596.t001

Sample preparation

Eight fruits per tree and six trees per cultivar and treatment were harvested at commercial maturity (Table 1) and transported to the laboratory for analysis. Then, the flesh and pit were separated and each sample frozen in liquid nitrogen and milled. Next, the plum powder was lyophilised and ground again.

Extraction method for bioactive compounds

Two different approaches were followed for quantifying the bioactive compounds: hydrophilic and lipophilic extractions.

For the hydrophilic extraction, 0.1 g of freeze-dried plum fruits were mixed with 2 ml of acetone:water (50:50 v/v). The mixtures were vortexed for 1 min then sonicated for 15 min and finally centrifuged at 5000 rpm for 15 min at 4°C. The supernatants were transferred to vials, stored at -80°C, and later used to analyse total phenolics, total anthocyanins, and antioxidant capacity (FRAP and ABTS).

For the lipophilic extraction, 0.1 g of freeze-dried plum fruits were mixed with 2 ml of acetone:hexane (4.6 v/v). The mixtures were vortexed for 2 min and then centrifuged at 5000 rpm for 15 min at 4°C. The supernatants were transferred to vials, stored at -80°C, and later used to analyse carotenoids and antioxidant capacity (ABTS).

Total anthocyanins

The total anthocyanin content (TAC) was determined following the pH differential method previously described by Giusti and Wrolstad [39]. The extract was diluted in a pH 1.0 solution (25mM KCl) and in a pH 4.5 solution (0.4 M CH₃CO₂Na). The absorbance of each well was measured at 535 nm and 700 nm after 15 min at 25°C with a microplate spectrophotometer (Thermo Scientific Multiskan GO). Absorbance readings were converted into total milligrams of cyanidin 3-glucoside per 100 g of dry-weight using the molar extinction coefficient of 23900.

The absorbance was calculated using the following equation:

$$A = (A_{535} - A_{700})_{pH 1.0} - (A_{535} - A_{700})_{pH 4.5}$$

Total Phenolic compounds

Total polyphenols content (TPC) was determined with the Folin-Ciocalteu reagent using the method of Slinkard and Singleton [40]. First, 10 μ l of the hydrophilic extract was mixed with 175 μ l of distilled water and subsequently with 12 μ l of Folin-Ciocalteu reagent. After 3 min, 30 μ l of a 20% aqueous sodium carbonate solution were added. The samples were left to stand for 1 hour and were then read at 765 nm with a spectrophotometer (previously described) and compared with a known concentration range of similarly-prepared gallic acid standards. The results were expressed as milligrams of gallic acid equivalents per 100 g of fresh-weight (mg GAE/100 g FW).

Carotenoids

Total carotenoid content (TCC) was determined following the method described by Nagata and Yamashita [41]. Absorbance of the lipophilic extract was measured at 453, 505, 645 and 663 nm. The concentration of carotenoids was calculated with the following equation:

$$\beta - \text{carotenoid} = 0.216 A_{663} - 1.22 A_{645} - 0.304 A_{505} + 0.452 A_{453}$$

Antioxidant capacity

The antioxidant capacity of the hydrophilic extract was measured by the ABTS (ABTSh) and FRAP assays. In the case of the lipophilic extract, the antioxidant capacity was measured only by the ABTS assay (ABTS-l).

ABTS^{•+} radical scavenging activity

The antioxidant capacity of the samples was also measured by the degree of suppression of the ABTS^{•+} radical cation produced by the reaction of ABTS^{•+} (2,2-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate]). The data were compared with the antioxidant activity of standard amounts of Trolox.

The stock solution was prepared with 8 ml of water, 1 ml of acetate buffer (0.1 M, pH 5), 1 ml of ABTS (5.5 mg/ml) and a small amount of MnO₂ (to activate the ABTS radical cation). The solution was filtered through a filter of 0.45 μ m to remove the excess MnO₂. The radical reagent was prepared by diluting the stock solution with pure water to an absorbance equal to 1 measured at 414 nm. Two μ l of previously-diluted hydrophilic extract and 200 μ l of radical reagent were added to the plate. After shaking in the microplate reader, the absorbance of each well was measured at 414 nm after 50 min at 25°C with the spectrophotometer described above.

To measure the antioxidant capacity in the lipophilic extract, the ABTS radical cation was activated with potassium persulfate and the mixture was left to stand in the dark at room temperature for 12-16 hours before use. The solution was diluted with ethanol to an absorbance of 1 at 414 nm. Next, 40 μ l of lipophilic extract was added to 180 μ l of ABTS solution. Absorbance was measured at 414 nm after 50 min at 25°C.

Ferric reducing antioxidant capacity (FRAP). The FRAP assay was performed according to the method of Benzie and Strain [42] with some modifications. In short, the FRAP reagent

was prepared by mixing 0.3 M acetate buffer (pH 3.6), a solution of 10 mM TPTZ in 40 mM HCl, and 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ at 10:1:1 (v/v/v). Then, 2 μl of the previously diluted sample were added to the well containing 200 μl of FRAP reagent. After shaking in the microplate reader, the absorbance of each well was measured at 593 nm after 40 min at 37°C with the spectrophotometer described above.

The antioxidant capacity (ABTS^{•+} and FRAP assays) was expressed as μmol of trolox equivalent per 100 gram of fresh weight ($\mu\text{mol TE}/100 \text{ g FW}$).

Organic acids (*Ascorbic, Citric, Fumaric, Malic, Shikimic, Succinic and Tartaric acid*)

Freeze-dried plum (100 mg) was extracted with 3% meta-phosphoric acid in water (v/v) (3 ml). The samples were refrigerated for 10 min and vortexed for 30 seconds every 5 min. The samples were centrifuged at 5000 rpm for 15 min at 4°C and filtered through a 0.45 μm pore-size filter. The extracts were immediately measured by UHPLC-DAD.

The organic acids were measured using a Dionex Ultimate 3000 UHPLC system (Thermo Scientific) equipped with a photodiode array with a multiple wavelength detector. A 4.0 x 250 mm, 5 μm Acclaim organic acid column equipped with an Acclaim organic acid guard column (4.6 x 10 mm, 5 μm) was used. The mobile phase consisted of 0.2% metaphosphoric acid in water adjusted to pH 2.5 using metaphosphoric acid. The flow rate was 0.6 ml min^{-1} (isocratic) and the sample injection volume was 20 μl . The column temperature was set at 35°C. Peaks were recorded at 210 nm for malic, tartaric, citric, fumaric, shikimic and succinic acids and at 260 nm for ascorbic acid. All the above mentioned organic acids were identified and quantified using an external calibration curve prepared with authentic standards and the concentrations expressed as mg/100 g of fresh weight (FW).

The total organic acids content (TOAC) was determined, calculated as the sum of the individual compounds.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed using Statistix software (v. 9.0). Values are given as means. The data were subjected to an analysis of variance (ANOVA), followed by a comparison of means according to the least significant difference (LSD) test. Differences at $P < 0.05$ were considered to be statistically significant.

Results and Discussion

Effect of cultivation system

The organic plums had a higher antioxidant capacity (ABTS-h, ABTS-l and FRAP assays), TPC and TAC than the conventional ones (Table 2). The values differed by between 5–10%. TCC was not affected by the method of cultivation.

Several publications have shown that lower nitrogen application results in a higher accumulation of phenolic compounds, whereas higher levels of nitrogen fertilization promote the formation of carotenoids and chlorophylls [43]. The first is in agreement with our data (TAC, TPC), while the latter would suggest a higher TCC value in conventional plums. However, other authors [44] observed that the TCC is highly temperature dependent and this could be the reason for the results obtained.

Organic growing systems are related to a certain level of stress (restricted and limited use of pesticides and fertilizers), which could lead to the accumulation of secondary metabolites responsible for plant defence [7, 45]. The most important secondary metabolites in plums are

Table 2. Effects of cultivation system, genotype and year of harvest on the anthocyanins, polyphenols, antioxidant capacity, and carotenoids of plums.

	Hydrophilic extraction				Lipophilic extraction	
	TAC (mg GAE/100 g FW)	TPC (mg GAE/100 g FW)	ABTS-h (umols TEAC/100 g FW)	FRAP (umols TEAC/100 g FW)	ABTS-I (umols TEAC/100 g FW)	TCC(mg/100 g FW)
Cultivation system (CS)						
Conventional	6.21 b	139.3 b	1158 b	1353 b	5.41 b	0.18
Organic	7.30 a	150.8 a	1253 a	1495 a	5.93 a	0.19
<i>Significance</i>	*	***	***	***	**	ns
Genotype (G)						
G. Japan	-	71.7 h	552 f	615 h	5.15 de	0.14 de
Showtime	4.25 cd	255.7 a	2651 a	2375 a	5.65 cd	0.28 b
Sapphire	2.10 def	128.1 ef	1057 cd	1125 efg	3.85 f	0.14 de
Santa Rosa	2.72 def	93.2 g	665 f	775 h	3.90 f	0.13 de
Souvenir	0.55 f	118.2 f	943 de	1018 g	6.00 cd	0.26 b
Black Amber	29.82 a	150.2 d	1168 c	2023 b	5.60 cd	0.21 c
Fortune	2.21 def	139.5 de	1164 c	1334 d	7.21 b	0.21 c
Friar	18.17 b	199.4 b	1485 b	2076 b	5.97 cd	0.16 d
Primetime	6.40 c	177.8 c	1489 b	1913 b	4.62 ef	0.07 f
F. Larry Ann	3.12 de	129.4 ef	1144 c	1295 de	6.31bc	0.35 a
Laetitia	0.70 ef	119.2 f	884 e	1089 fg	5.36 de	0.11 e
Songold	-	169.3 c	1370 b	1627 c	8.38 a	0.33 a
Plumlate	4.25 cd	134.2def	1099 c	1247 def	5.76 cd	0.07 f
<i>Significance</i>	***	***	***	***	***	***
Year (Y)						
2012	4.75 b	133.1 b	1163 b	1265 b	5.44 b	0.22 a
2013	8.76 a	157.0 a	1248 a	1583 a	5.91 a	0.16 b
<i>Significance</i>	***	***	***	***	*	***
G*CS	ns	ns	Ns	ns	Ns	ns
G*Y	***	***	***	***	***	***
CS*Y	ns	ns	*	*	Ns	ns
G*Y*CS	ns	ns	Ns	ns	*	ns

TAC = Total anthocyanins content, TPC = total polyphenolic content, ABTS-h = ABTS antioxidant capacity assay on hydrophilic extraction, FRAP = FRAP antioxidant capacity assay on hydrophilic extraction, ABTS-I = ABTS antioxidant assay in lipophilic extraction and TCC = total carotenoid content. Means with different letters in the same column present significant differences. Significance level: ns = non significant,

* = $P < 0.05$,

** = $P < 0.01$,

*** = $P < 0.001$

doi:10.1371/journal.pone.0136596.t002

polyphenols [32], whose content commonly increases in stressful conditions, as was observed in the samples analyzed. Shikimic acid is the precursor of phenylalanine [46], and therefore precursor of the phenylpropanoid biosynthesis [47]. In our case, a higher amount of shikimic acid and TPC were found in the organic orchards. These results were in agreement with the literature published in *Prunus* genus [8] and other fruits [48, 49, 50, 51].

Organic acids have an important role in cell metabolism and also contribute to the final quality of fresh fruit. Seven organic acids were identified and quantified: malic, citric, tartaric, fumaric, succinic, ascorbic and shikimic acids. We found many publications about ascorbic

acid and plums [37, 52, 53, 54] and prunes [55] while deeper studies regarding overall study of organic acids in *Prunus salicina* L. [56] were scarce.

In our case, the plums cultivated in an organic system obtained higher values for TOAC (1475 mg/100g FW vs 1409 mg/100g FW for conventional ones), therefore, the production system was shown to have a significant effect (Table 3). Additionally, the plums grown under organic conditions showed significantly higher concentrations of malic, succinic, tartaric and shikimic acids. Other organic acids, such as citric, ascorbic and fumaric acid, were not affected by the cultivation system. Regarding this results, Lombardi et al [15] did not find differences in citric and malic acid content on *Prunus domestica* L. between organic and conventional orchards. These results are partly in agreement with the data we obtained. This fact could be related with the difference between the two species under study (*Prunus salicina* L. and *Prunus domestica* L.).

Stressful conditions such as water supply [57], soil conditions [58], etc., could lead to a higher amount of organic acids in plums, depending on tree responses. Several authors [59] suggests that higher amounts of nitrogen fertilization lead to a reduction in ascorbic acid concentration in many fruits [60, 61] and vegetables [62, 63], which is in contrast with the results obtained in our research where no differences were found between the organic and conventional cultivation methods, in which fertilization was very different. This controversial matter is supported by other publications in which similar results to ours were found [62, 64, 65, 66]

Effect of genotype

Significant differences in the phytochemical content were found among different plum genotypes and the biosynthesis of phytochemical compounds in plants is known to be strongly influenced by genotype [67]. 'Showtime' showed the highest values for TPC, ABTS-h, FRAP among all the cultivars as well as a high TCC. 'Songold' recorded the highest values for carotenoids and ABTS-l. 'Golden Japan' and 'Santa Rosa' presented the lowest values for ABTS-h and FRAP. 'Golden Japan' also had the lowest TPC. 'Black amber' was the cultivar with the highest anthocyanin content, followed by 'Friar', both of these having dark purple skin. The quantification of TAC was feasible for all the cultivars studied except for 'Songold' and 'Golden Japan', cultivars with yellow skin and flesh.

'Golden Japan' was previously characterized as a cultivar with a low antioxidant capacity [68], in agreement with our results; while 'Showtime' presented the highest (2650.6 $\mu\text{mol ET}/100\text{ g FW}$) antioxidant capacity. These results showed an important genotype effect in the sample of plums under study.

There were significant differences among cultivars in TOAC (Table 3). The highest values were measured for the 'Showtime' cultivar (2304 mg/100g FW) followed by 'Santa Rosa' (1877 mg/100g FW), and the lowest ones were found for 'Plumlate' (943 mg/100g FW).

Malic acid was the major contributor to the TOAC with a range between 86–96% depending on the cultivar. These findings were in agreement with Singh et al. [56]. Tartaric acid was the second most abundant organic acid followed by citric, succinic, shikimic, ascorbic and fumaric acids.

'Showtime' was the cultivar with the highest content of malic and citric acids, both related to sour taste. The highest concentrations for ascorbic acid were found for the 'Sapphire' and 'Black amber' cultivars.

The TOAC data found in our study were consistent with the literature [56] and differences in the TOAC between cultivars were also previously described [69]. Ascorbic acid content in plums is low [37, 70] so its contribution to their antioxidant capacity is practically negligible.

Table 3. Effects of cultivation system, genotype and year of harvest on the malic, citric, ascorbic, succinic, tartaric, fumaric, shikimic and total organic acids content in plums.

	Ascorbic acid	Citric acid	Fumaric acid	Malic acid	Shikimic acid	Succinic acid	Tartaric acid	Total organic acids
Cultivation system (CS)								
Conventional	1.62	24.12	0.49	1313 b	3.65 b	5.84 b	60.18 b	1409 b
Organic	1.66	24.00	0.50	1369 a	3.90 a	7.01 a	67.67 a	1475 a
<i>Significance</i>	ns	ns	ns	**	***	*	***	***
Genotype (G)								
Golden Japan	1.48 de	22.80 cde	0.27 f	1662 c	2.68 e	15.21 a	48.68 efgh	1754c
Showtime	2.02 bc	38.16 a	0.68 c	2169 a	3.30 d	4.84 def	85.30 c	2304 a
Sapphire	2.49 a	20.67 e	1.24 a	1224 efg	3.27 d	2.33 f	32.02 i	1286 fg
Santa Rosa	1.47 de	23.22 cd	0.38 de	1804 b	3.33 d	2.85 f	41.45 h	1877 b
Souvenir	1.26 ef	23.74 c	0.27 f	1469 d	3.71 c	7.92 bc	55.34 e	1562 d
Black amber	2.29 ab	21.33 de	0.28 ef	1179 fg	4.75 a	8.50 b	53.51 ef	1270 g
Fortune	1.79 c	22.67 cde	0.62 c	1280 e	3.85 bc	4.14 def	97.15 b	1410 e
Friar	2.13 b	28.34 b	0.83 b	1216 efg	4.92 a	6.70 bcd	107.2 a	1367 ef
Primetime	1.73 cd	21.93 cde	0.38 de	1236 ef	4.12 b	5.83 cde	46.50 fgh	1316 fg
F. Larry Ann	1.50 de	23.79 c	0.40 d	1181fg	4.97 a	4.55 def	72.58 d	1289 fg
Laetitia	0.73 g	13.19 f	0.31 def	1055 h	2.84 e	3.32 ef	45.53 gh	1120 h
Songold	1.06 f	29.02 b	0.37 def	1151g	3.39 d	9.00 b	50.42 efg	1245 g
Plumlate	1.38 e	23.90 c	0.36 def	810 i	3.95 bc	8.30 bcd	95.36 b	943 i
<i>Significance</i>	***	**	***	***	***	***	***	***
Year (Y)								
2012	1.75 a	24.89 a	0.57 a	1233 b	3.88 a	5.05 b	54.61 b	1324 b
2013	1.53 b	23.22 b	0.42 b	1450a	3.67 b	7.80 a	73.23 a	1560 a
<i>Significance</i>	***	***	***	***	***	***	***	***
G x CS	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	*
G x Y	***	***	***	***	***	***	***	***
CS x Y	ns	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns
G x Y x CS	ns	**	ns	**	ns	ns	*	**

Unit = mg/100 g fresh weight. Means with different letters in the same column present significant differences. Significance level: ns = non significant, * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$, *** = $P < 0.001$

doi:10.1371/journal.pone.0136596.t003

Year effect

The plums harvested in 2013 showed a significantly higher TPC, TAC, and antioxidant capacity (ABTS-h, FRAP and ABTS-l), while those harvested in 2012 showed significant higher TCC values (Table 2). Regarding organic acids, the plums harvested in 2013 showed higher values for TOAC, malic, succinic and tartaric acids, while higher values for citric, ascorbic, fumaric and shikimic acids were found for the samples harvested in 2012 (Table 3).

Many parameters are involved in the factor ‘year’, such as plant nutrient imbalances, irrigation, crop load, fruit canopy position and environmental parameters [71].

Climate data were studied to identify the influence of environmental conditions on phytochemical compounds during the two years under study. The main difference observed between

the two years was the value for the total radiation (TR). In 2012, TR was between 3 and 8% higher (mean monthly values) than in 2013.

The mechanism of carotenoid biosynthesis has been shown to be light-dependent [72], which may explain our results, which show greater carotenoid biosynthesis in 2012 (Table 2).

Other studies involving plums ('Laetitia' and 'Songold') found that fruit grown under reduced light conditions were consistently less mature than those exposed to full sunlight [73]. In our study, a higher content of organic acids was found in 2013, the year with a lower total radiation. Thus, the lower radiation found in 2013 could have produced less mature plums and therefore a higher content of organic acids.

Interaction effects

All the cultivars studied had higher bioactive compounds content in organic cultivation system while 'cultivation system and genotype' interaction was not significant for TAC, TPC, ABTS-I and TCC (Table 2). This means that cultivation system affected above mentioned measurements in the same way for all studied cultivars.

The 'genotype x year' interaction was significant and therefore, the genotype responses to the environmental factors (year effect) were different. 'Golden Japan' showed different concentrations of all the parameters studied in both years. Therefore, the bioactive compounds of the 'Golden Japan' cultivar were mainly affected by environmental conditions. Hydrophilic bioactive compounds for 'Fortune', 'Plumlate', 'Sapphire' and 'Santa Rosa' were not significantly different in both years and 'Black Amber' demonstrated the same behaviour for the lipophilic extract and carotenoid content (S1 Table).

The 'cultivation system x year' interaction was significant for the FRAP assay and ABTS-h. In this case, the plums harvested in 2013 showed no significant differences between both growing systems, but the organic plums in 2012 showed a higher antioxidant capacity than the conventional ones (S1 Table).

Correlations

High correlations (S2 Table) between TPC and both antioxidant assays were observed ($r^2 \approx 0.89$ for both). Similar results were previously reported in plums [32, 37, 74].

No correlation between TPC and TAC ($R^2 = 0.401$) was found. Previous studies observed that TAC and TPC were not well correlated in other fruits with high TAC and TPC values [75].

Moreover, the ascorbic acid content did not correlate well with different antioxidant capacity assays (S2 Table), so polyphenols compounds (TPC) make the biggest contribution to the antioxidant capacity of plums.

The results of the FRAP and ABTS-h assays show a linear correlation ($R^2 = 0.794$, $P < 0.001$, $N = 156$), so both methods may be used indistinctly to evaluate the antioxidant activity in these type of fruits.

Conclusions

Organic plum samples were found to have higher values of TAC, TPC and antioxidant capacity than conventional ones while no differences in TCC were found. The main bioactive compounds contributing to the total antioxidant capacity of plums are phenols. Genotype significantly affected the content of different bioactive compounds. 'Showtime' had the highest TPC values and 'Golden Japan' and 'Santa Rosa' the lowest.

In conclusion, the organic growing system produced plums with a higher content of bioactive compounds, in addition to a lower impact on the environment.

Supporting Information

S1 Table. ANOVA interactions between cultivation system, genotype and year factors, and effects on total anthocyanins, polyphenols, antioxidant capacity and carotenoids values.

Means with different letters in the same column show significant differences. $P < 0.05$. TAC = Total anthocyanins content. TPC = Total polyphenols content. ABTS-h = ABTS hydrophilic extract. TCC = Total carotenoids content. ABTS-l = ABTS lipophilic extract. CS: Cultivation system. G: genotype. Y: year.

(DOCX)

S2 Table. Pearson's correlation coefficients of hydrophilic extraction assays (TAC, TPC, ABTS-h, FRAP), lipophilic extraction assays (ABTS-l and TCC) and organic acids values.

^{ns} = non significant, * = significant $P < 0.05$, ** = significant $P < 0.01$, *** = significant $P < 0.001$.

(DOCX)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JMMR FTA MJRM. Performed the experiments: FJC IP JMMR MJRM FTA LFPR JCM. Analyzed the data: FJC IP JMMR MJRM FTA. Contributed reagents/materials/analysis tools: FJC IP JCM. Wrote the paper: FJC IP FTA JMMR.

References

1. FAOSTAT. FAO Statistical Database. 2011 [updated 14 October 2011].
2. Sahota A, Haumann B, Givens H, Baldwin C. Ecolabeling and consumer interest in sustainable products. *Sustainability in the Food Industry*. 2009; 159–81.
3. Kumar S, Volz R, Alspach P, Bus VM. Development of a recurrent apple breeding programme in New Zealand: a synthesis of results, and a proposed revised breeding strategy. *Euphytica*. 2010; 173(2):207–22.
4. Proposal for a Regulation of the European Parliament and of the Council on organic production and labelling of organic products. Available: http://ec.europa.eu/agriculture/organic/documents/eu-policy/policy-development/report-and-annexes/proposal_en.pdf; 2014.
5. MAGRAMA. Available: http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/la-agricultura-ecologica/Estadisticas_AE_2013_tcm7-351187.pdf. 2013.
6. Regulation. Regulation EC 834/2007. 2007.
7. Raigón MaD, Rodríguez-Burruezo An, Prohens J. Effects of organic and conventional cultivation methods on composition of eggplant fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010; 58(11):6833–40. doi: [10.1021/jf904438n](https://doi.org/10.1021/jf904438n) PMID: [20443597](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20443597/)
8. Carbonaro M, Mattera M, Nicoli S, Bergamo P, Cappelloni M. Modulation of antioxidant compounds in organic vs conventional fruit (peach, *Prunus persica* L., and pear, *Pyrus communis* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002; 50(19):5458–62. PMID: [12207491](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12207491/)
9. Young JE, Zhao X, Carey EE, Welti R, Yang S-S, Wang W. Phytochemical phenolics in organically grown vegetables. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2005; 49(12):1136–42.
10. Del Amor FM, Serrano-Martínez A, Fortea I, Núñez-Delgado E. Differential effect of organic cultivation on the levels of phenolics, peroxidase and capsidiol in sweet peppers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2008; 88(5):770–7.
11. Ren H, Endo H, Hayashi T. Antioxidative and antimutagenic activities and polyphenol content of pesticide-free and organically cultivated green vegetables using water-soluble chitosan as a soil modifier and leaf surface spray. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2001; 81(15):1426–32.
12. Luthria D, Singh AP, Wilson T, Vorsa N, Banuelos GS, Vinyard BT. Influence of conventional and organic agricultural practices on the phenolic content in eggplant pulp: Plant-to-plant variation. *Food Chemistry*. 2010; 121(2):406–11.
13. Valavanidis A, Vlachogianni T, Psomas A, Zovoili A, Siatas V. Polyphenolic profile and antioxidant activity of five apple cultivars grown under organic and conventional agricultural practices. *International Journal of Food Science & Technology*. 2009; 44(6):1167–75.

14. Zhao X, Rajashekar C, Carey EE, Wang W. Does organic production enhance phytochemical content of fruit and vegetables? Current knowledge and prospects for research. *HortTechnology*. 2006; 16(3):449–56.
15. Lombardi-Boccia G, Lucarini M, Lanzi S, Aguzzi A, Cappelloni M. Nutrients and antioxidant molecules in yellow plums (*Prunus domestica* L.) from conventional and organic productions: a comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004; 52(1):90–4. PMID: [14709018](#)
16. Scalzo J, Politi A, Pellegrini N, Mezzetti B, Battino M. Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. *Nutrition*. 2005; 21(2):207–13. PMID: [15723750](#)
17. Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL. Concentrations of Anthocyanins in Common Foods in the United States and Estimation of Normal Consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006; 54(11):4069–75. PMID: [16719536](#)
18. Du G, Li M, Ma F, Liang D. Antioxidant capacity and the relationship with polyphenol and Vitamin C in Actinidia fruits. *Food Chemistry*. 2009; 113(2):557–62.
19. Vizzotto M., Cisneros-Zevallos L., Byrne DH, Ramming DW., & Okie W. Large variation found in the phytochemical and antioxidant activity of peach and plum germplasm. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2007; 132(3), 334–340.
20. Cevallos-Casals BA., Byrne D., Okie WR. & Cisneros-Zevallos L.. Selecting new peach and plum genotypes rich in phenolic compounds and enhanced functional properties. *Food Chemistry*, 2006; 96(2), 273–280.
21. Cordova FM., & Watson RR.. 11 Prunes and Plums in Health Promotion. *Bioactive Foods and Extracts*, 2010:205.
22. Stacewicz-Sapuntzakis M., Bowen PE., Hussain EA., Damayanti-Wood BI., Farnsworth N. R.. Chemical composition and potential health effects of prunes: a functional food? *Critical reviews in food science and nutrition*, 2001 41(4), 251–286. PMID: [11401245](#)
23. Buendía B, Allende A, Nicolás E, Alarcón JJ, Gil MI. Effect of regulated deficit irrigation and crop load on the antioxidant compounds of peaches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008; 56(10):3601–8. doi: [10.1021/jf800190f](#) PMID: [18447361](#)
24. Keutgen AJ, Pawelzik E. Modifications of strawberry fruit antioxidant pools and fruit quality under NaCl stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007; 55(10):4066–72. PMID: [17429984](#)
25. Giorgi M, Capocasa F, Scalzo J, Murri G, Battino M, Mezzetti B. The rootstock effects on plant adaptability, production, fruit quality, and nutrition in the peach (cv. 'Suncrest'). *Scientia Horticulturae*. 2005; 107(1):36–42.
26. Melgarejo P, Calín-Sánchez Á, Hernández F, Szumny A, Martínez JJ., Legua P., et al. Chemical, functional and quality properties of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) as affected by mulching. *Scientia Horticulturae*, 2012; 134(0), 114–120.
27. Díaz-Mula H, Zapata P, Guillén F, Martínez-Romero D, Castillo S, Serrano M, et al. Changes in hydrophilic and lipophilic antioxidant activity and related bioactive compounds during postharvest storage of yellow and purple plum cultivars. *Postharvest Biology and Technology*. 2009; 51(3), 354–363.
28. Sayyari M, Babalar M, Kalantari S, Martínez-Romero D, Guillén F, Serrano M, et al. Vapour treatments with methyl salicylate or methyl jasmonate alleviated chilling injury and enhanced antioxidant potential during postharvest storage of pomegranates. *Food Chemistry*. 2011; 124(3):964–70.
29. Kim D-O, Jeong SW, Lee CY. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*. 2003; 81(3):321–6.
30. Kristl J, Slekovec M, Tojnko S, Unuk T. Extractable antioxidants and non-extractable phenolics in the total antioxidant activity of selected plum cultivars (*Prunus domestica* L.): Evolution during on-tree ripening. *Food Chemistry*. 2001 125(1), 29–34.
31. Ogah O, Watkins CS., Ubi BE., Oraguzie NC. Phenolic Compounds in Rosaceae Fruit and Nut Crops. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2014; 62(39), 9369–9386. doi: [10.1021/jf501574q](#) PMID: [25198667](#)
32. Kim D-O, Chun OK, Kim YJ, Moon H-Y, Lee CY. Quantification of Polyphenolics and Their Antioxidant Capacity in Fresh Plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003; 51(22):6509–15. PMID: [14558771](#)
33. Díaz-Mula HM., Zapata PJ., Guillén F, Castillo S, Martínez-Romero D, Valero D, et al.. Changes in physicochemical and nutritive parameters and bioactive compounds during development and on-tree ripening of eight plum cultivars: a comparative study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2008; 88(14), 2499–2507.
34. Netzel, M, Fanning, K, Netzel, G, Frank, T, Zabarar, D, Russell, D, et al. Urinary Pharmacokinetics of Queen Garnet Plum Anthocyanins in Healthy Human Subjects. *Emerging Trends in Dietary*

Components for Preventing and Combating Disease. ACS Symposium series. 1093: American Chemical Society; 2012. p. 375–392

35. Murray XJ., Holcroft DM., Cook NC., Wand SJE. Postharvest quality of 'Laetitia' and 'Songold' (*Prunus salicina* Lindell) plums as affected by preharvest shading treatments. *Postharvest Biology and Technology*. 2005; 37(1), 81–92.
36. Krinsky NI, Yeum K-J. Carotenoid—radical interactions. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003; 305(3):754–60. PMID: [12763057](#)
37. Gil MI, Tomás-Barberán FA, Hess-Pierce B, Kader AA. Antioxidant Capacities, Phenolic Compounds, Carotenoids, and Vitamin C Contents of Nectarine, Peach, and Plum Cultivars from California. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002; 50(17):4976–82. PMID: [12166993](#)
38. Daza A, Camacho M, Galindo I, Arroyo FT, Casanova L, Santamaría C. Comparative fruit quality parameters of several Japanese plum varieties in two newly established orchards, organic and conventionally managed. *International Journal of Food Science & Technology*. 2012; 47(2):341–9.
39. Giusti MM, Wrolstad RE. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. 2001:1–13.
40. Slinkard K, Singleton VL. Total Phenol Analysis—Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1977; 28(1):49–55.
41. Nagata M, Yamashita I. Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. *Journal-Japanese Society of Food Science and Technology*. 1992; 39:925–.
42. Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 1996 Jul; 239(1):70–6. PMID: [8660627](#)
43. Schreiner M. Vegetable crop management strategies to increase the quantity of phytochemicals. *European Journal of Nutrition*. 2005; 44(2):85–94. PMID: [15309426](#)
44. Gross J. Pigments in vegetables: chlorophylls and carotenoids. Van Nostrand Reinhold. 1991.
45. Oliveira AB, Moura CF, Gomes-Filho E, Marco CA, Urban L, Miranda MRA. The impact of organic farming on quality of tomatoes is associated to increased oxidative stress during fruit development. *PLoS ONE*. 2013; 8(2):e56354. doi: [10.1371/journal.pone.0056354](#) PMID: [23437115](#)
46. Herrmann KM, Weaver LM. The shikimate pathway. *Annual review of plant biology*. 1999; 50(1):473–503.
47. Robbins RJ. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003; 51(10):2866–87. PMID: [12720366](#)
48. Asami DK, Hong YJ, Barrett DM, Mitchell AE. Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003; 51(5):1237–41. PMID: [12590461](#)
49. Lima GPP, Da Rocha SA, Takaki M, Ramos PRR, Ono EO. Comparison of polyamine, phenol and flavonoid contents in plants grown under conventional and organic methods. *International Journal of Food Science & Technology*. 2008; 43(10):1838–43.
50. Peck GM, Andrews PK, Reganold JP, Fellman JK. Apple orchard productivity and fruit quality under organic, conventional, and integrated management. *HortScience*. 2006; 41(1):99–107.
51. Veberic R, Trobec M, Herbinger K, Hofer M, Grill D, Stampar F. Phenolic compounds in some apple (*Malus domestica* Borkh) cultivars of organic and integrated production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2005; 85(10): 1687–1694.
52. Szeto YT, Tomlinson B, Benzie IF. Total antioxidant and ascorbic acid content of fresh fruits and vegetables: implications for dietary planning and food preservation. *British Journal of Nutrition*. 2002; 87(01):55–59.
53. Piga A, Del Caro A, Corda G. From plums to prunes: influence of drying parameters on polyphenols and antioxidant activity. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2003; 51(12): 3675–3681.
54. García-Mariño N, De La Torre F, Matilla A. Organic acids and soluble sugars in edible and nonedible parts of damson plum (*Prunus domestica* L. subsp. *insititia* cv. *Syriaca*) fruits during development and ripening. *Food Science and Technology International*. 2008; 14(2): 187–193.
55. Del Caro A, Piga A, Pinna I, Fenu PM, Agabbio M. Effect of drying conditions and storage period on polyphenolic content, antioxidant capacity, and ascorbic acid of prunes. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2004; 52(15): 4780–4784.
56. Singh SP, Singh Z, Swinny EE. Sugars and organic acids in Japanese plums (*Prunus salicina* Lindell) as influenced by maturation, harvest date, storage temperature and period. *International Journal of Food Science & Technology*. 2009; 44(10):1973–82.

57. Chen F-X, Liu X-H, Chen L-S. Developmental changes in pulp organic acid concentration and activities of acid-metabolising enzymes during the fruit development of two loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cultivars differing in fruit acidity. *Food Chemistry*. 2009; 114(2):657–64.
58. López-Bucio J, Nieto-Jacobo MaF, Ramírez-Rodríguez V, Herrera-Estrella L. Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. *Plant Science*. 2000; 160(1):1–13. PMID: [11164572](#)
59. Lee SK, Kader AA. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology and Technology*. 2000; 20(3):207–20.
60. Amodio ML, Colelli G, Hasey JK, Kader AA. A comparative study of composition and postharvest performance of organically and conventionally grown kiwifruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2007; 87(7): 1228–1236.
61. Asami DK, Hong Y-J, Barrett DM, Mitchell AE. Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2003; 51(5): 1237–1241.
62. Chassy AW, Bui L, Renaud EN, Van Horn M, Mitchell AE. Three-year comparison of the content of antioxidant microconstituents and several quality characteristics in organic and conventionally managed tomatoes and bell peppers. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2006; 54(21): 8244–8252. PMID: [17032035](#)
63. Sousa C, Valentão P, Rangel J, Lopes G, Pereira JA, Ferreres F, et al. Influence of two fertilization regimens on the amounts of organic acids and phenolic compounds of tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *costata* DC). *Journal of agricultural and food chemistry*. 2005; 53(23): 9128–9132. PMID: [16277412](#)
64. Barrett DM, Weakley C, Diaz JV, Watnik M. Qualitative and nutritional differences in processing tomatoes grown under commercial organic and conventional production systems. *Journal of food science*. 2007; 72(9): C441–C451. PMID: [18034702](#)
65. Roussos PA. Phytochemicals and antioxidant capacity of orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. *Salustiana*) juice produced under organic and integrated farming system in Greece. *Scientia Horticulturae*. 2001; 129(2): 253–258.
66. Cayuela JA, Vidueira JM, Albi MA, Gutiérrez F. Influence of the ecological cultivation of strawberries (*Fragaria x Ananassa* Cv. *Chandler*) on the quality of the fruit and on their capacity for conservation. *Journal of agricultural and food chemistry*. 1997; 45(5): 1736–1740.
67. Gündüz K, Özdemir E. The effects of genotype and growing conditions on antioxidant capacity, phenolic compounds, organic acid and individual sugars of strawberry. *Food Chemistry*. 2014; 155(0):298–303.
68. Vicente AR, Manganaris GA, Cisneros-Zevallos L, Crisosto CH. 13 *Prunus*. Health-Promoting Properties of Fruits and Vegetables. 2011:238–259.
69. Crisosto CH, Crisosto GM, Echeverria G, Puy J. Segregation of plum and pluot cultivars according to their organoleptic characteristics. *Postharvest Biology and Technology*. 2007; 44(3):271–6.
70. Walkowiak-Tomczak D. Characteristics of plums as a raw material with valuable nutritive and dietary properties—a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 2008; 58(4).
71. Kader AA. Flavor quality of fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2008; 88(11):1863–8.
72. Pizarro L, Stange C. Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Ciencia e investigación agraria*. 2009; 36:143–62.
73. Murray XJ, Holcroft DM, Cook NC, Wand SJE. Postharvest quality of ‘Laetitia’ and ‘Songold’ (*Prunus salicina* Lindell) plums as affected by preharvest shading treatments. *Postharvest Biology and Technology*. 2005; 37(1):81–92.
74. Chun OK, Kim D-O, Moon HY, Kang HG, Lee CY. Contribution of Individual Polyphenolics to Total Antioxidant Capacity of Plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003; 51(25):7240–5. PMID: [14640564](#)
75. Tulipani S, Mezzetti B, Capocasa F, Bompadre S, Beekwilder J, De Vos CHR, et al. Antioxidants, phenolic compounds, and nutritional quality of different strawberry genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008; 56(3):696–704. doi: [10.1021/jf0719959](#) PMID: [18211027](#)

Supporting 1 Table. ANOVA interactions between cultivation system, genotype and year factors and effects in total anthocyanins, polyphenols, antioxidant capacity and carotenoids values

	TAC (mg/100 g FW)	TPC (mg GAE/100 g FW)	ABTS-h (umols ET/100 g FW)	FRAP (umols ET/100 g FW)	ABTS-l (umols ET/100 g FW)	TCC (mg/100 g FW)
CS x G						
Golden Japan conv	-	64.86	514.7	569.4	4.7571	0.1283
Golden Japan org	-	78.43	588.3	660.0	5.5437	0.1467
Showtime conv	4.361	259.95	2622.4	2285.7	4.8001	0.3067
Showtime org	4.147	251.53	2678.8	2464.5	6.4906	0.2517
Sapphire conv	1.832	126.48	1082.8	1113.9	3.7575	0.1350
Sapphire org	2.372	129.78	1031.0	1136.7	3.9347	0.1367
Santa Rosa conv	2.223	78.34	529.3	622.4	4.0004	0.1133
Santa Rosa org	3.219	108.1	801.2	927.8	3.8013	0.1450
Souvenir conv	0.560	116.80	928.3	1032.4	5.7148	0.2283
Souvenir org	0.542	119.59	957.9	1003.8	6.2817	0.2850
Black amber conv	26.872	146.32	1174.4	1968.4	5.4585	0.2100
Black amber org	32.768	154.17	1160.5	2076.7	5.7361	0.2133
Fortune conv	2.075	135.92	1094.1	1232.7	7.0209	0.2133
Fortune org	2.348	143.1	1234.1	1435.3	7.3980	0.2083
Friar conv	17.298	180.44	1452.8	1958.7	5.4750	0.1600
Friar org	19.033	218.41	1517.7	2193.1	6.4641	0.1533
Primetime conv	6.222	169.84	1372.1	1855.2	4.1191	0.0750
Primetime org	6.582	185.66	1606.4	1970.9	5.1266	0.0667
Larry Ann conv	2.970	126.13	1159.1	1325.5	6.2884	0.3267
Larry Ann org	3.275	132.68	1129.7	1263.7	6.3312	0.3717
Laetita conv	0.708	116.16	842.4	1067.2	5.2957	0.1117
Laetita org	0.697	122.19	925.8	1110.9	5.4167	0.1100
Songold conv	-	165.80	1305.3	1500.0	8.7518	0.3067
Songold org	-	172.84	1434.3	1753.4	7.9993	0.3567
Plumlate conv	3.188	123.77	973.4	1061.5	4.8969	0.0733
Plumlate org	5.307	144.64	1224.1	1433.3	6.6218	0.0717
G x Y						
Golden Japan 2012	-	95.63 l	784.9	866.0 lmn	6.3024 cdefg	0.2067 fg
Golden Japan 2013	-	47.67 m	318.1	363.4 o	3.9984 kl	0.0683 m
Showtime 2012	2.844 efgh	235.08 b	2499.1	2070.4 cd	5.1575 ghijk	0.3300 b
Showtime 2013	5.663 def	276.40 a	2802.1	2679.9 a	6.1332 cdefgh	0.2283 def
Sapphire 2012	2.523 fgh	126.77 hijk	1066.1	1149.5 ij	3.7921 kl	0.1750 ghi
Sapphire 2013	1.680 gh	129.49 hijk	1047.7	1101.2 ijk	3.9001 kl	0.0967 klm
Santa Rosa 2012	3.958 efgh	93.89 l	730.1	868.5 klmn	4.4528 jkl	0.1683 ghij
Santa Rosa 2013	1.485 h	92.46 l	600.5	681.8 n	3.3488 l	0.0900 lm
Souvenir 2012	0.570 h	99.55 l	778.4	816.4 mn	4.8094 ijk	0.2567 cde
Souvenir 2013	0.532 h	136.85 gh	1107.8	1219.8 ij	7.1871 bcd	0.2567 cde
Black amber 2012	15.593 c	108.31 jkl	985.2	1327.1 ghi	4.9906 hijk	0.2017 fg
Black amber 2013	44.047 a	192.18 de	1349.7	2718.0 a	6.2040 cdefgh	0.2217 efg
Fortune 2012	3.342 efgh	139.30 gh	1176.9	1344.1 ghi	7.0044 bcde	0.2750 bcd
Fortune 2013	1.082 h	139.63 gh	1151.3	1323.8 ghi	7.4144 abc	0.1467 hijk
Friar 2012	8.678 d	174.41 ef	1505.3	1794.3 ef	4.6188 jkl	0.1217 jkl
Friar 2013	27.653 b	224.44 bc	1465.1	2367.5 b	7.3203 abcd	0.1917 fgh
Primetime 2012	6.493 de	147.47 gh	1404.6	1568.2 fg	3.8968 kl	0.0850 lm
Primetime 2013	6.310 de	208.03 cd	1573.9	2257.8 bc	5.3488 fghij	0.0567 m
Larry Ann 2012	2.435 fgh	109.54 ijkl	1012.7	1084.5 ijkl	5.9987 defghi	0.3967 a
Larry Ann 2013	3.810 efgh	149.26 gh	1465.1	1504.7 gh	6.6209 cdef	0.3017 bc
Laetita 2012	0.625 h	107.42 kl	822.1	967.3 jklm	4.9678 hijk	0.1233 ijkl
Laetita 2013	0.780 h	130.93 hij	946.1	1210.7 ij	5.7446 efghij	0.0983 klm
Songold 2012	-	157.57 fg	1282.9	1342.4 ghi	8.5517 a	0.4333 a
Songold 2013	-	181.08 e	1456.7	1911.0 de	8.1994 ab	0.2300 def
Plumlate 2012	5.192 defg	135.92 gh	1065.8	1261.5 hi	6.1438 cdefgh	0.0783 lm
Plumlate 2013	3.303 efgh	132.50 hi	1131.7	1233.2 i	5.3750 fghij	0.0667 m
CS x Y						
conventional 2012	4.2435	126.04	1089.6 b	1160.1 c	5.0353	0.2156
conventional 2013	8.1764	152.55	1226.0 a	1546.5 a	5.7857	0.1518
organic 2012	4.2435	140.25	1235.7 a	1370.7 b	5.8396	0.2231
organic 2013	9.3409	161.44	1270.4 a	1618.5 a	6.0289	0.1641

Means with different letters in the same column present significant differences. P<0.05. TAC = Total anthocyanins content. TPC = Total polyphenols content. ABTS-h = ABTS hydrophilic extract. TCC = Total carotenoids content. ABTS-l = ABTS lipophilic extract. CS: Cultivation system. G: genotype. Y: year.

Supporting 2 Table. Pearson's correlation coefficients of hidrophilic extraction assays (TAC,TPC, ABTS-h, FRAP), lipophilic extraction assays (ABTS-l and TCC) and organic acids values

	Hydrophilic extraction				Lipophilic extraction		Organic acids					
	TAC	TPC	ABTS-H assay	FRAP assay	ABTS-L assay	TCC	Ascorbic acid	Citric acid	Fumaric acid	Malic acid	Shikimic acid	Succinic acid
TPC	0.395***											
ABTS-H assay	0.180*	0.886***										
FRAP	0.647***	0.891***	0.794***									
ABTS-L assay	0.189*	0.431***	0.351***	0.402***								
TCC	0.077 ^{ns}	0.128 ^{ns}	0.208*	0.119 ^{ns}	0.443***							
Ascorbic acid	0.262**	0.240**	0.305***	0.269**	-0.1312 ^{ns}	0.102 ^{ns}						
Citric acid	0.084 ^{ns}	0.645***	0.716***	0.500***	0.303***	0.308***	0.337***					
Fumaric acid	-0.018 ^{ns}	0.156 ^{ns}	0.178*	0.085 ^{ns}	-0.053 ^{ns}	0.112 ^{ns}	0.467***	0.194*				
Malic acid	-0.101 ^{ns}	0.409***	0.487***	0.260**	0.041 ^{ns}	0.195*	0.137 ^{ns}	0.596***	-0.007 ^{ns}			
Shikimic acid	0.246**	0.104 ^{ns}	0.082 ^{ns}	0.176*	0.148 ^{ns}	0.254**	0.401***	0.267**	-0.083 ^{ns}	-0.154 ^{ns}		
Succinic acid	0.468***	0.366***	0.177*	0.379***	0.334***	0.075 ^{ns}	0.015 ^{ns}	0.131 ^{ns}	-0.205*	-0.007 ^{ns}	0.130 ^{ns}	
Tartaric acid	0.254**	0.525***	0.396***	0.450***	0.561***	0.124 ^{ns}	-0.036 ^{ns}	0.454***	0.024 ^{ns}	0.053 ^{ns}	0.266**	0.328***

^{ns}= non significant, * = significant $P < 0.05$, ** = significant $P < 0.01$, *** = significant $P < 0.001$

Publicación 2

Effect of management (organic vs conventional) on volatile profiles of six plum cultivars (*Prunus salicina* Lindl.). A chemometric approach for varietal classification and determination of potential markers

**Francisco J. Cuevas, José M. Moreno-Rojas, Francisco T. Arroyo, A. Daza
& María José Ruiz-Moreno**

Food chemistry, (2016) 199, 479-484

Q1 (6/128) (JCR-ISI, Food Science & Technology, 2016)

Impact Factor: 4.529

The final published journal article (PJA) is included with the permission of Elsevier editorial



Effect of management (organic vs conventional) on volatile profiles of six plum cultivars (*Prunus salicina* Lindl.). A chemometric approach for varietal classification and determination of potential markers



F.J. Cuevas^a, J.M. Moreno-Rojas^{a,*}, F. Arroyo^b, A. Daza^b, M.J. Ruiz-Moreno^a

^a Postharvest Technology and Agrifood Industry Area, Andalusian Institute of Agricultural and Fishing Research and Training (IFAPA) Alameda del Obispo, Córdoba, Spain

^b Organic Production and Natural Resources, Andalusian Institute of Agricultural and Fishing Research and Training (IFAPA) Las Torres-Tomejil, Seville, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 September 2015

Received in revised form 25 November 2015

Accepted 10 December 2015

Available online 10 December 2015

Keywords:

Prunus salicina

Organic cultivation

Volatile compounds

SPME–GC–MS

Chemometrics

ABSTRACT

The volatile profiles of six plum cultivars ('Laetitia', 'Primetime', 'Sapphire', 'Showtime', 'Songold' and 'Souvenir') produced under two management systems (conventional and organic) and harvested in two consecutive years were obtained by HS–SPME–GC–MS. Twenty-five metabolites were determined, five of which (pentanal, (*E*)-2-heptenal, 1-octanol, eucalyptol and 2-pentylfuran) are reported for the first time in *Prunus salicina* Lindl. Hexanal stood out as a major volatile compound affected by the management system. In addition, partial least square discriminant analysis (PLS-DA) achieved an effective classification of genotypes based on their volatile profiles. A high classification accuracy model was obtained with a sensitivity of 97.9% and a specificity of 99.6%. Furthermore, the application of a dual criterion, based on a method of variable selection, VIP (variable importance in projection) and the results of a univariate analysis (ANOVA), allowed the identification of potential volatile markers in 'Primetime', 'Showtime' and 'Souvenir' genotypes (cultivars not characterised to date).

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Plum is the world's first stone fruit in terms of cultivated area and the second regarding total production. Spain is the largest plum exporter in the world (seasonal market) and the 4th European country based on total production (FAOSTAT, 2011). In Spain, Andalusia has the largest cultivated area of organic products (more than 50% of total cultivated area and 64% of estimated total organic production) (MAGRAMA, 2013). During the past decade, consumer demands for organic products have significantly increased (European Commission, 2014) and, therefore, studies focused on improving the quality of organic produce are considered essential to respond to European consumer preferences. Quality parameters of organic fruits should be supported by scientific approaches. However, few prospective studies have reported results on fruit quality parameters from the different management systems (organic and conventional) (Carbonaro, Mattera, Nicoli, Bergamo, & Cappelloni, 2002; Raigón, Rodríguez-Burruezo, & Prohens, 2010). In this context, it is well-known that volatile compounds are key contributors to flavour perception and sensory quality. In spite of an increasing interest in organic products, only a few refer-

ences related to volatile characterisation and crop system management were found (Macoris, De Marchi, Janzantti, & Monteiro, 2012). One of these studies demonstrated that organic products presented a higher overall flavour acceptability compared to conventional ones (Peck, Andrews, Reganold, & Fellman, 2006) and to our knowledge, there are no studies on organic plums in the literature. Regarding flavour characterisation, different volatile compounds such as aldehydes, alcohols and terpenoids have been reported as important contributors of plum aroma (Louw, & Theron, 2012). Several factors, such as cultivar, climatology, ripening stage (Visai, & Vanoli, 1997; Vendramini, & Trugo, 2000) and postharvest technology (harvesting, packaging and processing) (Botondi, De Santis, Bellincontro, Vizovitis, & Mencarelli, 2003) have been described as the main factors to impact on fruit volatile profiles and, therefore, on the overall sensory impression of plum fruit. In addition, plum flavour has been reported as a quality attribute with an impact on consumer acceptance (Crisosto, Crisosto, Echeverria, & Puy, 2007). In this context, among all the analytical methods used to establish flavour quality, solid phase micro-extraction (SPME) has been shown to be a simple, quick, sensitive and solvent-free technique. It has been widely used to obtain volatile profiles for fruits and for *Prunus* genotypes (Chai, Wu, Liu, Wang, and Yang, 2012; Montero-Prado, Bentayeb, & Nerin, 2013; Nunes, Coimbra, Saraiva, & Rocha 2008; Predieri, Dris, &

* Corresponding author.

E-mail address: josem.moreno.rojas@juntadeandalucia.es (J.M. Moreno-Rojas).

Rapparini, 2004). No references have been found to date concerning the volatile profile of several cultivars under study in this work, such as 'Primetime', 'Showtime' and 'Souvenir'. Thus, in this study, an HS-SPME-GC-MS strategy was executed to characterise six plum cultivars: 'Laetitia', 'Primetime', 'Sapphire', 'Showtime', 'Songold' and 'Souvenir' produced under conventional and organic management systems and harvested in two years.

2. Materials and methods

2.1. Plant material, experimental design and treatments

The experiment was carried out in 2012 and 2013 in two experimental orchards located at IFAPA 'Las Torres-Tomejil' (Seville, Spain) (37° 30' 48" N; 5° 57' 46" W). Andalusian Institute of Agricultural and Fishery Research and Training (IFAPA) is the authority who issued permission for these private fields to be used for the experiment. Six different plum cultivars were chosen (Table 1) based on their adaptation to the climatic conditions of southern Spain (Daza et al., 2012) and the novelty of the study of their volatile profile.

The experimental design was a total randomised design with three replicates. The fertilisation applied in both systems was in agreement with the established guidelines for organic (animal manure and cover crop, in our case) and conventional (ammonium nitrate and potassium sulphate) cultivations. Plant protection in conventional orchards was performed following integrated management guidelines.

2.2. Sample preparation

Eight fruits per tree and six trees per cultivar (Table 1) and treatment were harvested and transported to the laboratory for analysis. Then, the pit was removed and each sample was milled, under liquid nitrogen, using a cryogenic mill (Freezer Mill 6870; SPEX, Metuchen, NJ), in order to obtain plum powder. Powdered samples were stored at -80 °C until volatile compound analyses.

All plums used in this research (organic and conventional) were harvested at the same maturity index (defined as soluble solids content/acidity). No significant differences were found by 3-way ANOVA for this factor (p -value = 0.5761).

2.3. Automated HS-SPME-GC-MS analysis

One gram of plum powder, 1.0 mL of EDTA solution (58.45 g L⁻¹ and pH 7.0 adjusted with 1 M NaOH) and 2.0 µL of 3-octanol ethanolic solution at 10 mg L⁻¹ were placed into a 10-mL glass vial containing 2.2 g of CaCl₂. 3-Octanol was used as internal standard, in agreement with other studies of *Prunus* (Yiju et al., 2009) and plum volatile characterisation (Chai et al., 2012). The mixture was homogenised with a vortex shaker for 1.0 min and then loaded onto a Combi-PAL autosampler device (CTC Analytical, Zwingen, Switzerland). The volatile compounds were extracted by HS-SPME with a 65 µm polydimethylsiloxane/divinylbenzene fibre supplied

by Supelco (Bellefonte, PA). Incubation and extraction times were performed at 60 °C for 10 and 30 min, respectively, under continuous agitation (10 Hz). Desorption and fibre conditioning were carried out in the injector at 250 °C for 15 min. Incubation, extraction, and desorption of the volatile compounds were performed automatically by the Combi-PAL autosampler.

Gas chromatographic analyses were carried out on a Trace GC Ultra gas chromatograph (ThermoFisher Scientific S.p.A., Rodano, Milan, Italy) coupled to an ISQ single quadrupole mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Austin, Texas, USA). Injections were run in duplicate in splitless mode for 1 min. Volatile compounds were chromatographed on a DB-5 ms column (60 m × 0.25 mm × 0.25 µm film thickness, J&W Scientific) with helium as carrier gas at a constant flow of 1.0 mL min⁻¹. Oven temperature conditions were 45 °C for 1 min, increased to 90 °C at the rate of 6 °C min⁻¹, increased to 210 °C at the rate of 3 °C min⁻¹, increased to 250 °C at the rate of 6 °C min⁻¹ and then held for 16 min. Electron ionisation was at 70 eV. The source and transfer line temperatures were 200 °C and 240 °C, respectively. Detection was performed in scan mode from m/z 35 to 204 and at a scanning speed of 7.0 scan s⁻¹. The chromatograms and spectra were recorded and processed using Thermo Xcalibur software (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA).

2.4. Identification and quantification

Compounds were identified by comparing the mass spectra and retention times with those of pure standards supplied by Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). When standards were not available, the identification was performed using the NIST 05 mass spectral library and confirmed by linear retention indices (LRI), calculated by the injection of a mixture of *n*-alkane standards (C7–C40) run under the same conditions.

Semi-quantification was performed by direct comparison of the internal standard peak areas with specific ions selected and integrated for each volatile compound (Table 2). Then, they were normalised to the internal standard ion peak area before statistical analysis. A quality control test was carried out by injection of a reference sample consisting of a mixture of 50% 'Laetitia' and 'Songold', (processed under same sample conditions) included in the sequence every four samples to check analysis performance.

2.5. Data analysis

Univariate statistical analysis was performed using Statistix[®] software (v. 9.0, Analytical Software, Tallahassee, FL). Data were subjected to analysis of variance (ANOVA), followed by a comparison of means according to the least significant difference (LSD) test. Multivariate statistical analysis (principal component analysis and partial least squares discriminant analysis) was performed using the PLS toolbox SOLO[®] demo software (v. 7.9.3, Eigenvector Research Inc., Wenatchee, WA). The application of dual criteria based on a method of variable selection, VIP (variable importance in projection) and the results obtained from univariate analysis (ANOVA) allowed the identification of potential varietal volatile markers.

3. Results and discussion

3.1. Volatile compounds

A total of twenty-five volatile compounds were identified by the automated HS-SPME-GC-MS method, using mass spectra, LRI and pure standards (Table 2). The twenty-five volatile compounds identified were found in all the cultivars studied. The volatile com-

Table 1
Harvesting date and colours in peel and flesh of plum cultivars.

Genotype	Colour		Harvesting date	
	Skin	Flesh	2012	2013
Showtime	Red-purple	Yellow	19/06	21/06
Sapphire	Purple	Yellow	09/07	25/06
Souvenir	Red-pink	Yellow	09/07	11/07
Primetime	Dark-purple	Red	24/07	15/07
Laetitia	Red	Orange-yellow	20/08	05/08
Songold	Green-yellow	Yellow	27/08	06/08

Table 2
Volatile identification criteria, retention indices, ions monitored and odours for each compound.

	Identification ^a	LRI ^b	Selected ions ^c	Odours
<i>Aldehydes</i>				
Pentanal	LRI, MS	700	58 /44/57	Almond, malt, pungent
Hexanal	STD	800	56 /44/57	Green grass
Heptanal	STD	890	70 /57/70	Citrus-like, fatty
(<i>E</i>)-2-Heptenal	STD	953	83 /57/70	Soapy, fatty,
Benzaldehyde	STD	971	105 /77	Almond
Octanal	STD	1004	110 /56/84	Citrus-like, fruity
Benzeneacetaldehyde	LRI, MS	1055	92 /91/120	Honey-like
Nonanal	STD	1106	57 /70/98	Citrus-like soapy,
Decanal	STD	1207	57 /70/82	Aldehyde-like, fruity, soapy.
<i>Alcohols</i>				
(<i>Z</i>)-3-Hexen-1-ol	STD	845	82 /67/100	Green
1-Hexanol	STD	854	69 /56/84	Green
(<i>E</i>)-2-Hexen-1-ol	LRI, MS	854	100 /57/82	Green
1-Octanol	LRI, MS	1066	84 /56/70	Citrus-like
<i>Terpenoids</i>				
<i>p</i> -Cymene	STD	1034	119 /91/134	Green, rubber
Limonene	STD	1041	68 /93/136	Orange-like, fruity
Eucalyptol	STD	1048	154 /81/108/139	Minty, eucalyptus
(<i>Z</i>)-Linalool oxide	STD	1080	59 /94/111	Floral
(<i>E</i>)-Linalool oxide	STD	1096	59 /94/111	Floral
<i>p</i> -Menth-1-en-9-al	LRI, MS	1195	94 /77	Herbal, spicy
α -Terpineol	STD	1210	59 /93/121	Green, fruity
β -Cyclocitral	STD	1238	137 /109/123	Sweet, green, floral-
β -Damascenone	STD	1395	69 /121	Cooked apple-like
α -Ionone	STD	1443	121 /136/93	Floral-
β -Ionone	STD	1494	177 /121/161	Floral, violets
<i>Furans</i>				
2-Pentylfuran	LRI, MS	992	81 /82/138	Buttery, green

^a STD: Compound identified by commercial standard; LRI, MS: Compound identified by linear retention index and mass spectra comparison.

^b LRI: linear retention index on DB5-MS column.

^c Quantitative ions are marked in bold type letter and qualitative ions are marked in normal character.

Table 3
Effect of genotype, cultivation system and year on volatile compounds.

	Aldehydes	Alcohols	Terpenoids	Furans
<i>Genotype</i>				
'Showtime'	185 d	259 c	468 b	9.39 a
'Sapphire'	561 b	601 a	341 c	6.98 b
'Souvenir'	551 b	441 b	564 a	9.27 a
'Primetime'	224 cd	195 c	286 cd	6.22 b
'Laetitia'	297 c	557 a	204 e	2.39 c
'Songold'	748 a	619 a	277 d	2.45 c
significance	***	***	***	***
<i>Cultivation system</i>				
Conventional	455 a	431	347	5.87
Organic	401 b	459	367	6.36
Significance	**	ns	ns	ns
<i>Year</i>				
2012	356 b	514 a	343 b	5.46 b
2013	500 a	376 b	370 a	6.78 a
Significance	***	***	*	***

Unit = concentration ($\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$, equivalent of 3-octanol) and ANOVA of three factors. Significance level: ns = not significant, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

pounds identified were classified based on their chemical families: aldehydes, alcohols, terpenoids and furans. A total of nine aldehydes, four alcohols, eleven terpenoids (eight monoterpenoids and three C_{13} -norisoprenoids), and one furan (Table 3) were quantified by direct comparison with the internal standard ion peak (Chai et al., 2012; Montero-Prado et al. 2013). Five compounds, pentanal (almond, malt, pungent odours), (*E*)-2-heptenal (soapy, fatty odours), 1-octanol (citrus-like odour), eucalyptol (minty, eucalyptus odours) and 2-pentylfuran (buttery, green odours) were reported for the first time in plums.

Analysis of variance was carried out to provide an overall view of the influence of genotype, cultivation system and year on the

volatile profile. The results obtained for each factor are described individually below (Table 3).

3.2. Effect of cultivar

Genotypes exhibited a huge range of differences in all volatile groups. Aldehydes, alcohols and terpenoids were the major chemical families identified (Table 3) for all the six cultivars studied. 'Songold' presented the highest total aldehydes content. It also presented the highest total alcohols content (as well as 'Laetitia' and 'Sapphire' cultivars) while 'Souvenir' exhibited the highest concentration of terpenoids. 'Sapphire' presented intermediate relative contents of terpenoids and 'Primetime' and 'Showtime' scored the lowest values for total aldehyde and alcohol content.

3.3. Effect of cultivation system

Regarding the cultivation system, aldehydes were the only volatile group affected by the management system (Table 3), presenting higher levels in the samples cultivated under conventional practices (approx. 12%). Based on the interactions found (Supplementary Table 1), the impact of the cultivation system on the total aldehyde and alcohol concentrations differs depending on the variety (0.001 and 0.01 respectively). Aldehydes have been reported as characteristic components of peach skin (Shen et al., 2014), being correlated to unripe characteristics and a higher firmness of *Prunus* fruits (Sánchez, Besada, Badenes, Monforte, & Granell, 2012). The main contributor compound to the total aldehyde content was hexanal (green, grass odours, Table 4) in agreement with the literature where it is described as the main contributor to plum-like aroma (Williams, & Ismail, 1981). Among aldehydes, hexanal and (*E*)-2-heptenal (soapy, fatty odours) content were impacted by

Table 4
Volatile compounds identified in plum cultivars. Volatile content ($\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ equivalent of 3-octanol) is expressed as averaged data.

	'Showtime'		'Sapphire'		'Souvenir'		'Primetime'		'Laetitia'		'Songold'							
	Mean	VIP	Mean	VIP	Mean	VIP	Mean	VIP	Mean	VIP	Mean	VIP						
<i>Aldehydes</i>																		
Pentanal	1.57	b	0.51	2.02	a	2.04	1.43	b	2.97	1.00	c	1.09	0.68	c	1.53	2.17	a	1.48
Hexanal	150	d	0.79	518	b	1.67	506	b	0.79	185	cd	1.82	242	c	0.64	673	a	1.30
Heptanal	0.87	c	0.76	1.40	b	0.35	1.29	b	0.81	1.74	a	0.60	1.49	ab	0.55	1.54	ab	0.61
(E)-2-Heptenal	3.67	bc	0.70	10.9	a	1.51	11.5	a	0.59	2.66	c	1.71	5.26	b	0.39	13.4	a	0.95
Benzaldehyde	12.2	bc	0.46	9.50	bc	0.40	9.15	c	0.34	12.3	bc	0.39	14.8	ab	0.80	19.2	a	1.04
Octanal	0.15	b	0.45	0.14	b	0.82	0.14	b	0.91	0.28	a	0.71	0.21	ab	0.52	0.18	b	0.58
Benzeneacetaldehyde	1.46	b	0.99	1.86	b	0.80	2.89	b	0.57	1.67	b	0.53	8.72	a	1.31	9.20	a	0.96
Nonanal	8.88	d	0.62	16.1	c	0.93	17.4	c	0.42	17.2	c	0.47	23.6	b	1.28	28.9	a	1.15
Decanal	5.23	a	2.05	1.35	c	1.34	1.30	c	1.83	1.93	b	1.97	1.05	c	1.19	1.09	c	1.24
<i>Alcohols</i>																		
(Z)-3-Hexen-1-ol	158	e	0.94	360	c	1.49	305	d	0.58	50.2	f	1.47	415	b	1.01	469	a	1.36
1-Hexanol	86.1	d	1.08	227	a	1.08	127	bc	2.16	121	c	1.12	137	bc	0.83	145	b	0.69
(E)-2-Hexen-1-ol	7.75	b	1.87	9.05	b	1.91	1.05	c	2.16	12.8	a	2.43	1.03	c	1.06	0.89	c	1.37
1-Octanol	6.81	b	0.95	5.54	bc	1.01	7.29	b	1.10	10.3	a	1.01	3.63	d	1.09	3.93	cd	1.25
<i>Terpenoids</i>																		
p-Cymene	16.2	b	0.80	14.6	b	1.74	33.0	a	1.89	14.7	b	0.88	10.1	b	1.51	10.9	b	1.02
Limonene	20.7	c	0.44	20.3	c	0.30	26.4	c	0.27	12.3	d	0.26	80.2	a	0.52	71.7	b	0.43
Eucalyptol	7.62	cd	1.17	17.7	b	1.67	48.8	a	1.87	14.5	bc	1.21	0.53	d	1.50	0.35	d	1.18
(Z)-Linalool oxide	46.2	a	2.12	15.9	c	0.26	37.8	ab	1.50	15.9	c	1.70	22.5	c	0.51	35.8	b	0.81
(E)-Linalool oxide	72.6	a	2.49	19.1	d	0.24	49.4	b	1.60	18.5	d	1.72	26.2	cd	0.76	34.5	c	0.82
p-Menth-1-en-9-ol	201	a	0.82	105	b	0.71	207	a	0.12	104	b	0.11	17.9	c	1.65	41.3	c	1.13
α -Terpineol	37.7	a	0.78	29.1	ab	1.06	29.7	a	0.66	20.1	b	0.19	5.86	c	1.87	3.89	c	1.30
β -Cyclocitral	2.48	b	0.52	2.38	bc	0.52	3.35	a	0.05	1.78	c	0.17	0.66	d	0.99	1.02	d	0.72
β -Damascenone	58.4	cd	1.23	110	a	0.63	119	a	0.74	82.0	b	1.24	37.3	d	0.50	74.0	bc	0.69
α -Ionone	1.07	b	1.05	0.56	cd	0.80	1.38	a	0.74	0.43	d	0.97	0.41	d	0.82	0.74	c	0.80
β -Ionone	3.74	c	0.79	6.75	b	1.15	8.64	a	0.30	2.13	d	1.25	2.18	d	0.79	2.90	cd	1.19
<i>Furans</i>																		
2-Pentylfuran	9.39	a	0.62	6.98	b	0.60	9.27	a	0.04	6.22	b	0.02	2.39	c	1.41	2.45	c	0.95

Unit = Concentration ($\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$, equivalent of 3-octanol). Different letters in the same row means significance differences between cultivars. The same character in the same row means homogeneous groups – Fisher's least differences values (LSD) – at significance level $\alpha = 0.01$.

* Potential marker for each cultivar are marked in bold type letter. It accomplishes: highest significant value ($\alpha = 0.01$) in univariate analysis (ANOVA) and Variable Important Projection (VIP) ≥ 1.50 .

the cultivation system, resulting in higher values for conventional samples (Supplementary Table 1).

3.4. Effect of the year

Significant differences (Table 3) between the years of study were found in all the studied volatile groups. Total aldehydes, total terpenoids and total furans showed higher values for the 2013 harvest, while higher values for total alcohols were found for 2012.

Numerous environmental factors, such as temperature, light, cultural practices, etc., could explain these differences. In 2012, the monthly mean temperature during ripening months was between 3% and 8% higher than in 2013. One of the reasons to explain the different behaviour could be related to the rate of carbon fixation and translocation to the fruit (Watson, Wright, McBurney, Taylor, & Linforth, 2002).

'Genotype' \times 'year' interaction was significant (Supplementary Table 1). Based on the interactions found (Table 3), the year factor impacted in a different way on all the group families of volatile compounds ($p < 0.001$).

3.5. Multivariate analysis

The data set consisted of a 48×25 matrix. The rows represented the plum samples (varieties) analysed and the columns the relative contents of the volatile metabolites determined by HS-SPME-GC-MS.

Previously, it has been described that sample classification with huge differences in the magnitude levels of the observed chemical signal, as in the case of volatile compounds, should be weighted (Urruty, Giraudel, Lek, Roudeillac, & Montury, 2002), thus improv-

ing the recognition and prediction ability of the model. One of the most popular methods is 'auto-scaling' (results were transformed centring them by removing the mean value of each volatile compound and then scaling the results by dividing non-constant volatile compounds by their standard deviation (Berrueta, Alonso-Salces, & Héberger, 2007; Van Den Berg, Hoefsloot, Westerhuis, Smilde, & Van Der Werf, 2006) and it is widely referred to in the literature as a common data pre-processing technique used in volatile analysis (Cynkar, Damberg, Smith, & Cozzolino, 2010; Lozano et al., 2007; Sarkhosh, Ghasemi, & Ayati, 2012). Several data pre-processing transformations were performed and evaluated (log transformation, mean centring, pareto scaling and auto-scaling). 'Auto-scaling' was selected for reaching the higher prediction ability.

Moreover, an unsupervised pattern recognition method (principal components analysis) was carried out to reduce the number of variables, as well as outlier detection, trends and global overview in our study (Supplementary Fig. 1). No outliers were detected and diffuse grouping trends were observed. After that, a supervised multivariate technique (PLS-DA) was performed.

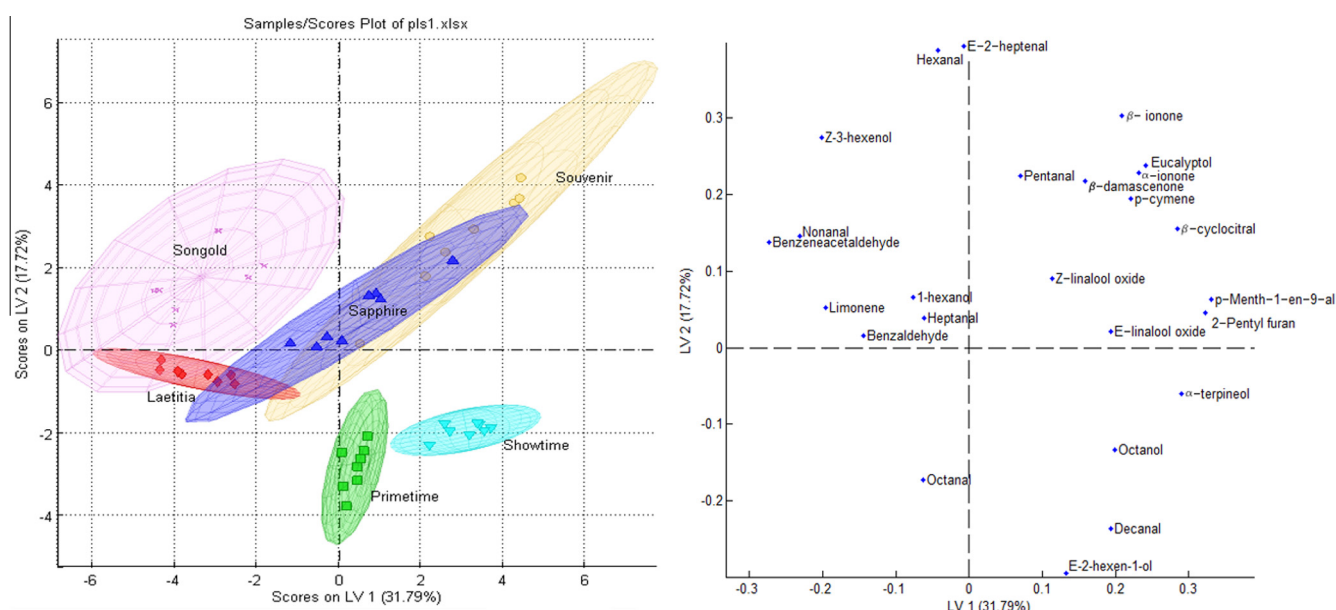
A discrimination model with varietal classification purposes was developed using a partial least squares discriminant analysis PLS-DA (SIMPLS algorithm) previously reported in fruit pattern recognition (Berrueta et al., 2007). A re-sampling method, cross-validation 'leave one out' (LLO), was used to evaluate the prediction ability of our model and obtained the same prediction ability as a random subset with a high number of iterations (20 iterations).

The number of latent variables used was five. Recognition and prediction ability were 100 and 97.5%, respectively (Table 5). The results were considered satisfactory since a selected number of

Table 5

Matrix confusion table. The overview of classification results obtained by PLS-DA model.

	Showtime	Sapphire	Souvenir	Primetime	Laetitia	Songold	Accuracy (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Model training	0	0	0	0	0	0	100	100	100
Showtime	8	0	0	0	0	0	100	100	100
Sapphire	0	8	0	0	0	0	100	100	100
Souvenir	0	0	8	0	0	0	100	100	100
Primetime	0	0	0	8	0	0	100	100	100
Laetitia	0	0	0	0	8	0	100	100	100
Songold	0	0	0	0	0	8	100	100	100
Recognition ability (%)							100	100	100
<i>Model cross-validation</i>									
Showtime	8	0	0	0	0	0	100	100	100
Sapphire	0	8	0	0	0	0	100	100	100
Souvenir	0	0	8	0	0	0	100	100	100
Primetime	0	0	0	8	0	0	100	100	100
Laetitia	0	0	0	0	8	1	100	100	97.5
Songold	0	0	0	0	0	7	87.5	87.5	100
Prediction ability (%)							97.9	97.9	99.6

**Fig. 1.** PLS-DA scores and loadings plot of volatile data for each plum cultivar in the two first latent variables. Circles shown in the graph represent a confidence interval of 95%.

volatile compounds were able to guarantee the distinction between cultivars. Sensitivity was 100% in all the cultivars except for 'Songold' (87.5%) and the specificity in all the cultivars was 100%, except for 'Laetitia' (97.5%).

The scores and loadings were plotted in Fig. 1. The confidence interval used in the scores plot was 95%. The first three main latent variables (LV) explained 61% of the total data variability. The first LV explained 31.7% of the variability and separated 'Laetitia' and 'Songold' from 'Primetime' and 'Showtime'. Aldehydes and terpenoids were the main factors for discrimination. The second LV (accounting for 17.7% of the total variability) separated 'Songold' from 'Primetime' and 'Showtime'.

Additionally, a new discrimination model was developed using PLS-DA (SIMPLS algorithm), in order to study the effect of the management system on the volatile profile. The results obtained showed poor values for recognition and prediction abilities (supplementary Table 2).

3.6. Potential volatile markers

The application of a dual criterion, based on the univariate and multivariate analysis, allowed the identification of varietal volatile

markers for the 'Showtime', 'Souvenir' and 'Primetime' genotypes (cultivars not characterised to date). In our model, the potential volatile markers (Table 4) were identified based on the variable importance in the projection values, (VIP > 1.50) and on the category from the factor analysis of variance (category 'a' for the highest volatile content, Fisher's least significance differences, significant level equal to 0.01) (Wang et al., 2014). According to this, five volatile compounds (three terpenoids, one aldehyde and one alcohol) were found as candidate markers for the 'Showtime' (decanal and (*E*)-linalool oxide) 'Souvenir' (*p*-cymene and eucalyptol) and 'Primetime' (*E*)-2-hexen-1-ol cultivars (Table 4).

Decanal (aldehyde-like, fruity, soapy odours) and (*E*)-2-hexen-1-ol (green odour) were described previously for different *Prunus salicina* Lindl. (Chai et al., 2012) cultivars and *Prunus* genus (Gokbulut, & Karabulut, 2012). Monoterpenoids, such as (*E*)-linalool oxide (floral odour), *p*-cymene (green, rubber odours) and eucalyptol (minty, eucalyptus odours) have been considered responsible for the varietal character of plums (Belitz, Grosch, & Schieberle, 2009).

We should remark that the study performed to highlight potential markers was developed based on a six-cultivar calibration set, thus further studies should be carried out with a higher number of

varieties to identify new potential markers in more complex models.

4. Conclusions

In this study, an HS-SPME-GC-MS methodology was performed to characterize the aroma profiles of six different cultivars of *P. salicina* Lindl. 'Showtime', 'Sapphire', 'Souvenir', 'Primetime', 'Laetitia' and 'Songold' cultivated under organic and conventional management systems.

Twenty-five volatile organic compounds were quantified in all the samples, describing the plum aroma profile. Five volatile compounds (pentanal, (*E*)-2-heptenal, 1-octanol, eucalyptol and 2-pentylfuran) were described for the first time in *P. salicina* Lindl. aroma. Organic and conventional management systems had a minor effect on volatile profiles. Only differences in the total concentration of aldehydes were found based on this factor. Hexanal stood out as the main volatile compound in the plums and its concentration was affected by the cultivation system. A PLS-DA model was successfully developed and good classification results were obtained (97.9% of accuracy) for the plum cultivars.

Potential volatile markers related to three cultivars were identified from our model. Decanal and (*E*)-linalool oxide were identified in 'Showtime', *p*-cymene and eucalyptol (not reported before) in 'Souvenir', and (*E*)-2-hexen-1-ol in 'Primetime'. Further studies should be performed to elucidate the sensory contribution to plum aroma and to search for new discriminant markers, in accordance with genotypes and management systems. The results could be used for further approaches in consumer preference acceptance, traceability and plum aroma breeding programs.

Acknowledgments

This work has been funded by internal funds Andalusian Institute of Agricultural and Fishing Research and Training (IFAPA, Spain) through Project 'Caracterización organoléptica y funcional de productos ecológicos. Utilización de técnicas isotópicas para la diferenciación entre producto ecológico y convencional' (PP.AVA.AVA201301.7), European Commission with European Social Fund (ESF, EU) and European Rural Development Fund (ERDF, EU).

Francisco Julián Cuevas was granted research contract funding by the Andalusian Institute of Agricultural and Fishing Research and Training (IFAPA, Spain) and the European Social Fund (ESF, EU).

Maria José Ruiz Moreno was granted postdoctoral research contract funding by the Andalusian Institute of Agricultural and Fishing Research and Training (IFAPA, Spain) and European Social Fund (ESF, EU).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.049>.

References

Belitz, H., Grosch, W., Schieberle, P. (2009). Food chemistry, 4th revised and extended edn. Heidelberg, Germany: 62–63.

Berrueta, L. A., Alonso-Salces, R. M., & Héberger, K. (2007). Supervised pattern recognition in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 1158(1), 196–214.

Botondi, R., DeSantis, D., Bellincontro, A., Vizovitis, K., & Mencarelli, F. (2003). Influence of ethylene inhibition by 1-methylcyclopropene on apricot quality, volatile production, and glycosidase activity of low- and high-aroma varieties of apricots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(5), 1189–1200.

Carbonaro, M., Mattered, M., Nicolli, S., Bergamo, P., & Cappelloni, M. (2002). Modulation of antioxidant compounds in organic vs conventional fruit (peach,

Prunus persica L., and pear, *Pyrus communis* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(19), 5458–5462.

Chai, Q., Wu, B., Liu, W., Wang, L., & Yang, C. (2012). Volatiles of plums evaluated by HS-SPME with GC-MS at the germplasm level. *Food Chemistry*, 130(2), 432–440.

Crisosto, C. H., Crisosto, G. M., Echeverria, G., & Puy, J. (2007). Segregation of plum and pluot cultivars according to their organoleptic characteristics. *Postharvest Biology and Technology*, 44, 271–276.

Cynkar, W., Damberg, R., Smith, P., & Cozzolino, D. (2010). Classification of Tempranillo wines according to geographic origin: Combination of mass spectrometry based electronic nose and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, 660(1), 227–231.

Daza, A., Camacho, M., Galindo, I., Arroyo, F. T., Casanova, L., & Santamaría, C. (2012). Comparative fruit quality parameters of several Japanese plum varieties in two newly established orchards, organic and conventionally managed. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(2), 341–349.

European Commission, (2014). EU Proposal for a regulation of the European parliament and of the Council on organic production and labelling of organic products. URL: <http://ec.europa.eu/agriculture/organic/documents/eu-policy/policy-development/report-and-annexes/proposal_en.pdf>. Accessed 10.11.15.

FAOSTAT. (2011). Statistical database.

Gokbulut, I., & Karabulut, I. (2012). SPME-GC-MS detection of volatile compounds in apricot varieties. *Food Chemistry*, 132, 1098–1102.

Louw, E. D., & Theron, K. I. (2012). Volatile dynamics during maturation, ripening and cold storage of three Japanese plum cultivars (*Prunus salicina* Lindl.). *Postharvest Biology and Technology*, 70, 13–24.

Lozano, J., Santos, J. P., Arroyo, T., Aznar, M., Cabellos, J. M., Gil, M., & del Carmen Horrillo, M. (2007). Correlating e-nose responses to wine sensorial descriptors and gas chromatography-mass spectrometry profiles using partial least squares regression analysis. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 127(1), 267–276.

Macoris, M. S., De Marchi, R., Janzanti, N. S., & Monteiro, M. (2012). The influence of ripening stage and cultivation system on the total antioxidant activity and total phenolic compounds of yellow passion fruit pulp. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 1886–1891.

MAGRAMA. (2013). Statistics Organic Production.

Montero-Prado, P., Bentayeb, K., & Nerin, C. (2013). Pattern recognition of peach cultivars (*Prunus persica* L.) from their volatile components. *Food Chemistry*, 138(1), 724–731.

Nunes, C., Coimbra, M. A., Saraiva, J., & Rocha, S. M. (2008). Study of the volatile components of a candied plum and estimation of their contribution to the aroma. *Food Chemistry*, 111(4), 897–905.

Peck, G. M., Andrews, P. K., Reganold, J. P., & Fellman, J. K. (2006). Apple orchard productivity and fruit quality under organic, conventional, and integrated management. *HortScience*, 41(1), 99–107.

Predieri, S., Dris, R., & Rapparini, F. (2004). Influence of growing conditions on yield and quality of cherry: II, Fruit quality. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 2, 307–309.

Raigón, M. D., Rodríguez-Burruezo, A. N., & Prohens, J. (2010). Effects of organic and conventional cultivation methods on composition of eggplant fruits. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(11), 6833–6840.

Sánchez, G., Besada, C., Badenes, M. L., Monforte, A. J., & Granell, A. (2012). A non-targeted approach unravels the volatile network in peach fruit. *PLoS One*, 7(6), e38992.

Sarkhosh, M., Ghasemi, J. B., & Ayati, M. (2012). A quantitative structure-property relationship of gas chromatographic/mass spectrometric retention data of 85 volatile organic compounds as air pollutant materials by multivariate methods. *Chemistry Central Journal*, 6, S4 (Suppl 2).

Shen, J.-Y., Wu, L., Liu, H.-R., Zhang, B., Yin, X.-R., Ge, Y.-Q., & Chen, K.-S. (2014). Bagging treatment influences production of C6 aldehydes and biosynthesis-related gene expression in peach fruit skin. *Molecules*, 19(9), 13461–13472.

Urruty, L., Giraudel, J.-L., Lek, S., Roudeillac, P., & Montury, M. (2002). Assessment of strawberry aroma through SPME/GC and ANN methods. Classification and discrimination of varieties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(11), 3129–3136.

Van Den Berg, R. A., Hoefsloot, H. C., Westerhuis, J. A., Smilde, A. K., & Van Der Werf, M. J. (2006). Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics*, 7(1), 142.

Vendramini, A. L., & Trugo, L. C. (2000). Chemical composition of acerola fruit (*Malpighia puniceifolia* L.) at three stages of maturity. *Food Chemistry*, 71(2), 195–198.

Visai, C., & Vanoli, M. (1997). Volatile compound production during growth and ripening of peaches and nectarines. *Scientia Horticulturae*, 70(1), 15–24.

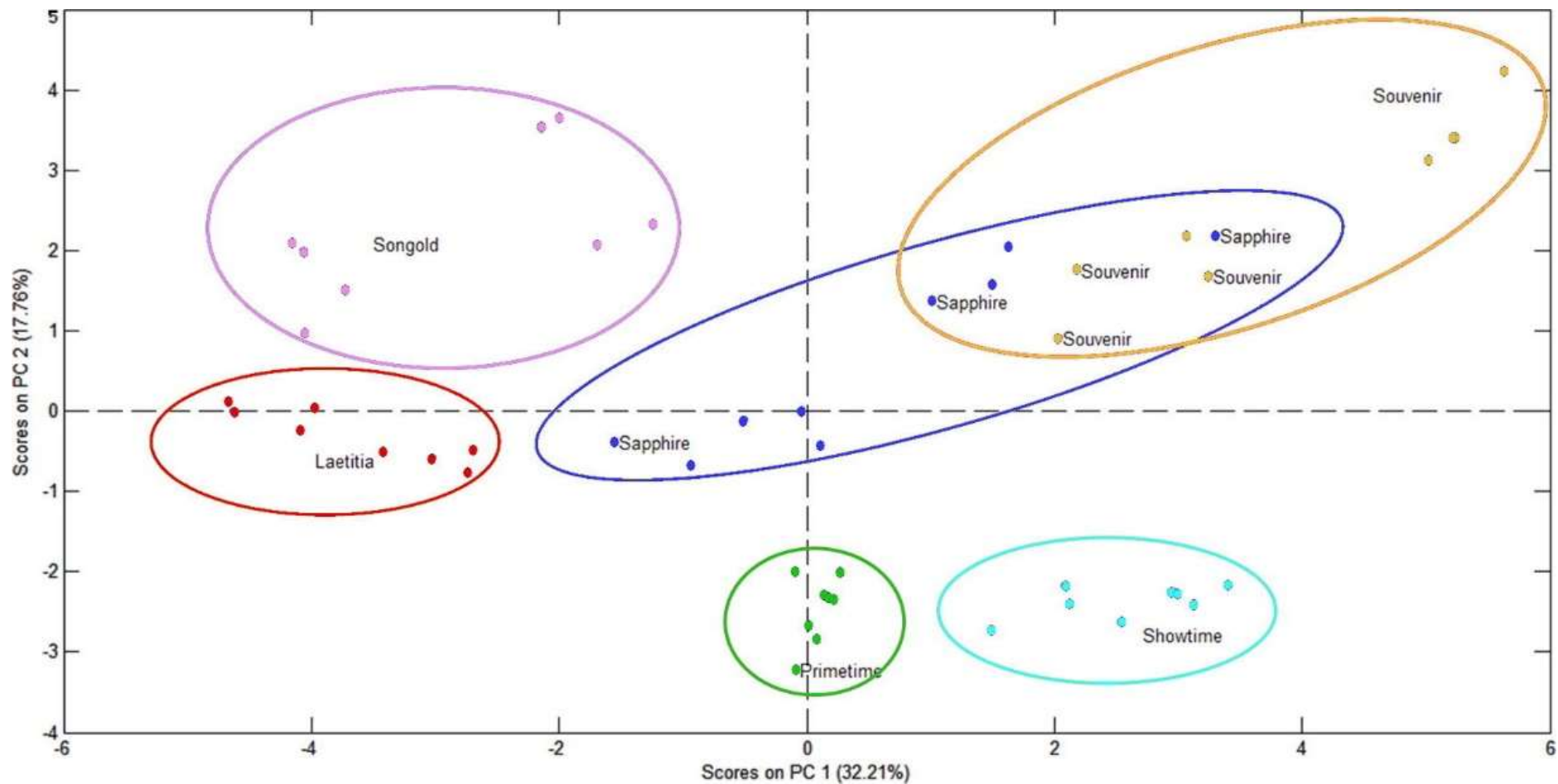
Wang, C., Dong, R., Wang, X., Lian, A., Chi, C., Ke, C., ... Li, E. (2014). Exhaled volatile organic compounds as lung cancer biomarkers during one-lung ventilation. *Scientific Reports*, 4.

Watson, R., Wright, C., McBurney, T., Taylor, A., & Linforth, R. (2002). Influence of harvest date and light integral on the development of strawberry flavour compounds. *Journal of Experimental Botany*, 53(377), 2121–2129.

Williams, A., & Ismail, H. (1981). *The volatile flavour components of plums and their sensory evaluation. Criteria of Food Acceptance*. Zurich, Switzerland: Forster Publishing, 333–345.

Yiju, W., Chunxiang, Y., Shaoua, L., Liu, Y., Younian, W., Jianbo, Z., & Quan, J. (2009). Volatile characteristic of 50 peaches and nectarines evaluated by HS-SPME with GC-MS. *Food Chemistry*, 116, 356–364.

Supplementary Fig. 1. Principal component analysis scatter plot for plum varieties obtained by using volatile profile



Supplementary table 1. Volatile compounds and p-values corresponding to ANOVA of three factors and interactions

	Genotype (G)	Cultivation system (CS)	Year (Y)	CSxG	CSxY	GxY	CSxGxY
<i>Aldehydes</i>	***	**	***	***	ns	***	***
Pentanal	***	ns	***	ns	ns	***	*
Hexanal	***	**	***	***	ns	***	***
Heptanal	***	ns	**	***	ns	***	***
E-2-heptenal	***	*	ns	*	ns	***	***
Benzaldehyde	***	ns	ns	ns	ns	ns	***
Octanal	**	ns	ns	ns	ns	***	ns
Benzeneacetaldehyde	***	ns	**	*	ns	***	*
Nonanal	***	ns	ns	ns	ns	***	ns
Decanal	***	ns	ns	ns	ns	**	**
<i>Alcohols</i>	***	ns	***	**	ns	***	***
Z-3-hexenol	***	ns	***	**	ns	***	***
1-hexanol	***	ns	***	**	ns	***	***
E-2-hexen-1-ol	***	ns	*	ns	ns	***	ns
Octanol	***	ns	ns	ns	ns	***	ns
<i>Terpenoids</i>	***	ns	***	ns	ns	***	**
<i>p</i> -cymene	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Limonene	***	***	***	***	***	***	***
Eucalyptol	***	ns	**	ns	*	*	*
Z-linalool	***	ns	***	*	***	ns	**
E-linalool	***	ns	***	ns	ns	***	ns
<i>p</i> -menth-1-en-9-al	***	ns	*	ns	**	**	**
α -terpineol	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns
β -cyclocitral	***	ns	***	ns	ns	***	***
β -damascenone	***	ns	***	ns	ns	***	**
α -ionone	***	ns	ns	ns	*	***	ns
β - ionone	***	ns	***	ns	ns	***	ns
<i>Furans</i>	***	ns	***	ns	ns	***	ns
2-Pentyl furan	***	ns	***	ns	ns	***	ns

Significance levels: *= $\alpha < 0.05$; **= $\alpha < 0.01$ and ***= $\alpha < 0.001$ are statistical significant differences..

Supplementary table 2. Discriminant model for conventional and organic plums. Sensitivity and specificity values in calibration and cross validation sets. ¹

	Model parameter	Conventional plum	Organic plum
Calibration set	Sensitivity	0.500	0.330
	Specificity	0.583	0.792
Cross-validation set	Sensitivity	0.417	0.250
	Specificity	0.458	0.667

Capítulo 2

Cultivos tradicionales

Capítulo 2 Cultivos tradicionales: la naranja ecológica

La naranja es uno de los frutos más consumidos en el mundo y además es un cultivo tradicional y social que no sólo se desarrolla en la Vega del Guadalquivir, sino también en la zona del Andarax en Almería y en el campo del Andévalo en Huelva. A diferencia de los cultivos alternativos como la ciruela, la naranja se encuentra en un nivel más avanzado de conocimiento. Se han realizado numerosos estudios sobre el potencial bioactivo y el perfil volátil de variedades de naranja. En nuestro caso, en el estudio que nos ocupa las variedades estudiadas vienen establecidas por las principales variedades productivas de la Vega del Guadalquivir, como son “salustiana” y “navelina”. Por ello, en este caso respondemos a unos objetivos acorde a las necesidades tanto del sector como del estado del conocimiento. El gran reto del sector cítrico ecológico es la búsqueda de valor y diferenciación con respecto a las producciones convencionales. A pesar de presentar una composición química relativamente similar entre los manejos, nos centraremos en dos apartados que han sido poco explorados en la literatura científica. Determinamos el perfil volátil diferenciado de las naranjas ecológicas y la utilización de plataformas analíticas que unan varias técnicas analíticas bajo un fin único. Las últimas investigaciones sobre la autenticación de la naranja se centran en la fusión de datos. Es decir, acoplar la información de instrumentos que sumen bondades y que minimicen las limitaciones de cada uno. Entre las técnicas más utilizadas están el uso de isótopos estables y el perfil fenólico de las mismas. Por otro lado, En nuestro caso, además, hemos realizado una propuesta de estudio sobre diferentes partes de la naranja para intentar rastrear la mayor información complementaria tanto química como biológica de los frutos y mejorar así los modelos que se desarrollarán a “posteriori”. Para ello, hemos concretado una zona muy determinada de trabajo, unos cultivares y manejos similares. Para ello, la sección se divide en un capítulo en el que se analiza el potencial aromático de la naranja ecológica y otro capítulo dedicado a la fusión de datos de las distintas partes utilizando isótopos estables y el perfil fenólico de los mismos.

Publicación 3

Assessing a traceability technique in fresh oranges (*Citrus sinensis* L. Osbeck) with an HS-SPME-GC- MS method. Towards a volatile characterisation of organic oranges

Francisco J. Cuevas, José M. Moreno-Rojas, María José Ruiz-Moreno

Food chemistry, 221, 1930-1938 (2017)

Q1: 7/133 (JCR-ISI, Food Science & Technology, 2017)

Impact Factor: 4.946

The final published journal article (PJA) is included with the permission of Elsevier editorial



Assessing a traceability technique in fresh oranges (*Citrus sinensis* L. Osbeck) with an HS-SPME-GC-MS method. Towards a volatile characterisation of organic oranges



Francisco Julián Cuevas, José Manuel Moreno-Rojas*, María José Ruiz-Moreno*

Technology, Postharvest and Food Industries Area, Andalusian Institute of Agricultural and Fisheries Research and Training (IFAPA), Alameda del Obispo Avda, Menéndez Pidal, s/n., 14071 Córdoba, Andalucía, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 August 2016

Received in revised form 28 November 2016

Accepted 29 November 2016

Available online 30 November 2016

Keywords:

Citrus sinensis

Organic farming

PLS-DA

Volatile compounds

HS-SPME-GC-MS

ABSTRACT

A targeted approach using HS-SPME-GC-MS was performed to compare flavour compounds of 'Navelina' and 'Salustiana' orange cultivars from organic and conventional management systems. Both varieties of conventional oranges showed higher content of ester compounds. On the other hand, higher content of some compounds related with the geranyl-diphosphate pathway (neryl and geranyl acetates) and some terpenoids were found in the organic samples. Furthermore, the partial least square discriminant analysis (PLS-DA) achieved an effective classification for oranges based on the farming system using their volatile profiles (90 and 100% correct classification). To our knowledge, it is the first time that a comparative study dealing with farming systems and orange aroma profile has been performed. These new insights, taking into account local databases, cultivars and advanced analytical tools, highlight the potential of volatile composition for organic orange discrimination.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Organic production has become one of the key tools to encourage more sustainable agri-food production. Consequently, organic production plays an important role in the consumption habits of European consumers (Sahota, 2010), meeting the increasing demand for organic products (European Commission, 2014). Spain is the leading organic producer in the European Union with more than 16% of the total cultivated area and, specifically, the second ranked producer of citrus fruit (Willer & Schaack, 2016). Andalusia has the most organic holdings in Spain (with 50% of the total) and 60% of the cultivated area of organic citrus fruit (MAGRAMA, 2013). In this context, studies focused on improving the quality parameters of oranges from organic management are crucial.

Producers and consumers have clear expectations of fresh fruit and vegetables with regards to their appearance, texture, flavour and taste. These attributes seem to be a result of an important number of pre-harvest and post-harvest factors. Most of them are influenced by the management guidelines followed by farmers (organic and conventional). In this regard, several studies reported

controversial results about the quality of organic and conventional products, including health-related compounds.

The flavour impact is a complex mixture of volatile organic chemicals and taste contributors. Quality perception cannot be analysed and it is seldom possible to trace the complex composition of flavour and taste. However, one of the most interesting techniques for studying flavour quality is HS-SPME (Souza-Silva, Gionfriddo, & Pawliszyn, 2015). There is growing interest in this field to elucidate whether the flavour profiles of fresh fruits and vegetables are affected by the cultivation system (Vallverdú-Queralt & Lamuela-Raventós, 2015).

The holistic concept of perception changed years ago and flavour quality is measured as more than the sum of the individual components. Several research studies have shown that the withdrawal of a single substance from a mixture does not necessarily lead to a distinguishable change (Laska & Hudson, 1993), and that some compounds (key compounds) can greatly modify sensory profiles (Dharmawan, Kasapis, Sriramula, Lear, & Curran, 2008), even at very low concentration. HS-SPME-GC-MS, combined with chemometric approaches, have demonstrated their potential in aroma profile discrimination (Cuevas, Moreno-Rojas, Arroyo, Daza, & Ruiz-Moreno, 2016).

More than 300 volatile compounds have been isolated from orange aroma and numerous aroma profile techniques have been used to this end. Among the major compounds found in orange

* Corresponding authors.

E-mail addresses: josem.moreno.rojas@juntadeandalucia.es (J.M. Moreno-Rojas), mariaj.ruiz.moreno@juntadeandalucia.es (M.J. Ruiz-Moreno).

aroma are limonene, β -myrcene and linalool, but their contributions are not linked to the absolute value of concentrations (Perez-Cacho & Rouseff, 2008). On the other hand, minor constituents of orange, such as saturated (octanal, decanal and undecanal) and unsaturated ((*Z*)-3-hexenal and (*E*)-2-decenal) aldehydes, terpenes (β -sinensal, geranial and neral) and esters (ethyl butanoate, ethyl 2-methylbutanoate and ethyl isobutyrate) are important contributors to the total impression of the flavour of oranges (Perez-Cacho & Rouseff, 2008). Most studies into the aroma of citrus juices have been conducted on freshly-squeezed orange juice, without focusing on a specific cultivar. The fragmented information available together with the different extraction techniques used make it difficult to compare volatile profiles among different citrus management systems or agricultural practices. To date, no comparative studies have been performed into the volatile profile of orange flesh from two cultivars under two different crop management systems (organic and conventional) in one specific area.

In this study, an HS-SPME-GC-MS methodology was used to compare the flavour profiles of 'Navelina' and 'Salustiana' cultivars grown following organic and conventional guidelines. Moreover, a model was developed and evaluated as a new 'ex situ' approach to the traceability of organic and conventional fresh oranges.

2. Materials & methods

2.1. Chemicals and reagents

EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) was supplied by Panreac Applichem (Barcelona, Spain). Milli-Q water was obtained from a Milli-Q Plus water system (Millipore, Spain). Sodium chloride, ACS reagent grade (purity $\geq 99.8\%$) and the standard compounds listed in Table 1 were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain).

2.2. Fruit material

All samples were provided from a traditional orange production area located in the 'Guadalquivir' Valley (37° 43' N 5° 04' W) in Córdoba, Spain. This area is characterised by a highly variable annual rainfall, characteristic rolling-plain orchards with mild winter temperatures and the area presented a reference evapotranspiration ranging from 1250 to 1400 mm year⁻¹. The soils from the orchards were classified as cambisols, luvisols and planosols (WMS Soil maps from Andalucía, 2016) according to the FAO methodology of soil classification.

The organic citrus growing practices were based on restrictions in the use of synthetic phytosanitary products and fertilisers (Council Regulation (EC) No 834/2007 – organic production and labelling of organic products), whereas the conventional system was not subjected to this legislation. The organic orchards were characterised by spontaneous green cover, and the application of manure and slurry as the fertilisation strategy. All the orchards (conventional or organic) used drip irrigation. The cultivars selected in our study, *Citrus sinensis* L. Osbeck cv 'Navelina' and *Citrus sinensis* L. Osbeck cv 'Salustiana', were grafted onto Citrange Carrizo (*Citrus sinensis* L. Osb \times *Poncirus trifoliata* L. Raf) for all the orchards (conventional or organic). All samples (360 orange fruits) were analysed using six fruits per replicate and reached the requirements for the quality standards given by the European regulation (Regulation (CE) N° 1221/2008). Oranges were harvested during the 2014/2015 season (four sampling dates (each month) between December 1st and March 15th). All the organic oranges were packed and labelled, identifying their organic origin and certified by 'Sohiscert' and 'CAAE'.

2.3. Sample preparation and basic quality measurements

The flavedo and albedo were separated from each hesperidium and milled. The samples were stored at 80 °C until the analyses. The fruit soluble solids content (SSC) was determined at 25 °C using a digital refractometer (SMART-1, Atago, Japan). The total acidity (TA) was determined titrimetrically with 0.1 M NaOH at pH 8.1 through a Compact Titrosampler (Metrohm, Riverview, FL). The results were measured in triplicate. The samples used showed a similar ripeness index (Supplementary Table 1). Each replicate comprised six individual fruits.

2.4. Automated HS-SPME-GC-MS analysis

The amount of 10 mL of flesh orange juice was diluted to 50 mL with EDTA solution (200 mM and pH 7.0 adjusted with 1.0 M NaOH). Then, 10 mL were transferred into a 20-mL SPME vial filled with 3.5 g NaCl. The mixture was homogenised with a vortex shaker for 30 s and then the volatiles were sampled by HS-SPME with a 50/30 μ m CAR/PDMS/DVB fibre (StableFlex/SS) supplied by Supelco (Bellefonte, PA). The incubation and extraction were performed at 60 °C for 10 and 30 min, respectively, under continuous agitation (500 rpm). Desorption was carried out in the injector at 250 °C for 15 min. The incubation, extraction and desorption of volatile compounds were performed automatically by a Combi-Pal autosampler (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland).

The gas chromatography analyses were carried out on a Trace GC Ultra gas chromatograph (Thermo Fisher Scientific, Milan, Italy) coupled to a single quadrupole mass spectrometer (ISQ Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). The injections were performed in splitless mode for 1 min and volatile compounds were chromatographed on a DB-5 ms column (60 m \times 0.25 mm with 0.25 μ m film thickness) provided by J&W Scientific (Folsom, CA) with helium as the carrier gas at a constant flow of 1.0 mL/min. The oven temperature conditions were 45 °C for 1 min, increasing at 6 °C min⁻¹ to 90 °C, 3 °C min⁻¹ to 210 °C, 6 °C min⁻¹ to 250 °C and then held for 16 min. Electronic ionisation was used (70 eV); ion source and transfer line temperatures were 200 °C and 230 °C, respectively. Detection was performed in scan mode in the range between *m/z* 35 and 300 with a scan speed of 7.0 scan s⁻¹. Chromatograms and spectra were recorded and processed using Xcalibur software (v. 2.2; Thermo Fisher Scientific).

2.5. Identification of volatile organic compounds

Compounds were identified by comparison of their mass spectra and retention times to those of pure standards (Sigma-Aldrich). When standards were not available, the identification was performed comparing the mass spectra with the NIST 05 mass spectral library and confirmed by linear retention indices (LRI) reported in the literature (Supplementary Table 2). The LRIs were calculated by the injection of a liquid mixture of *n*-alkane standards (C7–C40) analysed under the same conditions as the samples.

The peak areas of specific ions were selected and integrated for each volatile compound (Table 1). The accuracy of the analyses was checked. The repeatability was under 10% RSD. To check the reproducibility, a quality control test was carried out by injecting a reference sample consisting of an orange flesh sample (processed under the same conditions) included in the sequence (every 8 injections). The volatile compounds displayed fulfilled the reproducibility criteria (less than 20% RSD; from a total of 30 sequences of analysis).

Table 1
Retention indices, ions monitored and odours for each compound.

	RT ^a	LRI ^b	Selected Ions ^c	Identification ^d	Odours ^e
<i>Aldehydes and ketones</i>					
Pentanal	11.01	700	58 /44/57	LRI, MS	Almond, malt, pungent
(Z)-3-hexenal	14.63	800	69 /83/98	STD, LRI, MS	Green
Hexanal	14.74	802	56 /44/57	STD, LRI, MS	Green
(E)-2-hexenal	17.08	854	98 /83/69	STD, LRI, MS	Green
Benzaldehyde	22.92	976	105 /77	STD, LRI, MS	Almond
6-Methyl-5-hepten-2-one	23.26	983	126 /108/111	LRI, MS	Mushroom
Octanal	24.31	1004	110 /56/84	STD, LRI, MS	Citrus-like, fruity
<i>Alcohols</i>					
1-Hexanol	17.54	863	69 /56/84	STD, LRI, MS	Green
1-Octen-3-ol	23.03	978	57 /72/85	LRI, MS	Mushroom
1-Octanol	27.58	1068	56 /84/70	STD, LRI, MS	Citrus-like, herbal
1-Decanol	37.74	1271	70 /83/97	LRI, MS	Fresh, floral
<i>Terpenoids</i>					
α -Pinene	21.51	948	93 /105/121	LRI, MS	Green, piney, fruity
β -Pinene	23.38	986	93 /91/121	LRI, MS	Green, piney, fruity
β -Myrcene	23.61	990	93 /69/121	STD, LRI, MS	Green, metallic, geranium
α -Phellandrene	25.02	1018	93 /91/136	STD, LRI, MS	Fruity, minty
Limonene	26.30	1043	68 /93/136	STD, LRI, MS	Citrusy, lemon, fruity
Eucalyptol	26.65	1050	154 /81/108	STD, LRI, MS	Minty, eucalyptus
γ -Terpinene	27.58	1068	93 /136/121	STD, LRI, MS	Minty, piney, fruity
α -Terpinolene	29.10	1098	121 /93/136	STD, LRI, MS	Fruity, green
Linalool	29.33	1102	71 /93/121	STD, LRI, MS	Floral, fruity
(Z)-linalool oxide (furanoid) [†]	28.28	1080	59 /94/111	STD, LRI, MS	Floral
(E)-limonene oxide [†]	31.79	1151	94 /108	LRI, MS	Citrus-like, green
Terpinen-4-ol	34.12	1198	154 /71/111	LRI, MS	Metallic, green
α -Terpineol	34.82	1212	59 /93/121	STD, LRI, MS	Fruity, lemon, piney, minty
β -Citronellol	35.52	1226	81 /69/82/95	LRI, MS	Citrus, fruity, floral
β -Cyclocitral	36.11	1238	137 /109/123	STD, LRI, MS	Sweet, green, floral
(Z)-carveol	36.46	1245	134 /84/109/119	LRI, MS	Green, rubber, caraway
Geraniol	36.80	1252	69 /68/123	STD, LRI, MS	Floral, citrusy, geranium
Carvone	37.16	1260	150 /82/108	LRI, MS	Spearmint
Neral	37.70	1271	84 /69/94	LRI, MS	Citrus-like
Geranyl acetone	46.03	1453	69 /107/151	STD, LRI, MS	Fresh, floral, fruity
β -Caryophyllene	46.14	1455	133 /93/105	LRI, MS	Musty, green
Valencene	49.18	1501	161 /189/204	LRI, MS	Citrus-like
Nootkatone	59.69	>1700	200 /147/218	MS	Fruity
<i>Esters</i>					
Ethyl acetate	8.56	<700	61 /70/88	MS	Fruity, solvent-like
Ethyl propanoate	11.24	706	102 /57/75	STD, LRI, MS	Fruity, strawberry
Methyl butanoate	11.71	719	74 /71/87	LRI, MS	Fruity
Ethyl isobutanoate	12.99	755	116 /88/71	STD, LRI, MS	Fruity
Ethyl butanoate	14.63	800	88 /71/60	STD, LRI, MS	Fruity
Ethyl 2-methylbutanoate	16.73	846	102 /57/85	STD, LRI, MS	Fruity
Ethyl hexanoate	23.73	993	99 /88/60	STD, LRI, MS	Fruity
Carvyl acetate	40.54	1331	134 /119/152	LRI, MS	Spearmint, green
Citronellyl acetate	41.21	1345	95 /123/138	LRI, MS	Citrus-like
Neryl acetate + geranyl acetate	41.7 + 41.9	1356 + 1361	93 /69/121/136	LRI, MS	Green, citrus-like
<i>Furans</i>					
2-Ethylfuran	11.20	705	81 /96	LRI, MS	Rubbery, pungent, sweet

^a Minutes.

^b LRI: linear retention index on DB5-MS column; linear retention indices found in a comprehensive literature search (Supplementary Table 2).

^c Identification technique, STD: Compound identified by commercial standard, LRI, MS: compound identified by linear retention index and mass spectra comparison.

^d Quantitative ions are marked in bold-type letter.

^e Odorant descriptors found in a comprehensive literature search (Supplementary Table 2).

[†] Semi-quantified in 'Navelina' cultivar.

2.6. Statistical analysis

The overall data were examined for normal distribution using the Shapiro-Wilk test (normality) and Levene's test (homoscedasticity) for all the groups. Univariate statistical analysis was performed using SPSS software (v. 9.0, Microsoft Software). The resulting data were subjected to analysis of means comparisons (Student *t*-test). Multivariate statistical analysis (Partial Least Squares Discriminant Analysis) was performed using PLS toolbox software (v.5.5.1; Eigenvector Research Inc., Wenatchee, WA) under MATLAB (v. 2008b MathWorks Inc., Natick, MA) environment.

3. Results & discussion

'Navelina' and 'Salustiana' cultivars did not show differences in the quality parameters between managements (Supplementary Table 1). Table 1 lists the volatile organic compounds (VOCs) detected in both cultivars by HS-SPME-GC-MS. A total of 45 volatile organic compounds were identified in the 'Navelina' cultivar, and 44 in the 'Salustiana'. The VOCs were classified into different chemical groups according to their structure: 6 aldehydes, 1 ketone, 4 alcohols, 23 terpenoids (21 in 'Salustiana' cultivar), 10 esters (11 in 'Salustiana' cultivar) and 1 furan. Statistical analysis was applied to the dataset. The results from the two cultivation

systems are shown in Table 2 ('Navelina' cultivar) and Table 3 ('Salustiana' cultivar).

3.1. Aldehydes and ketones

The two cultivation systems showed content differences in several compounds. 'Navelina' showed significantly higher content of pentanal for the samples cultivated under the organic system (50%). The 'Salustiana' cultivar did not follow this trend. In contrast, for the 'Salustiana' samples an effect of the cultivation system was observed in two other VOCs of this group, (Z)-3-hexenal and benzaldehyde, with higher content in the conventional samples.

These volatiles have been previously reported as VOCs in orange juice although no odour activity was reported in citrus juices

(Perez-Cacho & Rouseff, 2008). The amount of pentanal was found to increase in other fruit at the end of the ripening period (Obenland, Collin, Sievert, Negm, & Arpaia, 2012).

3.2. Alcohols

No significant differences were found in the alcohol contents between organic and conventional samples, or in the individual VOCs within the group (Table 2 and 3). Among the alcohols, 1-octanol was present in the highest amounts in our samples. It showed higher content in the conventional 'Navelina' oranges, without reaching statistical significance. Odour activity for this group has been widely demonstrated in the literature (1-hexanol, (Arena, Guarrera, Campisi, & Asmundo, 2006); 1-octanol (Högnadóttir & Rouseff, 2003)).

Table 2
Volatile organic compounds concentration in each crop management for 'Navelina' cultivar.

	Organic			Conventional		p-value	VIP
	Mean	Std Error		Mean	Std Error		
Σ Aldehydes and ketones	215	± 18.5		170	± 15.3	ns	
Pentanal	0.84	± 0.13	a	0.45	± 0.10	b	*
(Z)-3-hexenal	4.63	± 0.45		5.60	± 0.32		ns
Hexanal	114	± 13.6		86.1	± 13.7		ns
(E)-2-hexenal	41.3	± 4.39		32.7	± 3.99		ns
Benzaldehyde	1.04	± 0.07		1.34	± 0.12		ns
6-Methyl-5-hepten-2-one	33.5	± 4.61		23.9	± 4.85		ns
Octanal	20.0	± 4.91		20.3	± 5.35		ns
Σ Alcohols	90.7	± 12.8		175	± 49.4		ns
1-Hexanol	4.91	± 1.04		4.05	± 1.08		ns
1-Octen-3-ol	2.21	± 0.40		1.38	± 0.12		ns
1-Octanol	70.1	± 11.0		151	± 44.7		ns
1-Decanol	13.5	± 2.47		18.6	± 5.22		ns
Σ Terpenoids	7640	± 424		6780	± 637		ns
α-Pinene	64.7	± 9.26		49.9	± 8.59		ns
β-Pinene	27.2	± 2.94		34.8	± 6.53		ns
β-Myrcene	1340	± 316		693	± 80.9		ns
α-Phellandrene	10.60	± 1.24		7.63	± 1.09		ns
Limonene	4980	± 159		4310	± 393		ns
Eucalyptol	0.38	± 0.05	b	0.66	± 0.12	a	*
γ-Terpinene	41.2	± 4.34		39.5	± 5.11		ns
α-Terpinolene	62.6	± 7.71		54.4	± 5.99		ns
Linalool	116	± 20.9		141	± 32.8		ns
(Z)-linalool oxide (furanoid)	0.10	± 0.01	b	0.18	± 0.03	a	*
(E)-limonene oxide	34.7	± 6.53		44.7	± 13.7		ns
Terpinen-4-ol	7.08	± 1.13		6.89	± 1.08		ns
α-Terpineol	26.6	± 3.77		35.6	± 5.32		ns
β-Citronellol	24.7	± 4.69		21.2	± 3.90		ns
β-Cyclocitral	10.3	± 1.13	a	5.35	± 0.93	b	**
(Z)-carveol	19.6	± 3.48		22.8	± 6.16		ns
Geraniol	31.2	± 5.84		41.2	± 10.2		ns
Carvone	23.6	± 4.93		16.6	± 6.43		ns
Neral	18.0	± 4.45		17.8	± 3.83		ns
Geranyl acetone	56.1	± 8.18	a	27.2	± 2.84	b	**
β-Caryophyllene	25.6	± 5.13		25.1	± 3.61		ns
Valencene	698	± 143		1170	± 169		ns
Nootkatone	15.0	± 2.91		14.2	± 1.82		ns
Σ Esters	102	± 18.9	b	181	± 25.9	a	***
Ethyl acetate	0.48	± 0.09	b	6.63	± 0.92	a	***
Ethyl propanoate	0.02	± 0.00	b	0.22	± 0.02	a	***
Methyl butanoate	0.63	± 0.24	b	4.29	± 1.09	a	**
Ethyl isobutanoate	0.01	± 0.00	b	0.04	± 0.00	a	***
Ethyl butanoate	9.32	± 2.58	b	123	± 25.3	a	**
Ethyl 2-methylbutanoate	0.03	± 0.01	b	0.75	± 0.10	a	***
Ethyl hexanoate	1.84	± 0.39		10.9	± 4.40		ns
Carvyl acetate	2.99	± 0.67		3.00	± 0.76		ns
Neryl acetate + geranyl acetate	87.1	± 18.4	a	32.2	± 5.97	b	**
Σ Furans	2.50	± 0.35	a	1.45	± 0.27	b	*
2-Ethylfuran	2.50	± 0.35	a	1.45	± 0.27	b	*
Total	8050	± 4740		7300	± 728		ns

Units are ion peak areas divided by 10⁶. Different letters in the same row means significant differences between crop management systems: ns = not significant, * = p < 0.05, ** = p < 0.01, *** = p < 0.001. Bold type highlights the sum of the volatile compounds.

Table 3
Volatile organic compounds concentration in each crop management for 'Salustiana' cultivar.

	Organic			Conventional			P-value	VIP
	Mean	Std error		Mean	Std error			
Σ Aldehydes and ketones	371	±	25.4	366	±	43.3	ns	
Pentanal	0.61	±	0.05	0.75	±	0.09	ns	0.91
(Z)-3-hexenal	9.65	±	0.63	13.3	±	1.36	a	*
Hexanal	221	±	18.3	230	±	30.0	ns	0.19
(E)-2-hexenal	93.8	±	6.40	87.6	±	11.1	ns	0.34
Benzaldehyde	1.33	±	0.07	2.00	±	0.15	a	***
6-Methyl-5-hepten-2-one	9.44	±	0.91	9.95	±	1.29	ns	0.09
Octanal	34.7	±	10.0	22.0	±	5.40	ns	0.38
Σ Alcohols	68.7	±	7.77	74.7	±	7.47	ns	
1-Hexanol	4.55	±	0.73	5.99	±	0.63	ns	0.11
1-Octen-3-ol	2.25	±	0.35	2.21	±	0.24	ns	0.33
1-Octanol	49.0	±	5.78	56.1	±	5.21	ns	0.84
1-Decanol	13.0	±	2.74	10.3	±	3.76	ns	0.34
Σ Terpenoids	8190	±	422	7670	±	434	ns	
α-Pinene	44.4	±	5.26	27.5	±	3.22	b	*
β-Pinene	35.6	±	4.43	24.6	±	3.27	ns	0.57
β-Myrcene	1270	±	110	818	±	86.4	b	**
α-Phellandrene	14.1	±	1.77	9.33	±	1.03	ns	1.02
Limonene	5210	±	303	4990	±	217	ns	0.67
Eucalyptol	0.66	±	0.13	1.05	±	0.36	ns	1.09
γ-Terpinene	27.2	±	4.04	27.1	±	3.59	ns	0.30
α-Terpinolene	99.7	±	11.5	106	±	21.0	ns	0.41
Linalool	166	±	30.1	165	±	25.2	ns	0.36
Terpinen-4-ol	10.6	±	2.52	13.0	±	2.83	ns	0.59
α-Terpineol	57.0	±	7.63	67.2	±	15.1	ns	0.69
β-Citronellol	15.8	±	2.33	13.1	±	2.30	ns	0.39
β-Cyclocitral	4.74	±	0.41	4.99	±	0.77	ns	0.17
(Z)-carveol	7.38	±	0.72	5.82	±	1.29	ns	0.39
Geraniol	22.2	±	2.76	22.2	±	3.28	ns	0.37
Carvone	14.3	±	2.09	18.6	±	6.09	ns	1.07
Neral	38.4	±	9.26	29.3	±	13.8	ns	0.31
Geranyl acetone	54.4	±	4.27	44.8	±	5.19	ns	0.89
β-Caryophyllene	34.0	±	3.72	33.6	±	4.79	ns	0.01
Valencene	1020	±	137	1200	±	239	ns	0.11
Nootkatone	55.3	±	5.32	49.5	±	7.90	ns	0.21
Σ Esters	85.5	±	5.44	262	±	42.6	a	***
Ethyl acetate	0.44	±	0.08	3.88	±	1.21	a	*
Ethyl propanoate	0.03	±	0.01	0.24	±	0.04	a	***
Methyl butanoate	0.79	±	0.21	3.40	±	0.61	a	**
Ethyl isobutanoate	0.01	±	0.00	0.01	±	0.00	a	*
Ethyl butanoate	23.4	±	3.98	202	±	39.1	a	**
Ethyl 2-methylbutanoate	0.03	±	0.01	0.76	±	0.21	a	**
Ethyl hexanoate	8.46	±	0.16	29.5	±	7.44	a	*
Carvyl acetate	2.27	±	0.35	2.24	±	0.24	ns	0.31
Neryl acetate + geranyl acetate	44.4	±	4.82	18.2	±	2.64	b	***
Citronellyl acetate	5.79	±	0.94	1.46	±	0.35	b	***
Σ Furans	2.89	±	0.23	2.86	±	0.35	ns	
2-Ethylfuran	2.89	±	0.23	2.86	±	0.35	ns	0.39
Σ Total	8720	±	433	8370	±	437	ns	

Units are ion peak areas divided by 10^6 . Different letters in the same row means significant differences between crop management systems: ns = not significant, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$. Bold type highlights the sum of the volatile compounds.

3.3. Terpenoids

Terpenoids play an important role in the odour activity of oranges (Plotto, Margaría, Goodner, Goodrich, & Baldwin, 2004) and they have been described as the main volatile group in herbivore-induced plant volatiles (Mithöfer & Boland, 2012). Limonene was the major VOC found in 'Navelina' and 'Salustiana' cultivars, followed by β-myrcene. Limonene has been reported to produce a 'lifting effect' for other volatiles, functioning in a similar way to ethanol in wine (Perez-Cacho & Rouseff, 2008). Limonene odour is described as citrus-like, with a lemon note, while βmyrcene has green, metallic and geranium notes. β-Myrcene has previously been identified in citrus genera (Álvarez et al., 2012) and oranges (Cerdán-Calero, Sendra, & Sentandreu, 2012). Its odour was found to be a negative contributor to the aroma of processed orange juices (Ahmed, Dennison, Dougherty, & Shaw, 1978).

No significant differences were found for the terpenoids group between the organic and conventional samples for both cultivars

but they were found for individual compounds, with different trends between the varieties.

Higher content of geranyl acetone and β-cyclocitral were found in the organic oranges compared to the conventional ones in the 'Navelina' cultivar. These compounds were twice as high in the organic oranges compared with the conventional samples. β-Cyclocitral is a terpenoid, potentially derived from carotenoids. This compound is of particular interest because, even at relatively low concentrations, it has a strong effect on overall orange sensory perception (Mahattanatawee, Rouseff, Valim, & Naim, 2005). In the same cultivar, we found higher content of eucalyptol and linalool oxide in the conventional samples (almost twice those in the organic samples). Linalool oxide is a glycosidically-bound terpenoid that is widely distributed in citrus fruits. It has recently been reported as a characteristic compound for grapefruit species (González-Mas, Rambla, Alamar, Gutiérrez, & Granell, 2011).

Eucalyptol (1,8-cineole) has been reported in numerous fruits (Cuevas et al., 2016; Papini, Mazza, Gatti, & Bavaresco, 2015) as

well as in citrus genera (Miyazaki, Plotto, Goodner, & Gmitter, 2011). It has been identified in orange juices (Cerdán-Calero et al., 2012) and described as having a minty or eucalyptus odour, but the odorant activity in orange juices has not been reported (Perez-Cacho & Rouseff, 2008). Terpenyl oxides have been suggested as indicators of oxidative changes in the flesh of some fruits (Dziadas & Jeleń, 2016).

In the 'Salustiana' cultivar, higher content of the terpenoids α -pinene and β -myrcene were found (50–60%, respectively) in the oranges grown under organic management. α -Pinene (pine-like, resinous scents) is a monoterpene widely known in citrus genera (González-Mas et al., 2011). In a recent paper, a comparative study among different mandarin cultivars highlighted the role of α -pinene as a key compound to differentiate oriental Mandarin cultivars from the Mediterranean ones (Goldenberg, Yaniv, Doron-Faigenboim, Carmi, & Porat, 2016). In conclusion, the cultivation management affected the volatile profile but the impact depended on the variety.

3.4. Esters

Esters are an important category of the aroma profile of many fruits including oranges (Perez-Cacho & Rouseff, 2008). All the esters identified in our study have already been reported in fresh orange juices (Cerdán-Calero et al., 2012). The highest odorant activity values in orange juice have been recorded for ethyl butanoate and non-ester compounds, such as nootkatone, linalool and limonene (Kelebek & Sellı, 2011).

The most important ester in both cultivars was ethyl butanoate followed by methyl butanoate ('Salustiana' cultivar) or ethyl hexanoate ('Navelina' cultivar). Higher content of esters were found in conventional oranges in both cultivars (between two and three times higher). Ethyl butanoate was mainly responsible for those differences with significantly higher values in the oranges from the conventional cultivation. Other ethyl esters (acetate, propanoate, isobutyrate, and 2methylbutanoate) showed significant differences in conventional samples. The content of neryl and geranyl acetates were significantly higher (threefold higher) in the organic oranges in both cultivars (Table 2 and Table 3) but in the organic 'Salustiana' samples there were also significantly higher values of citronellyl acetate. These esters should be related to different ripening stages (Bai et al., 2016) but we did not observe this (Supplementary Table 1).

Numerous pathways for ester biosynthesis have been proposed: β -oxidation, lipoxygenase pathways for straight chain esters (Rowan, Allen, Fielder, & Hunt, 1999); amino acid metabolism for branched esters (Gonda et al., 2010; Pérez, Ollas, Luaces, & Sanz, 2002); and the 'citramalic acid metabolism' (Sugimoto, Jones, & Beaudry, 2011), a recently reported pathway. Monoterpenes are synthesised from geranyl diphosphate (Davidovich-Rikanati et al., 2007), an intermediate in carotenoid biosynthesis (Lewinsohn & Gijzen, 2009). In this sense, neryl acetate, geranyl acetate and citronellyl acetate have been correlated with the plastidial terpenoid pathway (Davidovich-Rikanati et al., 2007) and also with geranyl diphosphate.

3.5. Furan

Furans are described as having a pleasant fruity flavour (Perez-Cacho & Rouseff, 2008). 2-Ethylfuran content was affected by cultivation management in the 'Navelina' cultivar but not in 'Salustiana' (Table 2 and 3). Regarding odour contribution, 2-ethylfuran has not been previously reported as an odorant in freshly-squeezed orange juices.

3.6. Final considerations in univariate analysis

It has been well reported that an increase in one or various volatile compounds may not be reflected in consumer acceptance or recognition (Francis et al., 1999). Thus, it was necessary to perform a multivariate analysis to develop a model, so that in a global view, outside of a simplistic point, we could compare the robust differences between these samples and managements.

3.7. Multivariate analysis

A supervised multivariate technique (PLS-DA) was performed to obtain a discrimination model. PLS-DA is a multivariate technique used to classify different groups of samples. It is based on linking two data matrices, X (explanatory dataset) and Y (explicative dataset). This approach aims to maximise the covariance between both datasets. The main advantage of the PLS-DA approach is its ability to handle highly collinear and noisy data (Gromski et al., 2015) and it has been previously reported in fruit pattern recognition (Berrueta, Alonso-Salces, & Héberger, 2007).

Two PLS-DA models were developed, one for each cultivar. The classes were defined as organic or conventional oranges. The dataset consisted of a 30×45 and 30×44 matrix for each PLS-DA model ('Navelina' and 'Salustiana' cultivars, respectively). The rows represented the samples analyzed and the columns the ion peak area of the volatile metabolites determined by HS-SPME-GC-MS.

It has previously been described that sample classifications with huge differences in the magnitude levels of the observed chemical signal, as is the case with volatiles, should be weighted (Urruty, Giraudel, Lek, Roudeillac, & Montury, 2002), thus improving the recognition and prediction ability of the model. Pre-processing techniques reduce the overweighting of major volatile compounds not only according to content. One of the most popular methods is auto-scaling, transforming and centring the results by removing the mean value of each volatile and then scaling the results by dividing non-constant volatiles by their standard deviation (Berrueta et al., 2007; Van den Berg, Hoefsloot, Westerhuis, Smilde, & van der Werf, 2006). It is widely referred to in the literature as one of the most common data pre-processing techniques used in volatile pattern approaches (Cynkar, Damberg, Smith, & Cozzolino, 2010). Several data pre-processing approaches were performed and evaluated (log transformation, mean centring, Pareto scaling and auto-scaling). 'Auto-scaling' was selected as it has the highest predictive ability in our models.

A re-sampling method, using random subsets with ten data splits (five iterations), was followed to evaluate the predictive ability of our model and the same predictive ability was obtained as a random subset with a higher number of iterations. In our case, two data subsets were randomly obtained, one for calibration (66% of the total samples) and another (33% of the total samples) for external validation.

Three latent variables were used in both cases. The recognition and predictive abilities were 100 % in both varieties (Table 4). The results were considered satisfactory, since a selected number of volatile compounds were able to guarantee distinction between both management systems.

The scores and loadings were plotted in Fig. 1 for both varieties. Three main latent variables (LV) were selected as optimal, using the criterion of lowest prediction error in random-subsets cross validation (RSCV). The optimal model was built with two factors (explaining 46 and 47 % of the total volatile profile variability in 'Navelina' and 'Salustiana' cultivars respectively). This variability accounts for 92% and 91% of the classes matrix (Y). These two latent variables (LV) were related to total discrimination in the organic and conventional samples. Negative loadings in the first LV and positive loadings in the second showed variables related

Table 4
PLS-DA model statistics for Navelina and Salustiana cultivars.

		'Navelina'		'Salustiana'	
		Organic	Conventional	Organic	Conventional
Model training	Sensitivity (%)	100	100	100	100
	Specificity (%)	100	100	100	100
	r^2	0.87	0.87	0.86	0.86
	Class error	0	0	0	0
Model cross-validation	Sensitivity (%)	100	92.3	88.9	93.3
	Specificity (%)	97.9	100	93.3	88.9
	r^2	0.73	0.73	0.57	0.57
	Class error	0.01	0.01	0.09	0.09
External prediction	Sensitivity (%)	100	100	100	100
	Specificity (%)	100	100	100	100
	r^2	0.82	0.82	0.91	0.91
	Class error	0	0	0	0

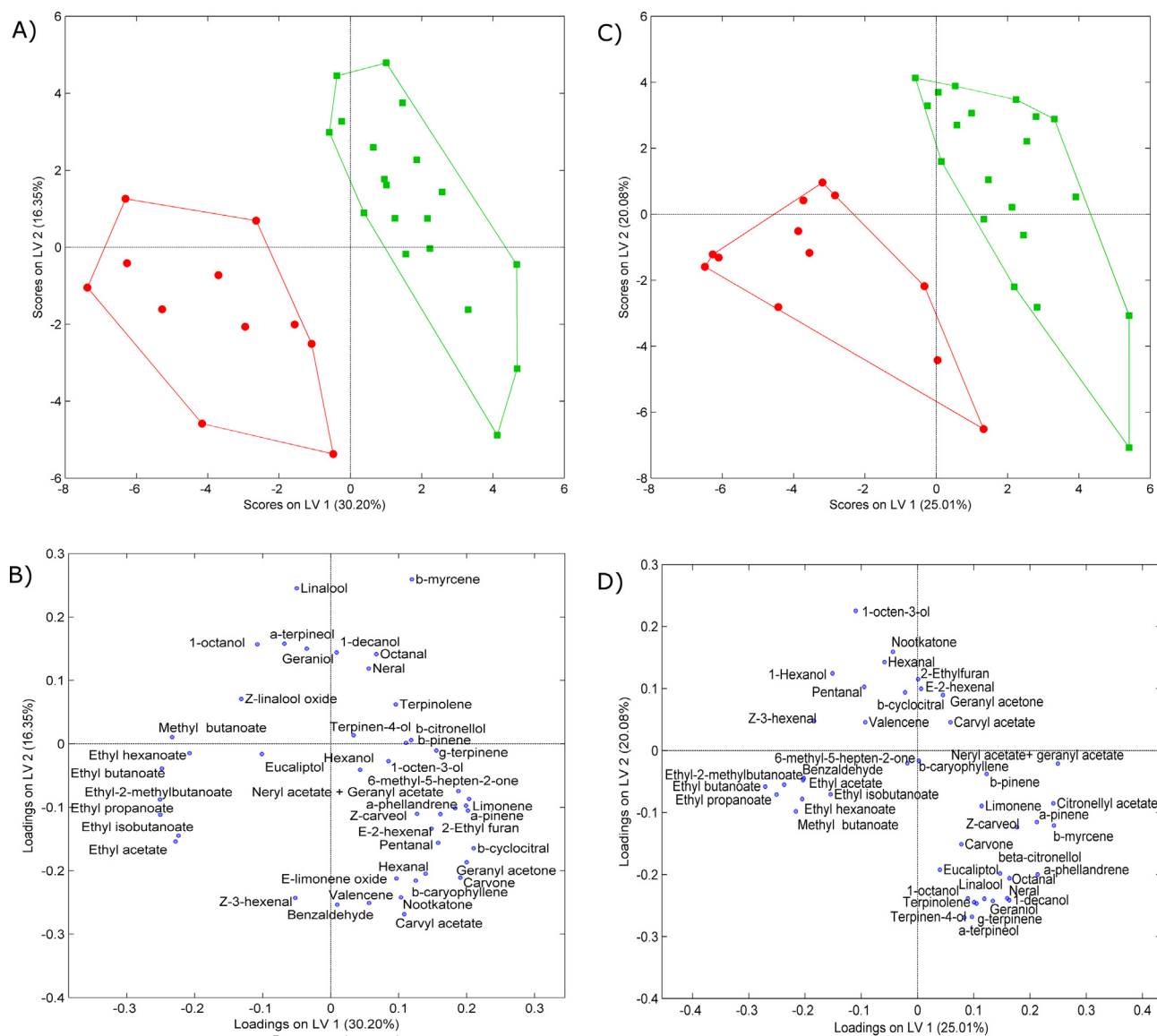


Fig. 1. A) PLS-DA scores plot of the volatile compounds for 'Navelina' cultivar. Red dots for conventional samples and green squares for organic ones. B) PLS-DA loadings plot of the volatile compounds for 'Navelina' cultivar. Red dots for conventional samples and green squares for organic ones. C) PLS-DA scores plot of the volatile compounds for 'Salustiana' cultivar. Red dots for conventional samples and green squares for organic ones. D) PLS-DA loadings plot of the volatile compounds for 'Salustiana' cultivar. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

to organic samples. In this sense, esters, some aldehydes and terpenoids were the main factors involved in the discrimination.

Trends found in both cultivars allowed us to identify correctly candidates to discriminate between both cultivars. Note that some monoterpenes, such as limonene, α -phellandrene, α -pinene, β -myrcene, and some volatile compounds derived from geranyl diphosphate (GDP), such as neryl acetate and geranyl acetate, showed high values in the first or second latent variables. These compounds were found in higher levels in the organic samples. Meanwhile, there were higher values of esters in the conventional samples. No exceptions were found for these compounds in both cultivars.

3.8. Potential volatile markers

The identification of potential markers was based on the application of a previously reported dual criterion (Cuevas et al., 2016), based on the univariate and multivariate analysis performed for each cultivar (Table 2 and 3). Briefly, the potential volatile markers were identified based on the variable importance in the projection values (VIP) higher than 1.0, and on the category from the comparison of means (category “a” for the highest volatile content, Fisher’s least significance differences, significance level equal to 0.01) (Wang et al., 2014). According to this, ethyl acetate, ethyl propanoate, methyl butanoate, ethyl isobutyrate, ethyl butanoate, and ethyl 2-methylbutanoate were the main compounds for discriminating between the cultivation systems. Note that clear differences in β -myrcene and α -pinene were found between organic and conventional managements for the ‘Salustiana’ cultivar in the univariate analysis (and also higher VIP values). Meanwhile, in the ‘Navelina’ cultivar these compounds did not show differences in the univariate analysis, but the VIP values were higher than 1.0. Ester compounds have been reported to be key compounds in conventional oranges. We should remark that the study performed was based on two widely known cultivars. Further studies should be carried out with a higher number of cultivars to correlate the same behaviour in different management systems.

4. Conclusions

Ester compounds showed higher content in oranges obtained under conventional management guidelines and this could contribute to a greater fruity aroma component for conventional oranges. Some compounds related with the geranyl-diphosphate pathway (neryl acetate and geranyl acetate) and some monoterpenes showed higher content in orange samples from organic management, differences which cannot be attributed to different ripening stages of the samples, as is often the case.

This is the first time a comparative study dealing with crop management and the aroma profile in orange flesh has been performed. Furthermore, potential volatile markers in organic and conventional oranges have been reported for the first time. Further studies focused on controlled factors (soil managements, irrigation technique, fertilization, etc.) are necessary to understand and identify the agronomic causes of differences between samples.

Acknowledgments

This work was supported in part by the ‘Palma-ecológica’ association, farmers and enterprises. This work was financed by the Andalusian Institute of Agricultural and Fisheries Research and Training (IFAPA) and the European Commission funds (European Rural Development Funds ERDF) through the project ‘Caracterización organoléptica y funcional de productos ecológicos.

Utilización de técnicas isotópicas para la diferenciación entre producto ecológico y convencional’ (PP.AVA.AVA201301.7).

Francisco Julián Cuevas was granted by a research contract funded by the Andalusian Institute of Agricultural and Fisheries Research and Training (IFAPA) and the European Social Fund (ESF).

Maria José Ruiz Moreno was granted a postdoctoral research contract funded by the Andalusian Institute of Agricultural and Fisheries Research and Training (IFAPA) and the European Social Fund (ESF).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.156>.

References

- Ahmed, E. M., Dennison, R. A., Dougherty, R. H., & Shaw, P. E. (1978). Flavor and odor thresholds in water of selected orange juice components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(1), 187–191.
- Álvarez, R., Carvalho, C. P., Sierra, J., Lara, O., Cardona, D., & Londoño-Londoño, J. (2012). Citrus juice extraction systems: Effect on chemical composition and antioxidant activity of clementine juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(3), 774–781.
- Arena, E., Guarrera, N., Campisi, S., & Asmundo, C. N. (2006). Comparison of odour active compounds detected by gas-chromatography–olfactometry between hand-squeezed juices from different orange varieties. *Food Chemistry*, 98(1), 59–63.
- Bai, J., Baldwin, E. A., McCollum, G., Plotto, A., Manthey, J. A., Widmer, W. W., ... Cameron, R. (2016). Changes in volatile and non-volatile flavor chemicals of “Valencia” orange juice over the harvest seasons. *Foods*, 5(1), 4.
- Berrueta, L. A., Alonso-Salces, R. M., & Héberger, K. (2007). Supervised pattern recognition in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 1158(1), 196–214.
- Cerdán-Calero, M., Sendra, J. M., & Sentandreu, E. (2012). Gas chromatography coupled to mass spectrometry analysis of volatiles, sugars, organic acids and aminoacids in Valencia Late orange juice and reliability of the Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System for their automatic identification and quantification. *Journal of Chromatography A*, 1241, 84–95.
- Cuevas, F., Moreno-Rojas, J., Arroyo, F., Daza, A., & Ruiz-Moreno, M. (2016). Effect of management (organic vs conventional) on volatile profiles of six plum cultivars (*Prunus salicina* Lindl.). A chemometric approach for varietal classification and determination of potential markers. *Food Chemistry*, 199, 479–484.
- Cynkar, W., Damberg, R., Smith, P., & Cozzolino, D. (2010). Classification of Tempranillo wines according to geographic origin: Combination of mass spectrometry based electronic nose and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, 660(1), 227–231.
- Davidovich-Rikanati, R., Sitrit, Y., Tadmor, Y., Iijima, Y., Bilenko, N., Bar, E., ... Simon, J. E. (2007). Enrichment of tomato flavor by diversion of the early plastidial terpenoid pathway. *Nature Biotechnology*, 25(8), 899–902.
- Dharmawan, J., Kasapis, S., Sriramula, P., Lear, M. J., & Curran, P. (2008). Evaluation of aroma-active compounds in Pontianak orange peel oil (*Citrus nobilis* Lour. Var. *microcarpa* Hassk.) by gas chromatography–olfactometry, aroma reconstitution, and omission test. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(1), 239–244.
- Dziadas, M., & Jeleń, H. H. (2016). Comparison of enzymatic and acid hydrolysis of bound flavor compounds in model system and grapes. *Food Chemistry*, 190, 412–418.
- European Commission. (2014). EU Proposal for a regulation of the European parliament and of the Council on organic production and labelling of organic products. URL: <http://ec.europa.eu/agriculture/organic/documents/eu-policy-policy-development/report-and-annexes/proposal_en.pdf> Accessed 05.08.16.
- Francis, S., Rolls, E. T., Bowtell, R., McGlone, F., O’Doherty, J., Browning, A., ... Smith, E. (1999). The representation of pleasant touch in the brain and its relationship with taste and olfactory areas. *NeuroReport*, 10(3), 453–459.
- Goldenberg, L., Yaniv, Y., Doron-Faigenboim, A., Carmi, N., & Porat, R. (2016). Diversity among mandarin varieties and natural sub-groups in aroma volatiles compositions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(1), 57–65.
- Gonda, I., Bar, E., Portnoy, V., Lev, S., Burger, J., Schaffer, A. A., Tadmor, Y. a., Gepstein, S., Giovannoni, J. J., & Katzir, N. (2010). Branched-chain and aromatic amino acid catabolism into aroma volatiles in *Cucumis melo* L. fruit. *Journal of Experimental Botany*, 61(4), 1111–1123.
- González-Mas, M. C., Rambla, J. L., Alamar, M. C., Gutiérrez, A., & Granell, A. (2011). Comparative analysis of the volatile fraction of fruit juice from different Citrus species. *PLoS One*, 6(7), e22016.
- Gromski, P. S., Muhamadali, H., Ellis, D. I., Xu, Y., Correa, E., Turner, M. L., & Goodacre, R. (2015). A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis—a marriage of convenience or a shotgun wedding. *Analytica Chimica Acta*, 879, 10–23.

- Högnadóttir, Á., & Rouseff, R. L. (2003). Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography–olfactometry and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 998(1), 201–211.
- Kelebek, H., & Sellı, S. (2011). Determination of volatile, phenolic, organic acid and sugar components in a Turkish cv. Dortyol (*Citrus sinensis* L. Osbeck) orange juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(10), 1855–1862.
- Laska, M., & Hudson, R. (1993). Discriminating parts from the whole: Determinants of odor mixture perception in squirrel monkeys, *Saimiri sciureus*. *Journal of Comparative Physiology A*, 173(2), 249–256.
- Lewinsohn, E., & Gijzen, M. (2009). Phytochemical diversity: The sounds of silent metabolism. *Plant Science*, 176(2), 161–169.
- MAGRAMA. (2013). Statistics Organic Production. <http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/la-agricultura-ecologica/Estadisticas_AE_2013_tcm7-351187.pdf> Accessed 05.08.16.
- Mahattanatawee, K., Rouseff, R., Valim, M. F., & Naim, M. (2005). Identification and aroma impact of norisoprenoids in orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(2), 393–397.
- Mithöfer, A., & Boland, W. (2012). Plant defense against herbivores: Chemical Aspects. *Annual Review of Plant Biology*, 63, 431–450.
- Miyazaki, T., Plotto, A., Goodner, K., & Gmitter, F. G. (2011). Distribution of aroma volatile compounds in tangerine hybrids and proposed inheritance. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(3), 449–460.
- Obenland, D., Collin, S., Sievert, J., Negm, F., & Arpaia, M. L. (2012). Influence of maturity and ripening on aroma volatiles and flavor in 'Hass' avocado. *Postharvest Biology and Technology*, 71, 41–50.
- Papini, P. C., Mazza, G., Gatti, M., & Bavaresco, L. (2015). Anthocyanin and aroma profiling of the Albarossa grapevine crossbreed (*Vitis vinifera* L.) and its parent varieties 'Barbera' and 'Nebbiolo di Dronero'. *VITIS-Journal of Grapevine Research*, 49(3), 121.
- Pérez, A. G., Ollas, R., Luaces, P., & Sanz, C. (2002). Biosynthesis of strawberry aroma compounds through amino acid metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(14), 4037–4042.
- Perez-Cacho, P. R., & Rouseff, R. (2008). Processing and storage effects on orange juice aroma: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(21), 9785–9796.
- Plotto, A., Margaría, C. A., Goodner, K. L., Goodrich, R., & Baldwin, E. A. (2004). Odour and flavour thresholds for key aroma components in an orange juice matrix: Terpenes and Aldehydes. *Flavour and Fragrance Journal*, 19(6), 491–498.
- Rowan, D. D., Allen, J. M., Fielder, S., & Hunt, M. B. (1999). Biosynthesis of straight-chain ester volatiles in Red Delicious and Granny Smith apples using deuterium-labeled precursors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(7), 2553–2562.
- Sahota, A. (2010). The global market for organic food & drink1. *The world of organic agriculture: statistics and emerging trends*.
- Souza-Silva, É. A., Gionfriddo, E., & Pawliszyn, J. (2015). A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices II. Food analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 71, 236–248.
- Sugimoto, N., Jones, A. D., & Beaudry, R. (2011). Changes in free amino acid content in 'Jonagold' apple fruit as related to branched-chain ester production, ripening, and senescence. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 136(6), 429–440.
- Urruty, L., Giraudel, J.-L., Lek, S., Roudeillac, P., & Montury, M. (2002). Assessment of strawberry aroma through SPME/GC and ANN methods. Classification and discrimination of varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11), 3129–3136.
- Vallverdú-Queralt, A., & Lamuela-Raventós, R. M. (2015). Foodomics: A new tool to differentiate between organic and conventional foods. *Electrophoresis*.
- Van den Berg, R. A., Hoefsloot, H. C., Westerhuis, J. A., Smilde, A. K., & van der Werf, M. J. (2006). Centering, scaling, and transformations: Improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics*, 7(1), 1.
- Wang, C., Dong, R., Wang, X., Lian, A., Chi, C., Ke, C., Guo, L., Liu, S., Zhao, W., & Xu, G. (2014). Exhaled volatile organic compounds as lung cancer biomarkers during one-lung ventilation. *Scientific Reports*, 4.
- Willer, H., & Schaack, D. (2016). Organic farming and market development in Europe. *The World of Organic Agriculture. Statistics and Emerging Trends, 2016*, 199–225.
- WMS Soil maps from Andalucía. (2016). Red de información ambiental de Andalucía. URL: <www.juntadeandalucia.es/medioambiente/site/rediam/vgn-next-templating/v/index.jsp> Accessed 28.11.16.

Table Supplementary 1. Quality parameters of orange samples collected

Independent_Samples T test		N	SSC			Acidity			Ripeness Ratio		
			Mean	±	S.E.	Mean	±	S.E.	Mean	±	S.E.
Navelina	Conventional	11	10.98	±	0.45	0.67	±	0.03	16.58	±	0.75
	Organic	19	11.78	±	0.28	0.74	±	0.06	17.23	±	1.05
	<i>p-value</i>		0.116			0.670			0.416		
Salustiana	Conventional	12	11.43	±	0.26	0.76	±	0.04	15.36	±	0.65
	Organic	18	11.00	±	0.14	0.86	±	0.06	13.72	±	0.87
	<i>p-value</i>		0.116			0.218			0.179		

Solids Soluble Content, SSC (°Brix); Acidity (% citric acid equivalent); Ripeness ratio calculated as coefficient of S.E.=standard error

Supplementary table 2. Linear retention intervals and odorant descriptors according to the literature

	LRI interval¹	Error ²	References for LRI³	References for Odorant descriptors
Aldehydes and ketones				
Pentanal	697-700	0.2	[1, 2, 32]	[32]
Z-3-hexenal	784-805	0.5	[3-6]	[4]
Hexanal	800- 805	0.0	[3, 7, 32]	[18]
E-2-hexenal	844-857	0.3	[1, 3, 6, 8, 9]	[35]
Benzaldehyde	956-996	0.0	[1, 5, 9]	[32]
6-methyl-5-hepten-2-one	974-986	0.2	[1, 8,10]	[36]
Octanal	1001-1005	0.1	[1, 4,10, 32]	[18]
Alcohols				
1-hexanol	854-869	0.1	[3, 10, 32]	[4]
1-octen-3-ol	975-980	0.0	[2, 7, 10, 11]	[4]
1-octanol	1066-1080	0.3	[4, 5, 10, 12, 32]	[4, 32, 39]
1-decanol	1262-1279	0.0	[1, 13, 14]	[14]
Terpenoids				
α -pinene	934- 982	0.7	[1, 4, 8, 14, 15]	[14]
β -pinene	980-1014	0.8	[1, 4, 12, 14]	[18, 14]
β -myrcene	989- 1003	0.4	[12, 14, 16, 17]	[18, 40]
α -phellandrene	1005-1032	0.0	[1, 15, 17]	[4]
Limonene	1031-1059	0.1	[1, 4, 8, 11, 12, 14, 32]	[14, 35]
Eucalyptol	1030-1054	0.5	[1, 4, 8, 16, 18, 32]	[4, 32]
γ -Terpinene	1059-1074	0.1	[1, 4, 12, 18, 22]	[18]
α -Terpinolene	1084-1101	0.4	[1, 4, 12, 18]	[18]
Linalool	1098-1112	0.2	[1, 4, 18, 19, 20, 21, 22]	[4, 18, 14, 35]
Z-Linalool oxide (furanoid) [†]	1072-1080	0.3	[1, 21, 22, 32]	[44]
E-limonene oxide [†]	1139-1147	0.5	[4, 12]	[46]
Terpinen-4-ol	1177-1211	0.2	[1, 4, 12, 14 16]	[35, 49]
α -terpineol	1185-1210	0.8	[1, 4, 8, 12, 32]	[35]
β -citronellol	1228-1233	0.3	[1, 4, 16]	[4, 14]
β -cyclocitral	1218-1224	1.0	[21, 23, 24]	[32]
Z-carveol	1229-1242	0.5	[1, 4, 12, 22]	[18, 35]
Geraniol	1240-1276	0.3	[1, 4, 8, 14, 16, 22]	[14, 42]
Carvone	1243-1244	0.9	[23, 25]	[18, 14]
Neral	1235-1255	1.0	[1, 12, 14, 16]	[4]
Geranyl acetone	1436-1458	0.3	[1, 20, 23, 26, 27]	[41]
β -caryophyllene	1418-1467	0.6	[1, 4, 12]	[4]
Valencene	1490-1491	0.5	[1, 12, 23]	[35]
Nootkatone	1800-1834		[1, 4]	[4]
Esters				
Ethyl acetate	608-628		[8, 16, 19, 28, 29, 33]	[33]
Ethyl propanoate	709-715	0.6	[1, 2, 8, 16, 23]	[34]
Methyl butanoate	723-724	0.4	[1, 8, 16]	[34]
Ethyl isobutanoate	757-762	0.4	[5, 16]	[34]
Ethyl butanoate	800-803	0.1	[1, 4, 8, 16, 30]	[35, 34, 4]
Ethyl 2-methylbutanoate	846-857	0.5	[5, 6, 16]	[34]
Ethyl hexanoate	996-1001	0.4	[1, 2, 7, 8, 16, 19, 29]	[18, 34, 33]
Carvyl acetate	1337-1338	0.3	[1, 23, 31]	[47, 48]
Citronellyl acetate	1354-1357	0.6	[1, 12]	[45]
Neryl acetate	1350-1376	0.4	[1, 4, 14, 18]	[14]
Geranyl acetate	1370-1393	1.1	[1, 14, 18, 23]	[14]
Furans				
2-Ethylfuran	700-728	0.9	[7, 8, 20]	[37, 38]

¹ Kovat's indexes interval found in literature. ² Expressed as percentage between the mean value given by the literature and our linear retention index. ³ Linear retention indexes obtained using an equivalent stationary phase.

1. Adams, P. R. (1995). Identification of essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Allured Publishing: CarolStream, IL.
2. Qian, M., & Reineccius, G. (2003). Potent aroma compounds in Parmigiano Reggiano cheese studied using a dynamic headspace (purge-trap) method. *Flavour and Fragrance Journal*, 18(3), 252–259.
3. Ruther, J. (2000). Retention index database for identification of general green leaf volatiles in plants by coupled capillary gas chromatography– mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 890(2), 313–319.
4. Högnadóttir, Á., & Rouseff, R. L. (2003). Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography–olfactometry and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 998(1), 201–211.
5. Valim, M. F., Rouseff, R. L., & Lin, J. (2003). Gas chromatographic-olfactometric characterization of aroma compounds in two types of cashew apple nectar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(4), 1010–1015.
6. Carrapiso, A. I., Jurado, Á., Timón, M. L., & García, C. (2002). Odor-active compounds of Iberian hams with different aroma characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6453–6458.
7. Engel, E., Baty, C., le Corre, D., Souchon, I., & Martin, N. (2002). Flavor-active compounds potentially implicated in cooked cauliflower acceptance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6459–6467.
8. Jordan, M. J., Margaria, C. A., Shaw, P. E., & Goodner, K. L. (2002). Aroma active components in aqueous kiwi fruit essence and kiwi fruit puree by GC-MS and multidimensional GC/GC-O. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(19), 5386–5390.
9. Nóbrega, I. C. C., Ataíde, C. S., Moura, O. M., Livera, A. V., & Menezes, P. H. (2007). Volatile constituents of cooked bullfrog (*Rana catesbeiana*) legs. *Food Chemistry*, 102(1), 186–191.
10. Timón, M. L., Carrapiso, A. I., Jurado, Á., & van de Lagemaat, J. (2004). A study of the aroma of fried bacon and fried pork loin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(8), 825–831.
11. Ramírez-Rodrigues, M. M., Balaban, M. O., Marshall, M. R., & Rouseff, R. L. (2011). Hot and cold water infusion aroma profiles of Hibiscus sabdariffa: fresh compared with dried. *Journal of Food Science*, 76(2), C212–C217.
12. Choi, H.-S. (2003). Character impact odorants of Citrus Hallabong [(*C. unshiu* Marcov× *C. sinensis* Osbeck)× *C. reticulata* Blanco] cold-pressed peel oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(9), 2687–2692.
13. Madruga, M. S., & Mottram, D. S. (1995). The effect of pH on the formation of maillard-derived aroma volatiles using a cooked meat system. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 68(3), 305–310.
14. Dharmawan, J., Kasapis, S., Sriramula, P., Lear, M. J., & Curran, P. (2008). Evaluation of aroma-active compounds in Pontianak orange peel oil (*Citrus nobilis* Lour. Var. *microcarpa* Hassk.) by gas chromatography– olfactometry, aroma reconstitution, and omission test. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(1), 239–244.
15. Özel, M. Z., Göğüs, F., & Lewis, A. C. (2008). Composition of Eucalyptus camaldulensis volatiles using direct thermal desorption coupled with comprehensive two-dimensional gas chromatography—time-of-flight-mass spectrometry. *Journal of Chromatographic Science*, 46(2), 157–161.
16. Rychlik, M., Schieberle, P., & Grosch, W. (1998). Compilation of odor thresholds, odor qualities and retention indices of key food odorants. BOOK, Dt. Forschungsanst. für Lebensmittelchemie.
17. Giamakis, A., Kretsi, O., Chinou, I., & Spyropoulos, C. G. (2001). Eucalyptus camaldulensis: volatiles from immature flowers and high production of 1, 8-cineole and β -pinene by in vitro cultures. *Phytochemistry*, 58(2), 351–355.
18. Miyazaki, T., Plotto, A., Baldwin, E. A., Reyes-De-Corcuera, J., & Gmitter Jr, F. G. (2012). Aroma characterization of tangerine hybrids by gas chromatography–olfactometry and sensory evaluation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(4), 727–735.
19. El-Sayed, A. M., Heppelthwaite, V. J., Manning, L. M., Gibb, A. R., & Suckling, D. M. (2005). Volatile constituents of fermented sugar baits and their attraction to lepidopteran species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(4), 953–958.
20. Plaza, M. L., Marshall, M. R., & Rouseff, R. L. (2015). Volatile composition and aroma activity of guava puree before and after thermal and dense phase carbon dioxide treatments. *Journal of Food Science*, 80(2), C218–C227.
21. Leffingwell, J. C., & Alford, E. D. (2005). Volatile constituents of perique tobacco. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 4(2), 899–915.
22. Flamini, G., Cioni, P. L., Morelli, I., Maccioni, S., & Baldini, R. (2004). Phytochemical typologies in some populations of *Myrtus communis* L. on Caprione Promontory (East Liguria, Italy). *Food Chemistry*, 85(4), 599–604.
23. Pino, J. A., Mesa, J., Muñoz, Y., Martí, M. P., & Marbot, R. (2005). Volatile components from mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 2213–2223.
24. Valette, L., Fernandez, X., Poulain, S., Loiseau, A.-M., Lizzani-Cuvelier, L., Levieil, R., & Restier, L. (2003). Volatile constituents from Romanesco cauliflower. *Food Chemistry*, 80(3), 353–358.
25. Tellez, M. R., Canel, C., Rimando, A. M., & Duke, S. O. (1999). Differential accumulation of isoprenoids in glanded and glandless *Artemisia annua* L. *Phytochemistry*, 52(6), 1035–1040.
26. Apel, M. A., Sobral, M., Schapoval, E. E. S., Henriques, A. T., Menut, C., & Bessiere, J.-M. (2004). Essential oil composition of *Eugenia florida* and *Eugenia mansoi*. *Journal of Essential Oil Research*, 16(4), 321–322.
27. Beaulieu, J. C., & Grimm, C. C. (2001). Identification of volatile compounds in cantaloupe at various developmental stages using solid phase microextraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(3), 1345–1352.
28. Fuhrmann, E., & Grosch, W. (2002). Character impact odorants of the apple cultivars Elstar and Cox Orange. *Food/Nahrung*, 46(3), 187–193.
29. Machiels, D., Van Ruth, S. M., Posthumus, M. A., & Istasse, L. (2003). Gas chromatography-olfactometry analysis of the volatile compounds of two commercial Irish beef meats. *Talanta*, 60(4), 755–764.
30. Zehentbauer, G., & Reineccius, G. A. (2002). Determination of key aroma components of Cheddar cheese using dynamic headspace dilution assay. *Flavour and Fragrance Journal*, 17(4), 300–305.

31. Gallori, S., Flamini, G., Bilia, A. R., Morelli, I., Landini, A., & Vincieri, F. F. (2001). Chemical composition of some traditional herbal drug preparations: Essential oil and aromatic water of costmary (*Balsamita suaveolens* Pers.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(12), 5907–5910.
32. Cuevas, F. J., Moreno-Rojas, J. M., Arroyo, F., Daza, A., & Ruiz-Moreno, M. J. (2016). Effect of management (organic vs conventional) on volatile profiles of six plum cultivars (*Prunus salicina* Lindl.). A chemometric approach for varietal classification and determination of potential markers. *Food Chemistry*, 199, 479–484.
33. Lasekan, O., Khatib, A., Juhari, H., Patiram, P., & Lasekan, S. (2013). Headspace solid-phase microextraction gas chromatography–mass spectrometry determination of volatile compounds in different varieties of African star apple fruit (*Chrysophyllum albidum*). *Food Chemistry*, 141(3), 2089–2097.
34. Antalick, G., Perello, M.-C., & de Revel, G. (2010). Development, validation and application of a specific method for the quantitative determination of wine esters by headspace-solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. *Food Chemistry*, 121(4), 1236–1245.
35. Qiao, Y., Xie, B. J., Zhang, Y., Zhang, Y., Fan, G., Yao, X. L., & Pan, S. Y. (2008). 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*, 13(6), 1333–1344.
36. Mebazaa, R., Mahmoudi, A., Fouchet, M., Dos Santos, M., Kamissoko, F., Nafti, A., et al. (2009). Characterisation of volatile compounds in Tunisian fenugreek seeds. *Food Chemistry*, 115(4), 1326–1336.
37. Giri, A., Osako, K., Okamoto, A., & Ohshima, T. (2010). Olfactometric characterization of aroma active compounds in fermented fish paste in comparison with fish sauce, fermented soy paste and sauce products. *Food Research International*, 43(4), 1027–1040.
38. Kaseleht, K., Leitner, E., & Paalme, T. (2011). Determining aroma-active compounds in Kama flour using SPME-GC/MS and GC–olfactometry. *Flavour and Fragrance Journal*, 26(2), 122–128.
39. Jiang, B., & Zhang, Z. (2010). Volatile compounds of young wines from Cabernet Sauvignon, Cabernet Gernischt and Chardonnay varieties grown in the Loess Plateau Region of China. *Molecules*, 15(12), 9184–9196.
40. Seideneck, R., & Schieberle, P. (2011). Comparison of the key aroma compounds in hand-squeezed and unpasteurised, commercial NFC juices prepared from Brazilian Pera Rio oranges. *European Food Research and Technology*, 232(6), 995–1005.
41. Wang, L.-F., Lee, J.-Y., Chung, J.-O., Baik, J.-H., So, S., & Park, S.-K. (2008). Discrimination of teas with different degrees of fermentation by SPME–GC analysis of the characteristic volatile flavour compounds. *Food Chemistry*, 109(1), 196–206.
42. Jeleń, H. H., Majcher, M., Dziadas, M., Zawirska-Wojtasiak, R., Czaczyk, K., & Wąsowicz, E. (2011). Volatile compounds responsible for aroma of Jutrzenka liqueur wine. *Journal of Chromatography A*, 1218(42), 7566–7573.
43. Verzera, A., Tripodi, G., Dima, G., Condurso, C., Scacco, A., Cincotta, F., et al. (2016). Leaf removal and wine composition of *Vitis vinifera* L. cv. Nero d'Avola: the volatile aroma constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(1), 150–159.
44. Pino, J. A. (2014). Odour-active compounds in papaya fruit cv. Red Maradol. *Food Chemistry*, 146, 120–126.
45. Katarina, F., Katarina, M., Katarina, D., Ivan, S., & Fedor, M. (2014). Influence of yeast strain on aromatic profile of Gewürztraminer wine. *LWT-Food Science and Technology*, 59(1), 256–262.
46. Choi, H. S., & Min, K. C. (2008). Aroma-active compounds of *Elsholtzia splendens* using AEDA and HS–SPME–GC–O dilution analysis. *Flavour and Fragrance Journal*, 23(1), 58–64.
47. Cheong, M. W., Liu, S. Q., Yeo, J., Chionh, H. K., Pramudya, K., Curran, P., & Yu, B. (2011). Identification of aroma-active compounds in Malaysian pomelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) peel by gas chromatography–olfactometry. *Journal of Essential Oil Research*, 23(6), 34–42.
48. Rayne, S., & Forest, K. (2016). Carboxylic acid ester hydrolysis rate constants for food and beverage aroma compounds. *Flavour and Fragrance Journal*.
49. Mahattanatawee, K., Rouseff, R., Valim, M. F., & Naim, M. (2005). Identification and aroma impact of norisoprenoids in orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(2), 393–397.
50. Cosimi, S., Rossi, E., Cioni, P. L., & Canale, A. (2009). Bioactivity and qualitative analysis of some essential oils from Mediterranean plants against stored-product pests: Evaluation of repellency against *Sitophilus zeamais* Motschulsky, *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) and *Tenebrio molitor* (L.). *Journal of Stored Products Research*, 45(2), 125–132.

Publicación 4

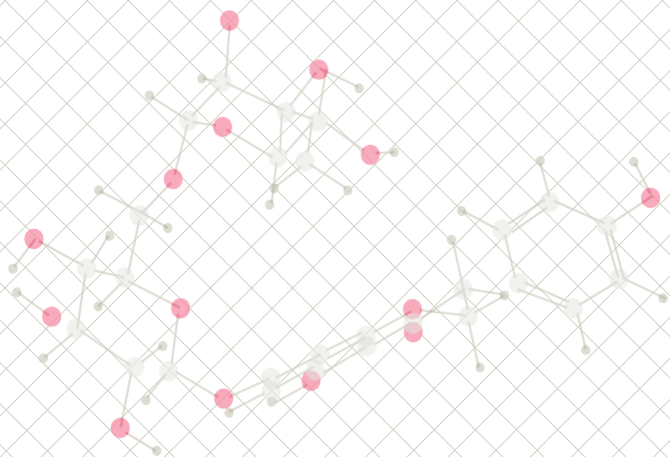
A holistic approach to authenticate organic sweet oranges (*Citrus Sinensis* L. cv Osbeck) using different techniques and data fusion

Francisco J. Cuevas, Gema Pereira-Caro, José M. Muñoz-Redondo, José M. Moreno-Rojas

Enviado: Journal of Agricultural and Food chemistry

Q1: 18/133 (JCR-ISI, Food Science & Technology, 2017)

Impact Factor: 3.412



Capítulo 3

Producto transformado ecológico

Capítulo 3 Transformado de producto ecológico: Zumo de naranja

Los alimentos y bebidas transformadas ecológicas están despertando un interés cada vez mayor en todo el mundo y especialmente en la Unión Europea. El zumo más consumido en Europa es el de naranja y Andalucía cuenta con una materia prima de alta calidad. Según la Asociación Europea de Productores Zumos, los principales destinos exportadores de Andalucía, según la asociación europea de zumos de frutas se centran en países que persiguen zumos que premien más la calidad que la cantidad haciendo una mención especial a los productos ecológicos. Si bien, los zumos ecológicos no cuentan con ningún tipo de técnica analítica que nos permita autentificarlo, las técnicas de fusión de datos tienen la habilidad de manejar complejos problemas de autentificación y calidad, y a pesar de haberse utilizado ampliamente en paneles electrónicos y tener un corto recorrido en la espectrometría de masas, tienen un enorme potencial, enfocado a la autentificación. En nuestro caso nos planteamos si la unión de los datos provenientes de los compuestos volátiles y no volátiles nos permitiese trazar el origen ecológico de los zumos. Así, en esta sección se desarrolla otro objetivo de la presente Tesis Doctoral que es dar un enfoque multivariante que nos permita autentificar los zumos de naranja ecológicos "premium" europeos en comparación con los convencionales. El perfil volátil y no volátil de los zumos de naranja comerciales se analizaron mediante HPLC-HR-MS y HS-SPME-GC-MS, a su vez se utilizaron técnicas avanzadas de análisis de datos. Este enfoque, que combina técnicas de espectrometría de masas, quimiometría y fusión de datos, probablemente proporcionará un nuevo marco de trabajo para la autentificación de alimentos ecológicos o en matrices alimentarias complejas o altamente procesadas.

Publicación 5

Assessment of premium organic orange juices authenticity using HPLC-HR-MS and HS-SPME-GC-MS combining data fusion and chemometrics

Francisco J. Cuevas, Gema Pereira-Caro, José M. Muñoz-Redondo, José M. Moreno-Rojas, María J. Ruiz-Moreno

Food Control, 82, 203-211 (2017)

Q1: 12/133 (JCR-ISI, Food Science & Technology, 2017)

Impact Factor: 3.667

The final published journal article (PJA) is included with the permission of Elsevier editorial



Assessment of premium organic orange juices authenticity using HPLC-HR-MS and HS-SPME-GC-MS combining data fusion and chemometrics

Francisco Julián Cuevas, Gema Pereira-Caro, José Manuel Moreno-Rojas^{**},
José Manuel Muñoz-Redondo, María José Ruiz-Moreno^{*}

Food Science and Health, Andalusian Institute of Agricultural and Fisheries Research and Training (IFAPA), Alameda del Obispo Avda, Menéndez Pidal, s/n, 14071, Córdoba, Andalucía, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 January 2017

Received in revised form

9 May 2017

Accepted 19 June 2017

Available online 21 June 2017

Keywords:

Organic farming

Data fusion

Authentication

Foodomics

Chemometrics

ABSTRACT

This study aims to develop a robust chemometric approach to make it possible to authenticate European premium organic orange juices. The metabolomic fingerprinting and the volatile profile of commercial orange juices were analyzed by HPLC-HR-MS and HS-SPME-GC-MS. These data were used for authentication (classification of orange juices) purposes, using principal component analysis, hierarchical cluster analysis and partial least squares discriminant analysis, which provided acceptable results. Some flavonoids, fatty acids, aldehydes and esters were identified as potential markers involved in the differentiation of organic juices. Data fusion strategies were tested and 'mid-level' data fusion achieved an optimal model for classifying organic or conventional orange juices with a sensitivity and specificity of 100%, thus improving the individual models. This approach, combining mass spectrometry techniques, chemometrics and data fusion, likely provides a new framework for the authentication of organic foodstuffs.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Orange juice is the most consumed fruit juice in the world. It is especially valued for its antioxidants (Tripoli, La Guardia, Giammanco, Di Majo, & Giammanco, 2007), wholesome properties (Erlund, Meririnne, Alftan, & Aro, 2001) and extraordinary flavour (Perez-Cacho & Rouseff, 2008). Premium orange juices are added-value products characterized by a soft heat treatment (pasteurization) and contain only citrus juices from orange cultivars, not concentrates, and the fruit pulp obtained from the endocarp (Council Directive 2001/112/EC of 20 September 2001). Consumer demand and the popularity of organic products have grown tremendously in the last decade. This trend is driven by the increasing awareness of the benefits of healthy eating and the demand for more sustainable agri-food systems. This scenario has led to the emergence of significant interest in the authenticity of

products declared as organic. However, several authors assert the importance of implementing robust analytical tools with regard to this topic (Capuano, Boerrigter-Eenling, Veer, & Ruth, 2013; Kessler et al., 2015). In this sense, conventional juices are potential candidates to be substituted for organic juices, but there are no studies in the literature about this topic.

In recent years, new approaches, such as metabolomics, have emerged in food authentication applications (Cubero-Leon, Peñalver, & Maquet, 2014). These days, a complete metabolome is a powerful resource that provides an overall picture of a biological system and is crucial for organic food authentication studies. Therefore, HPLC-HR-MS is a key technology for untargeted studies which aim to authenticate foodstuffs (Danezis, Tsagkari, Brusica, & Georgiou, 2016). This technique has mainly been applied to the classification of orange juices by geographical origin (Díaz, Pozo, Sancho, & Hernández, 2014; Jandrić, Islam, Singh, & Cannavan, 2015) and to fraudulent practices (Jandrić & Cannavan, 2015), but not to the organic juice sector.

Volatile compounds are highly responsive to physical and chemical processes. Gas chromatography coupled to mass spectrometry is able to account for slight variations in the metabolites

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: josem.moreno.rojas@juntadeandalucia.es (J.M. Moreno-Rojas), mariaj.ruiz.moreno@juntadeandalucia.es (M.J. Ruiz-Moreno).

resulting from different food farming practices (Röhlig & Engel, 2010). The potential of solid phase micro extraction (SPME) coupled to mass spectrometry as a valuable technique for discrimination purposes in processed foodstuffs has been proven (Stanimirova et al., 2010; Vallverdú-Queralt et al., 2013). However, there are few studies in the literature that successfully use volatile profiles for the discrimination of organic products but the importance of certain volatile compounds for the discrimination of organic and conventional fruits by HS-SPME-GC-MS has been reported recently (Cuevas, Moreno-Rojas, & Ruiz-Moreno, 2017; Cuevas, Moreno-Rojas, Arroyo, Daza, & Ruiz-Moreno, 2016). The use of variable selection algorithms such as variable importance in projection (VIP) is a useful way of identifying the main contributors in the models. This technique is widely known (Mehmood, Liland, Snipen, & Sæbø, 2012) in PLS regressions and to detect potential markers of food authenticity using mass spectrometry (Cuevas et al., 2016).

The complexity involved in organic farming studies, characterized by slight differences and noisy data sets, calls for the use of novel data handling perspectives. A new approach based on the responses provided by several analytical instruments could be a tool for building classification models and thus interpreting the data better (Biancolillo, Bucci, Magrì, Magrì, & Marini, 2014). This integrative process is called 'data fusion' and different instruments have been used for this methodology in the literature (Bajoub et al., 2017; Borràs et al., 2016). No data fusion approaches combining advanced mass spectrometry techniques have been performed to date for the authentication of organic foodstuffs. The aim of the current paper was to ascertain the potential of the mass spectrometry techniques (HPLC-HR-MS and HS-SPME-GC-MS) using data fusion approaches for the authentication of the premium organic juices.

2. Material and methods

2.1. Chemicals and materials

LC-MS grade methanol and formic acid were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) was supplied by Panreac Applichem (Barcelona, Spain). Milli-Q water was obtained from a Milli-Q Plus water system (Millipore, Spain). Sodium chloride, ACS reagent grade (purity $\geq 99.8\%$) and the standard compounds (listed in Table 2) were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain).

2.2. Premium orange juices

Nineteen premium orange juices (ten conventional and nine organic juices) were collected from French and Spanish markets during the summer of 2015 (Supplementary Table 1) and were immediately frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. The limited number of premium juices led to the search for premium juices across two countries. All the samples were pasteurized, contained juice pulp and were produced in accordance with the Council Directive 93/77/EEC of 21 September 1993 relating to fruit juices and similar products. All the organic samples were labeled with the European organic farming emblem (Council Regulation (EC) No 834/2007 - organic production and labeling of organic products) and that of private certified institutions from each country.

2.3. HPLC-HR-MS methodology

Ten grams of juice were homogenized using an Ultraturrax homogenizer for 30 s and extracted according to previous reports (Pereira-Caro et al., 2016). Briefly, the samples were mixed with

6 mL of acidified methanol (1% FA) and ultrasonicated for 2 min and then centrifuged at 5000 rpm for 5 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. The supernatants were transferred into vials and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until the HPLC-HR-MS analysis. Aliquots of orange juice were analyzed using a Dionex Ultimate 3000 RS UHPLC system comprising a UHPLC pump, a PDA detector scanning from 200 to 600 nm, and an auto-sampler operating at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Thermo Fisher Scientific, CA, USA). The HPLC conditions were previously described by Pereira-Caro et al., 2016. Briefly, reverse phase separations were carried out using a $150 \times 4.6\text{ mm i.d. } 5\text{ }\mu\text{m } 100\text{ A C18 Kinetex}$ column (Phenomenex, UK) maintained at $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ and eluated at a flow rate of 1.0 mL min^{-1} . The injection volume was $10\text{ }\mu\text{L}$. The solvents used as the mobile phase were: solvent A (water/formic acid 99:1 v/v) and solvent B (methanol/formic acid 99:1 v/v), scheduled in the following gradient: 45 min linear gradient from 3% B until 50% B. In addition, 15 min of washing and equilibration preceded each next injection. After passing through the flow cell of the PDA detector, the column eluate was split and 0.2 mL min^{-1} directed to an Exactive Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, CA, USA) fitted with a heated electrospray ionization probe (HESI) operating in negative ionization mode, scanning the ions in the m/z range from 100 to 1000. Full scans were recorded with a resolution of 50,000 and with a full AGC target of 1,000,000 charges, using 2 microscans. The analyses were also based on in-source collision-induced dissociation scans at 25 eV. The capillary temperature was $300\text{ }^{\circ}\text{C}$, the heater temperature was $150\text{ }^{\circ}\text{C}$, the sheath gas and the auxiliary gas flow rate were both 20 units, the sweep gas was 3 units, and the spray voltage was 3.00 kV. Data acquisition and processing were carried out using Xcalibur software (Thermo Fisher Scientific, San José, CA, USA). Before a measurement series, the Exactive Orbitrap was externally calibrated weekly using ready-to-use calibration mixtures (Pierce ESI Negative Ion Calibration Solution and Pierce LQT ESI Positive Ion Calibration Solution), both available from Thermo Fisher Scientific, San José, CA, USA. In the untargeted metabolomic study, a quality control (QC) sample was applied to assess and ensure the analytical process was performed appropriately (Gika, Macpherson, Theodoridis, & Wilson, 2008; Lai et al., 2009). The QC sample, composed of identical aliquots of a representative pool of the samples (orange juice), was injected regularly throughout the run. This QC sample represented both the sample matrix and metabolite composition of the samples and was used to monitor drifts and to determine the variance of a metabolite feature (below 20%). The Compound Discoverer 2.0 software (Thermo Fisher Scientific, San José, CA, USA) was used for the metabolomic characterization of the orange juices. This software used an untargeted metabolomic workflow and differential analysis node. First, Compound Discoverer aligns the total ion chromatograms along the retention time using an adaptive curve, which is a flexible curve for each retention time point with a maximum shift of 0.5 min and 5 ppm mass tolerance. Maximum numbers of possible C, H, O, N, P and S atoms were, respectively, 80, 100, 50, 42, and 4. The nitrogen rule was not applied in order to include possible radical ions. Data extraction parameters were selected on the basis of the characteristics of chromatographic and mass spectrometric performance. Then, the detected features with an intensity no less than 100,000 and S/N larger than 5 in each set of data were extracted and merged into components according to ion adducts. To date, structural identification in the metabolomic workflow is the bottleneck in the interpretation of metabolomic data. The presumably identified compounds were searched for in online databases such as METLIN, HMDB, KEGG and LIPIDMAPS to verify their existence. Peak matching and annotations were performed by looking for similarities between the accurate mass obtained by HPLC-HR-MS and the monoisotopic mass presented in three of the databases mentioned (mass difference less than 5 ppm).

2.4. HS-SPME-GC-MS methodology

Ten ml of orange juice were diluted to 50 ml with EDTA solution (200 mM and pH 7.0 adjusted with NaOH 1.0 M). Next, 10 ml were transferred into a 20 mL SPME vial containing 3.5 g of NaCl. The mixture was homogenized with a vortex shaker for 30 s and then the volatiles were sampled by HS-SPME with a 50/30 μm CAR/PDMS/DVB fiber (StableFlex/SS) supplied by Supelco (Bellefonte, PA, USA). Incubation and extraction were performed at 60 °C for 10 and 30 min respectively under continuous agitation (500 rpm). After extraction, the fiber was desorbed in the injector at 250 °C for 15 min. The incubation, extraction, and desorption of volatile compounds were performed automatically by a Combi-Pal auto-sampler (CTC Analytics, Zwigen, Switzerland). The gas chromatography analyses were carried out in a Trace GC ultra gas chromatograph (Thermo Fisher Scientific, CA, USA) coupled to a single quadrupole mass spectrometer (ISQ; Thermo Fisher Scientific, CA, USA). The injections were performed in splitless mode for 1 min and the volatile compounds were analyzed using a DB-5ms column (60 m \times 0.25 mm with 0.25 μm film thickness) provided by J&W Scientific (CA, USA) with helium as the carrier gas at a constant flow of 1.0 ml/min. The oven temperature conditions were 45 °C for 1 min, increasing by 6 °C min^{-1} to 90 °C, 3 °C min^{-1} to 210 °C, 6 °C min^{-1} to 250 °C and then held for 16 min. The mass detector was operated in electronic ionization mode (70 eV). The source and transfer line temperatures were 200 °C and 230 °C, respectively. The detection was performed in scan mode in the range between 35 and 300 mass-to-charge ratio and at a scanning speed of 7.0 scans s^{-1} . Chromatograms and spectra were recorded and processed using the Xcalibur software (Thermo Fisher Scientific™; v. 3.0, USA). The compounds were identified by comparison of both the mass spectra and retention times with those of pure standards (Sigma-Aldrich). When standards were not available, the identification was performed using the NIST 05 mass spectral library and confirmed by their linear retention index (LRI) in the literature. The LRIs were calculated by the injection of a liquid mixture of n-alkane standards (C7–C40) analyzed under the same conditions.

The peak areas of specific ions were selected and integrated for each volatile compound (Table 3). The accuracy of the analyses was checked. To check the reproducibility and the repeatability, a quality control test was carried out by the injection of a reference sample (previously characterized) consisting of an orange juice sample (processed under the same conditions) included in each sequence of analysis (every 8 injections) to confirm the performance of the analysis of each volatile organic compound (less than 20% RSD). The repeatability was under 10% RSD for each analyte.

2.5. Multivariate analysis

Principal component analysis (PCA) was first applied for data visualisation in both datasets. This technique, based on the correlation among variables, is used to reduce the number of dimensions. The principal components are linear combinations of the original data. Moreover, a hierarchical cluster analysis (HCA) was performed. This methodology displays the data, emphasizing their natural clusters and patterns in a two dimensional plot. In this sense, HCA accounted for the Euclidian distances between the samples and Ward's method was used to verify the similarity between the samples. A partial least squares discriminant analysis (PLS-DA; SIMPLS algorithm) was performed to each data set separately (LC and GC blocks). The SIMPLS and NIPALS are the most common algorithms used for partial least squares analysis, SIMPLS being less time-consuming.

PLS-DA correlates the variance of the data obtained by the

instrument (X matrix) with a matrix which contains the classes (matrix Y) selected as zero for the first class and one for the second class (Ballabio & Consonni, 2013). The optimum number of latent variables was determined by leave-one-out cross validation (LOOCV) based on the minimum value of the root-mean square error of the cross validation (RMSECV) step. No outliers were detected based on Hotelling's T^2 and Q residual statistical test (confidence level of 95%). The software used was PLS toolbox SOLO® (v. 8.2.1, Eigenvector Research Inc., USA). The permutation tests was performed using MATLAB (v. 2008b MathWorks Inc. USA). The matlab m-files were downloaded and adapted from the website <http://www.bdagroup.nl>.

2.6. Data fusion approaches

Data fusion involves using different instrumental techniques and combining the data they generate. Borràs et al. (2015) proposed grouping the strategies into three categories: 'Low-level', 'Mid-level' and 'High-level'. To find an optimal classification model for the classes selected (organic or conventional), low-level and mid-level data fusion were tested for the two blocks (LC and GC matrices) obtained from the mass spectrometry techniques. The objective of the data fusion was to obtain the maximum number of correctly classified samples. In low-level fusion, data are simply concatenated sample-wise into a unique matrix containing all the information from the different instruments (with as many rows as the number of samples and as many columns as the number of variables from all the instruments) before building the model. The PLS-DA model developed can extract correlations between variables of different blocks (or instruments) weighing the importance of each instrument to the objective evaluated. The predominance of one data source over the others (dimensional distortion) can be avoided using pre-processing techniques (Borràs et al., 2015). A limitation of this strategy is that the increase in useful information given by each apparatus cannot compensate for the amount of irrelevant data added by each instrument. In the mid-level fusion, relevant features were selected from the individual PLS-DA models (GC-MS and LC-MS). These features can be obtained by variable selection procedures (Borràs et al., 2015) and concatenated into a single matrix or through the multi-way methods (Smilde, van der Werf, Bijlsma, van der Werff-van der Vat, & Jellema, 2005). With this technique, dimensional distortion is avoided, while the main disadvantage is the need to build a preliminary model of the individual blocks that will determine the goodness of the mid-level data fusion approach.

2.7. Potential markers

A multi-step criterion was used to analyze the dataset obtained by HPLC-HR-MS. As stated in the literature, univariate and multivariate analyses provide significant information regarding discriminant analysis. Both methodologies should be used because they actually show different perspectives of distinct variability sources and they are complementary (Saccetti, Hoefsloot, Smilde, Westerhuis, & Hendriks, 2014). Due to the different sources of variability between the samples (varieties, crop management and extraction type) and the wide variety of data, restricted conditions should be selected. Moreover, the variable importance in projection (VIP) values estimate the importance of each metabolite in each class in the PLS-DA model. A VIP versus latent variable 1 (LV1) (responsible for differentiation) plot was used to identify the main contributors of the discrimination between classes. Moreover, several requirements were applied to obtain potential markers: 1) univariate requirement: metabolite must belong to one class (organic or conventional), based on the p-value (Benjamini-

Hochberg correction) obtained by the student's t-test; 2) multivariate requirement: the VIP value must be above two; 3) robustness requirement: the relative standard deviation (RSD) of the groups must be reproducible within the group, and it is not possible to identify compounds as potential markers if the RSD is above 30% (the RSD was calculated against the overall samples for each group).

A previously reported double-check criterion (Cuevas et al., 2016) was used to discover potential markers in the volatile fraction of the orange juices. Briefly, the potential volatile markers were identified based on the variable importance in the projection values and on the category from the factor analysis of variance (category 'a' for the highest volatile content, Fisher's least significance differences). The compounds obtained by this methodology can be considered unique markers in accordance with their organic or conventional origin.

2.8. Validation of the PLS-DA models

The overall quality of a PLS-DA model is influenced by many factors, including the number of components selected, the cross validation strategy used and the optimization criteria (Saccenti

et al., 2016). Therefore, all the models were validated using the single cross validation strategy in the individual strategies (HPLC-HR-MS & HS-SPME-GC-MS) and the data fusion techniques (low-level and mid-level). A single cross validation is usually performed by dividing samples into separation groups. In our case, a reasonable number of cross validation groups was reached using the leave-one-out (LOO) validation procedure (Ballabio & Consonni, 2013). This methodology is based on the fitting abilities of the samples. In the case of a leave-one-out cross validation strategy, each sample is removed one by one each time the model (the remaining samples) is performed, and then used to predict the sample that was not included.

Finally, the model selected (best fitting model) was subjected to a double-check validation according to the methodology previously described (Szymańska, Saccenti, Smilde, & Westerhuis, 2012; Westerhuis et al., 2008) to overcome the dependency between the prediction error for new individuals and the optimization of the model parameters. The main advantage of this is to control the two critical steps when building PLS-DA model: the selection of the optimal number of latent variables and the assessment of the overall quality of the model. Briefly, two nested loops are needed,

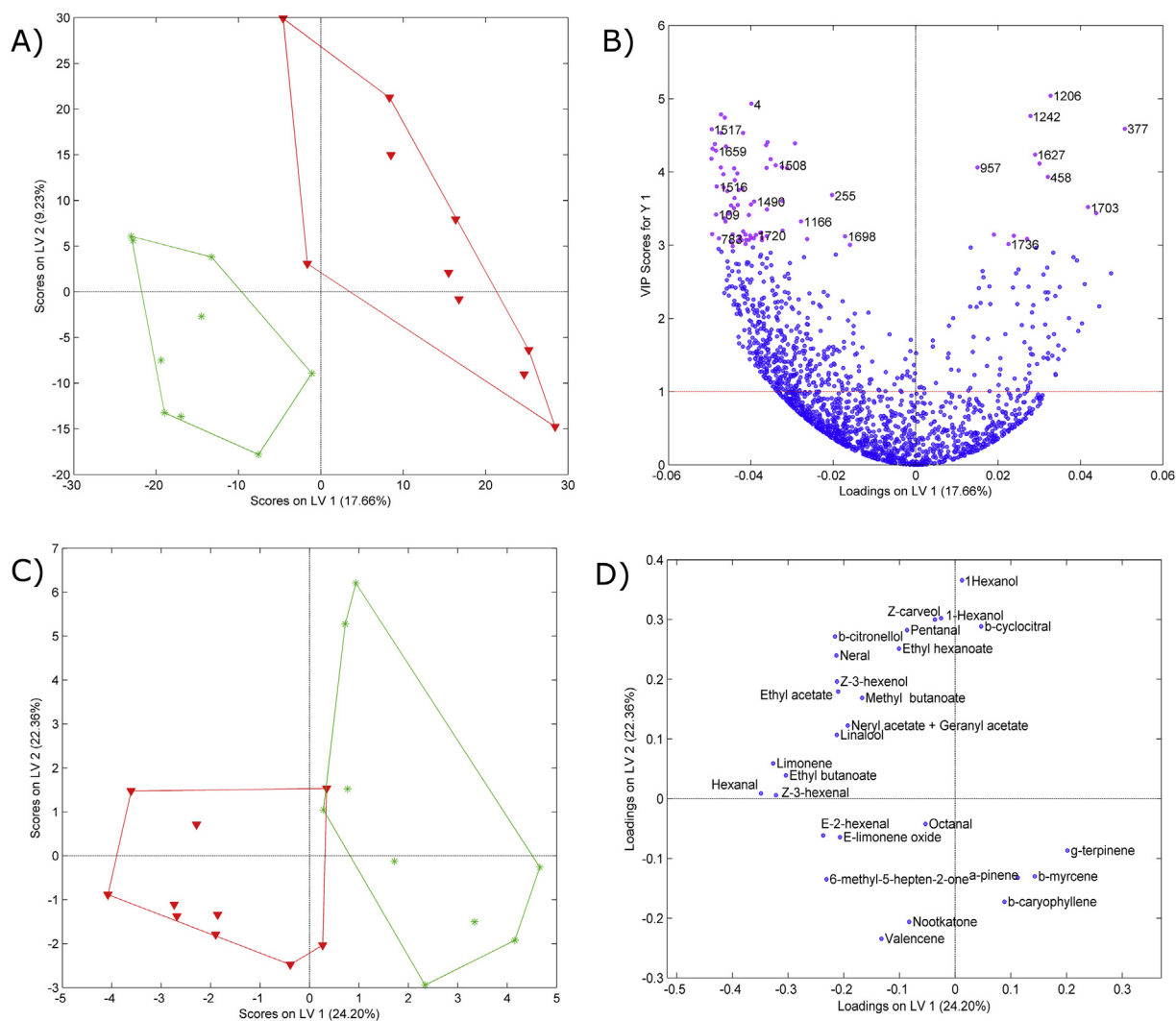


Fig. 1. A) OPLS-DA scores plot of the metabolomic fingerprinting block. Red inverse triangles for conventional samples and green stars for organic ones. B) OPLS-DA loadings plot (LV1) versus variable importance in projection of the metabolomic fingerprinting block. C) PLS-DA scores plot of the volatile compounds block. Red inverse triangles for conventional samples and green stars for organic ones. D) PLS-DA loadings plot of the volatile compounds block. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

an inner loop and an outer loop. The aim of the inner loop is to optimize the complexity of the PLS-DA model and the aim of the outer loop is to assess the final model performance. The inner loop and the outer loop procedures are repeated until all samples from the training set have been in the test set once and only once (Westerhuis et al., 2008). The PLS-DA models were evaluated by permutation tests. Number of misclassifications (Szymańska et al., 2012) and randomization test (Marrubini, Papetti, Genorini, & Ulrici, 2016; Van der Voet H. 1994) were used as diagnostic statistics.

3. Results and discussion

3.1. Individual techniques

3.1.1. Orange juice metabolomic fingerprinting (UPLC-HR-MS)

The non-targeted LC-MS analysis produced 32851 features (detected peaks) extracted from the 19 samples using Compound Discoverer. The data set used was composed of 1739 columns (metabolites) and 19 rows (samples).

Preliminary exploratory data analyses were carried out. Principal component analysis was applied to reduce the number of dimensions. The scores plot from the unsupervised PCA did not show a clear segregation between the sample groups (organic vs conventional) (Supplementary Fig. 1). HCA showed samples as misclassified in the cluster belonging to the correct class (Supplementary Fig. 2). These two unsupervised approaches did not show a clear dissimilarity trend for the classes studied.

Before the supervised technique was used, several pre-processing techniques were tested. The pre-processing techniques selected in this matrix were 'Orthogonalization' and 'Probabilistic Quotient Normalization' (PQN) to reach the lowest RMSECV. Orthogonal transformation ensures that all linear modelling will produce model components that are related only to the variation that is informative for the prediction of the response matrix (Boccard & Rutledge, 2013) and it is a widely-used technique in metabolomics (Bylesjö et al., 2006; Putri & Fukusaki, 2014). The PQN pre-processing technique is known to be a suitable fitting pre-processing technique for PLS-DA and metabolomic studies (Di Guida et al., 2016), as in our case. Four latent variables was selected. According to the OPLS-DA model, the scores plot (first two latent variables) showed a clear discrimination between the organic and non-organic juices (Fig. 1a). The sensitivity and specificity values for those classes were high, ranging between 87.5% and 77.8% for organic samples (Table 3). The first two latent variables accounted for 27% of the total variability of the 'X' matrix

(metabolite matrix), this being a high percentage compared to other metabolomic studies. Therefore, the organic and conventional production systems influenced a large number of metabolites in the premium orange juices. The main source of variability was accounted for by the latent variable 1. According to this latent variable, positive scores values were correlated with conventional juices (red), while organic samples (green) were correlated with negative values (Fig. 1a). The LV1 versus VIP values were plotted (Fig. 1b) to obtain the metabolites responsible for the discrimination, and those that presented higher VIP values (VIP>2) were tentatively identified according to their family (most probably belonging). A total of 235 metabolites were selected for the tentative identification. These included: 36 aminoacids, peptides or derivatives; 10 carbohydrate derivatives; 9 organic acids or derivatives; 8 fatty acyls; 6 fatty acids; 5 glycerophospholipids; 2 benzenoids; 22 flavonoids (mainly flavanones); 19 phenylpropanoid derivatives; 6 phenolic glycosides; and 4 terpenoids (Supplementary Table 2). Nine metabolites belonging to aminoacids, peptides or derivatives (Supplementary Table 2) showed significantly different values according to their organic or conventional origin. There were higher levels of six of them in the organic samples, while three were higher in conventional samples (Supplementary Table 2). Four fatty acids showed higher values in the organic juices (VIP>2.0; p-value<0.05) compared to the conventional ones (Supplementary Table 2). The flavonoid compounds were the main group of secondary metabolites identified in our samples, followed by the phenyl-propanoid derivatives. Only two of the twenty-two flavonoids showed a ratio value above 1 (higher in conventional samples) (Supplementary Table 2) while the rest of the flavonoids presented higher levels in the organic juices (above VIP>2). Nine organic acids identified in this study (VIP>2) presented higher values in the organic samples. Organic acids have been used in studies to differentiate between organic and conventional non-sanguine oranges (Roussos, 2011). However, a higher differentiation was found under conventional and organic farming for blood oranges (Tarozzi et al., 2006).

Table 1 shows the potential markers of premium orange juices using the multi-step criteria. Metabolite $m/z = 332.2573$, tentatively identified as a fatty acid, fulfilled the necessary requirements to be considered a potential marker for organic juices. Higher levels were found in the organic juices (p-value = 0.027), with an importance in the projected model (VIP = 3.94) and a low RSD value within the organic (RSD = 14.3%) and conventional (RSD = 18.2%) classes. According to METLIN, this metabolite was tentatively identified as 9,10,13-Trihydroxystearic acid, 9R,10S,18-trihydroxy-stearic acid, 18-hydroxy-9S,10R-dihydroxy-stearic acid

Table 1
Potential markers of premium organic orange juices using multi-step criteria in the HPLC-HR-MS data.

Metabolites ID	Exact mass [M-H] ⁺ (m/z)	Predicted formula	RT ^a	Tentative compound ^b	Ratio ^c	CONV.[RSD%]	ORG.[RSD%]	p-value	VIP
1719	332.2573	C ₁₈ H ₃₆ O ₅	47.904	Fatty acids	0.87	18.2	14.3	0.027	3.94
432	130.0260	C ₅ H ₆ O ₄	3.088	Fatty acyls	0.82	13.8	23.5	0.008	2.94
1291	408.1199	C ₂₃ H ₂₀ O ₇	15.890	Flavanoids	0.67	23.3	25.8	0.001	3.88
1320	406.1772	C ₂₅ H ₂₆ O ₅	31.592	Flavanoids	0.88	26.2	15.3	0.045	2.65
51	174.0161	C ₆ H ₆ O ₆	1.758	Org. Ac. & derivatives	0.76	15.4	23.6	0.004	2.10
1525	394.2863	C ₂₇ H ₃₈ O ₂	51.067	Terpenoids ^d	1.06	12.0	9.8	0.027	2.12
784	260.0308	–	1.602	Unknown	1.26	26.1	19.4	0.011	2.49
421	305.9224	–	57.093	Unknown	0.88	14.1	9.2	0.002	3.45
1021	165.9342	–	57.172	Unknown	0.88	18.4	11.8	0.022	3.25
995	812.2220	–	37.357	Unknown	1.40	25.9	16.6	0.004	2.86
763	147.9679	–	57.114	Unknown	0.91	15.2	17.1	0.035	2.20
767	147.9679	–	57.167	Unknown	0.92	13.5	15.0	0.008	2.17

^a Retention time expressed as minutes.

^b Tentative compound family, excluding Borum, clorum, and best matching compound using METLIN, LIPID MAPS and KEGG databases.

^c Coefficient obtained by dividing conventional and organic (Conv)/(Org) areas.

^d Metabolite identified according to the Human Metabolome Data Base (HMDB) and METLIN.

or phloionolic acid, all with a mass tolerance below 3 ppm. To our knowledge, no studies have reported the role of fatty acids in organic and conventional orange juices. Moreover, the organic juices presented higher values of fatty acids, acyls and glycerophospholipids. Lipid phospholipids have been reported to decline during ripening in sweet oranges (Nagy, Nordby, & Smoot, 1978). Thus, an early harvesting effect cannot be dismissed for organic samples. Among the fatty acyls, the metabolite $m/z = 130.02597$ was considered a potential marker (Table 1) for discriminating the organic and conventional juices. It was tentatively identified as 4-Oxoglutarate semialdehyde or 2-Oxoglutarate semialdehyde. In line with this result, aldehydes have been reported to be key components of discriminant models in fresh organic fruits (Cuevas et al., 2016). The multi-step criteria also identified two flavonoids as markers for the discrimination of organic samples, presenting a $m/z = 408.11988$ and $m/z = 406.17716$. Regarding the organic acid group, the metabolite $m/z = 174.01611$, tentatively identified as dehydroascorbic acid, presented higher values in the organic samples. And one sesquiterpenoid, with an $m/z = 394.28631$, showed higher values in conventional juices.

3.1.2. Volatile compounds (HS-SPME-GC-MS)

A total of twenty-eight volatile compounds, previously reported in orange juices (Cuevas et al., 2017; Plotto, Margaría, Goodner, & Baldwin, 2008), were identified by the automated HS-SPME-GC-

MS method. The volatile compounds were classified on the basis of their chemical families as follows into: aldehydes, alcohols, terpenoids and esters. A total of six aldehydes, three alcohols, thirteen terpenoids and six esters were found. All the compounds are well-known odorants contributing to the flavour of orange juices (Perez-Cacho & Rouseff, 2008). An independent student's t-test was carried out to provide an overall view of the production system in the samples. Clearly different amounts of three aldehydes and one ester compound were found in the organic and the conventional samples. The contents of hexanal, Z-3-hexenal, 6-methyl-5-octen-3-one and ethyl butanoate were higher in the conventional juices (50–100%).

Preliminary exploratory data analyses were performed but the two unsupervised approaches (PCA and HCA) did not allow clear trends to be established to discriminate between the groups studied (Supplementary figs. 3 and 4). In the PLS-DA model, the pre-processing technique selected in this matrix to reach the lowest RMSECV was 'autoscaling'. The sensitivity and specificity values for those classes were high, ranging between 67% and 80% for organic samples. Two latent variables was selected. The PLS-DA scores plot showed a slight discrimination between the organic and non-organic juices (Fig. 1c). The loadings plot (Fig. 1d) showed the volatile compounds responsible for the class separation. The organic juices (green, positive values for latent variable 1) were mainly explained by the volatile compounds γ -terpinene and β -

Table 2
Retention indexes, ions monitored, identification, odours, statistical comparison for each compound and variable importance in projection in the HS-SPME-GC-MS data.

	RT ^a	LRI ^b	Selected Ions ^c	Identification ^d	Odours	Conventional		Organic		p-value	VIP
						Mean	Std Error	Mean	Std Error		
Σ Aldehydes and ketones						174.44	± 19.22	141.9	± 44.27	ns	
Pentanal	11.01	700	58/44/57	LRI, MS	almond, malt	0.18	± 0.01	0.18	± 0.03	ns	0.63
Z-3-hexenal	14.63	800	69/83/98	STD, LRI, MS	green	3.90	± 0.62	1.86	± 0.36	*	0.76
Hexanal	14.74	802	56/44/57	STD, LRI, MS	green	19.37	± 1.63	11.20	± 1.87	**	0.44
E-2-hexenal	17.08	854	98/83/69	STD, LRI, MS	green	3.95	± 0.80	2.05	± 0.55	ns	0.64
6-methyl-5-hepten-2-one	23.26	983	126/108/111	LRI, MS	mushroom	0.89	± 0.16	0.23	± 0.03	**	1.28
Octanal	24.31	1004	110/56/84	STD, LRI, MS	citrus-like, fruity	146.15	± 18.2	126.38	± 43.66	ns	0.35
ΣAlcohols						8.64	± 1.08	9.65	± 2.37	ns	
Z-3-hexanol	17.08	844	82/67/55	STD, LRI, MS	green	3.84	± 0.61	2.8	± 0.64	ns	1.22
1-hexanol	17.54	863	69/56/84	STD, LRI, MS	green	4.21	± 0.54	6.19	± 1.78	ns	0.16
1-octen-3-ol	23.03	978	57/72/85	LRI, MS	mushroom	0.59	± 0.04	0.66	± 0.12	ns	0.49
ΣTerpenoids						9828.38	± 633.6	9583.4	± 979.74	ns	
α -pinene	21.51	948	93/105/121	LRI, MS	green, piney, fruity	149.68	± 24.37	207.98	± 81.74	ns	1.09
β -myrcene	23.61	990	93/69/121	STD, LRI, MS	green, metallic	1946.58	± 97.16	2324.6	± 296.99	ns	3.38
Limonene	26.30	1043	68/93/136	STD, LRI, MS	citrusy, lemon	4595.62	± 345.94	4346.9	± 759.01	ns	0.95
γ -Terpinene	27.58	1068	93/136/121	STD, LRI, MS	minty, piney, fruity	466.81	± 42.14	785.57	± 198.67	ns	0.61
Linalool	29.33	1102	71/93/121	STD, LRI, MS	floral	1139.2	± 169.17	817.55	± 201.41	ns	0.25
E-limonene oxide	31.79	1151	94/108	LRI, MS	citrus-like, green	2.29	± 0.26	1.72	± 0.16	ns	0.51
β -citronellol	35.52	1226	81/69/82/95	LRI, MS	citrus, fruity, floral	114.18	± 10.9	84.78	± 21.66	ns	0.40
β -cyclocitral	36.11	1238	137/109/123	STD, LRI, MS	sweet, green, floral	6.58	± 1.00	8.51	± 1.66	ns	1.24
Z-carveol	36.46	1245	134/84/109	LRI, MS	green, rubber	31.05	± 4.21	36.08	± 12.56	ns	0.37
Neral	37.70	1271	84/69/94	LRI, MS	citrus-like	13.02	± 1.81	9.21	± 2.41	ns	0.19
β -caryophyllene	46.14	1455	133/93/105	LRI, MS	musty, green	33.41	± 4.34	38.41	± 9.66	ns	0.36
Valencene	49.18	1501	161/189/204	LRI, MS	citrus-like	1308.44	± 149.04	906.17	± 194.08	ns	0.42
Nootkatone	59.69	>1700	200/147/218	MS	fruity	21.51	± 1.83	15.88	± 3.52	ns	0.25
ΣEsters						141.05	± 15.88	115.52	± 20.14	ns	
Ethyl acetate	8.56	<700	61/70/88	MS	fruity, solvent-like	7.70	± 1.21	5.24	± 1.20	ns	3.67
Methyl butanoate	11.71	719	74/71/87	LRI, MS	fruity	6.96	± 1.16	6.23	± 1.29	ns	2.09
Ethyl butanoate	14.63	800	88/71/60	STD, LRI, MS	fruity	158.17	± 27.13	77.99	± 16.42	*	2.69
Ethyl hexanoate	23.73	993	99/88/60	STD, LRI, MS	fruity	23.24	± 7.01	21.4	± 5.72	ns	1.57
Neryl acetate + geranyl acetate	41.7 + 41.9	1356 + 1361	93/69/121/136	LRI, MS	green, citrus-like	103.15	± 12.69	82.65	± 14.44	ns	0.92
ΣTotal						10152.5	± 635.73	9850.5	± 989.94	ns	

Unit = Ion peak area divided by 10^6 . Different letters in the same row means significance differences between crop management. The same character in the same row means homogeneous groups -mean comparison values (student t-test)- at different significance level. Significance level: ns = non significant, * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$, *** = $P < 0.001$.

^a Minutes.

^b LRI: lineal retention index on DB-5-MS column. Lineal retention index found in literatura according to Cuevas et al., 2017.

^c Quantitative ions are marked in bold type letter and qualitative ions in normal ones.

^d Identification technique, STD: Compound identified by commercial standard, LRI, MS: compound identified by lineal retention index and mass spectra comparison. VIP: Variable importance in projection. The sum of the volatile compounds belonged to each chemical class is highlighted in bold type letter.

Table 3

Statistics of the fitted models optimized for the individual and data fusion techniques in the single cross-validation scheme.

		Individual techniques				Data fusion techniques			
		UPLC-HR-MS		HS-SPME-GC-MS		Low level		Mid-level	
		Conventional	Organic	Conventional	Organic	Conventional	Organic	Conventional	Organic
Model training	Sensitivity (%)	100	100	90	89	100	100	100	100
	Specificity (%)	100	100	89	90	100	100	100	100
	R ²	0.97	0.97	0.68	0.68	0.89	0.89	0.97	0.97
	Class Error	0	0	0.11	0.11	0	0	0	0
Model cross-validation	Sensitivity (%)	87	88	80	67	70	89	100	100
	Specificity (%)	88	87	67	80	89	70	100	100
	R ²	0.27	0.27	0.31	0.31	0.31	0.31	0.93	0.93
	Class Error	0.21	0.21	0.27	0.27	0.21	0.21	0	0

myrcene. The non-organic juices (red, negative values for latent variable 1) were mainly described by hexanal, Z-3-hexanal, limonene and ethyl butanoate. Regarding the VIP values, 6-methyl-5-hepten-one and ethyl butanoate showed VIP values of 1.28 and 2.69, respectively. According to our methodology, these compounds could be considered potential candidates for the discrimination of organic and conventional juices. Note that, ester compounds showed high VIP values in the multivariate analysis, while no differences were found in the univariate analysis, except for ethyl butanoate, which showed a higher content in the conventional juices (p -value = 0.025; Table 2). Indeed, ethyl butanoate was recently proposed as a potential marker of conventional fresh oranges (Cuevas et al., 2017) and is a key odorant in orange juices (Perez-Cacho & Rouseff, 2008). Numerous pathways for ester biosynthesis have been proposed, including being derived from fatty acids and amino acids (Schwab, Davidovich-Rikanati, & Lewinsohn, 2008). Some aldehydes have been reported to be key volatile compounds in organic fruits (Cuevas et al., 2016) and they have been proposed as important compounds in fresh organic oranges (Capuano et al., 2013). Moreover, aldehydes are key aroma contributors of citrus essential oils (Tranchida, Bonaccorsi, Dugo, Mondello, & Dugo, 2012). However, the concentration of the aldehydes can vary widely among citrus species (González-Mas, Rambla, Alamar, Gutiérrez, & Granell, 2011) or varieties (Buettner & Schieberle, 2000).

Volatile compounds are very sensitive to climate and cultural practices (Hui et al., 2010), maturity stage (Perez-Cacho & Rouseff, 2008) and juice extraction type (Baldwin et al., 2012). In this sense, it is the first time that a high concentration of the above compounds has been found in a heterogeneous group of juices without

supervising the genetics, geographical origin and processing technologies. Thus, the role of aldehydes and ester compounds in organic juices should be investigated with further studies.

3.2. Data fusion techniques

In the individual techniques, the volatile profile showed higher sensitivity rates for the conventional samples compared to metabolic fingerprinting. Meanwhile, the HPLC-HR-MS block was more sensitive for the classification of the organic samples. Thus, these blocks should be complementary. Low-level data fusion consists of concatenating the original data matrices and analyzing the resulting array as if it were a single data block. Each block (separately) and the concatenated block were pre-processed using several pre-treatment techniques recommended in the literature (Biancolillo et al., 2014). The optimal low-level data fusion did not improve the statistical model given by the individual techniques (Table 3). The dimensional distortion given by the dominance of the large matrix (LC matrix) over the others (GC matrix) is one of the main limitations of low-level data fusion. In the mid-level data fusion, the latent variables (LVs) from the UPLC-HR-MS and the HS-SPME-GC-MS were used to build the model. The score-matrix was used to perform the analysis using the PLS-DA (SIMPLS algorithm). With the mid-level data fusion approach it was possible to identify the classes perfectly, obtaining 100% (mean value of the models developed in the outer loop) sensitivity and specificity in the prediction, improving the statistical parameters of the model (Table 4). The statistical significance ($p < 0.05$; 2000 permutations) in each PLS-DA in the outer loop was assessed by permutation tests and confirmed that the original models are very unlikely to be random

Table 4

Optimal conditions and classification parameters obtained with PLS-DA in the Mid-level data fusion in the double-check cross validation scheme.

		Inner loop		Outer loop	
		Conventional	Organic	Conventional	Organic
Model training	Sensitivity (%)	100 (±0.0)	100 (±0.0)	100 (±0.0)	100 (±0.0)
	Specificity (%)	100 (±0.0)	100 (±0.0)	100 (±0.0)	100 (±0.0)
	R ²	0.99 (±0.00)	0.99 (±0.00)	0.96 (±0.00)	0.96 (±0.00)
	RMSEc	0.05 (±0.003)	0.05 (±0.003)	0.09 (±0.002)	0.09 (±0.002)
Model cross-validation	Sensitivity (%)	92 (±1.7)	96 (±1.1)	100 (±0.0)	100 (±0.0)
	Specificity (%)	96 (±1.1)	92 (±1.7)	100 (±0.0)	100 (±0.0)
	R ²	0.72 (±0.01)	0.72 (±0.01)	0.85 (±0.02)	0.85 (±0.02)
	RMSEcv	0.30 (±0.01)	0.30 (±0.01)	0.20 (±0.01)	0.20 (±0.01)
Prediction ability	Sensitivity (%)	95 (±1.9)	100 (±0.0)	100 (±0.0)	100 (±0.0)
	Specificity (%)	100 (±0.0)	95 (±1.9)	100 (±0.0)	100 (±0.0)
	R ²	0.91 (±0.01)	0.91 (±0.01)	0.90 (±0.02)	0.90 (±0.02)
	RMSEp	0.20 (±0.01)	0.20 (±0.01)	0.21 (±0.01)	0.21 (±0.01)

The results are indicated as the mean (±std. error) of the cross-validation models performed in each loop. All the models developed in the inner loop ($k = 3$) showed four latent variables as preferential according to the RMSEp and number of misclassified. In the outer loop ($k = 4$), the models were developed using four latent variables according to the inner loop.

(Supplementary Table 3). The number of misclassifications (NMC) obtained for the original class labels was 1.25, whereas the NMC of the randomized permuted class labels was 3.23 indicating an acceptable difference between them ($p = 0.0351$; 2000 permutations) (Supplementary Fig. 5). This leads to the conclusion that the mid-level data fusion PLS-DA model is adequate for the classification of premium organic and conventional juices.

4. Conclusions

A novel approach based on advanced analytical techniques combining metabolomic fingerprinting, volatile profiles and chemometrics was followed to authenticate processed organic premium juices for the first time. Furthermore, the application of different data fusion approaches in conjunction with PLS-DA improved the discriminant power of the models, achieving, in our case, a sensitivity and specificity of 100%. Two analytical platforms were used in the data sets. Some flavonoids, fatty acids, aldehydes and esters were identified as potential markers involved in the differentiation of organic juices. Strategies using volatile and non-volatile fractions should be taken into consideration as a new platform for the authentication of organic foodstuffs.

Mid-level data fusion prevented the dimensional distortion of the models, proving to be a promisingly accurate approach for the authentication of organic products. Data fusion approaches represent a promising way of handling data for the robust authentication of the organic products.

Acknowledgments

This work was financed by the Andalusian Institute of Agricultural and Fisheries Research and Training (IFAPA) and the European Commission funds (European Rural Development Funds ERDF and the European Social Fund ESF) through the project 'Caracterización organoléptica y funcional de productos ecológicos. Utilización de técnicas isotópicas para la diferenciación entre producto ecológico y convencional' (PP.AVA.AVA201301.7). Francisco Julián Cuevas was granted a research contract funded by the Andalusian Institute of Agricultural and Fisheries Research and Training (IFAPA) and the European Social Fund. José Manuel Muñoz-Redondo was awarded grants from the Andalusian Institute of Agricultural and Fisheries Research and Training (IFAPA), inside the National Youth Guarantee System funded through the European Social Fund (ESF) and the Youth Employment Initiative (YEI). María José Ruiz-Moreno and Gema Pereira-Caro were funded by a postdoctoral research contract from the Andalusian Institute of Agricultural and Fisheries Research and Training (IFAPA) and the European Social Fund (ESF).

Appendix A. Supplementary data

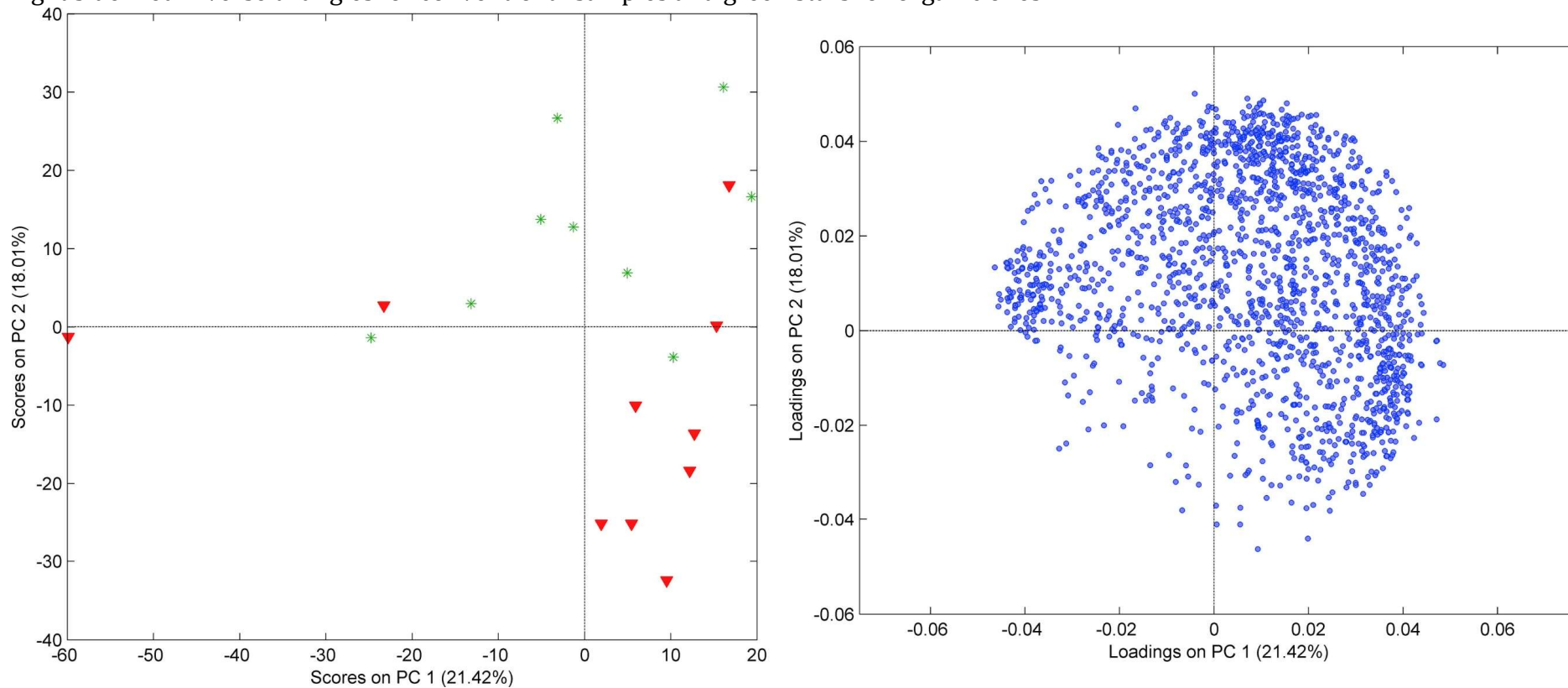
Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.06.031>.

References

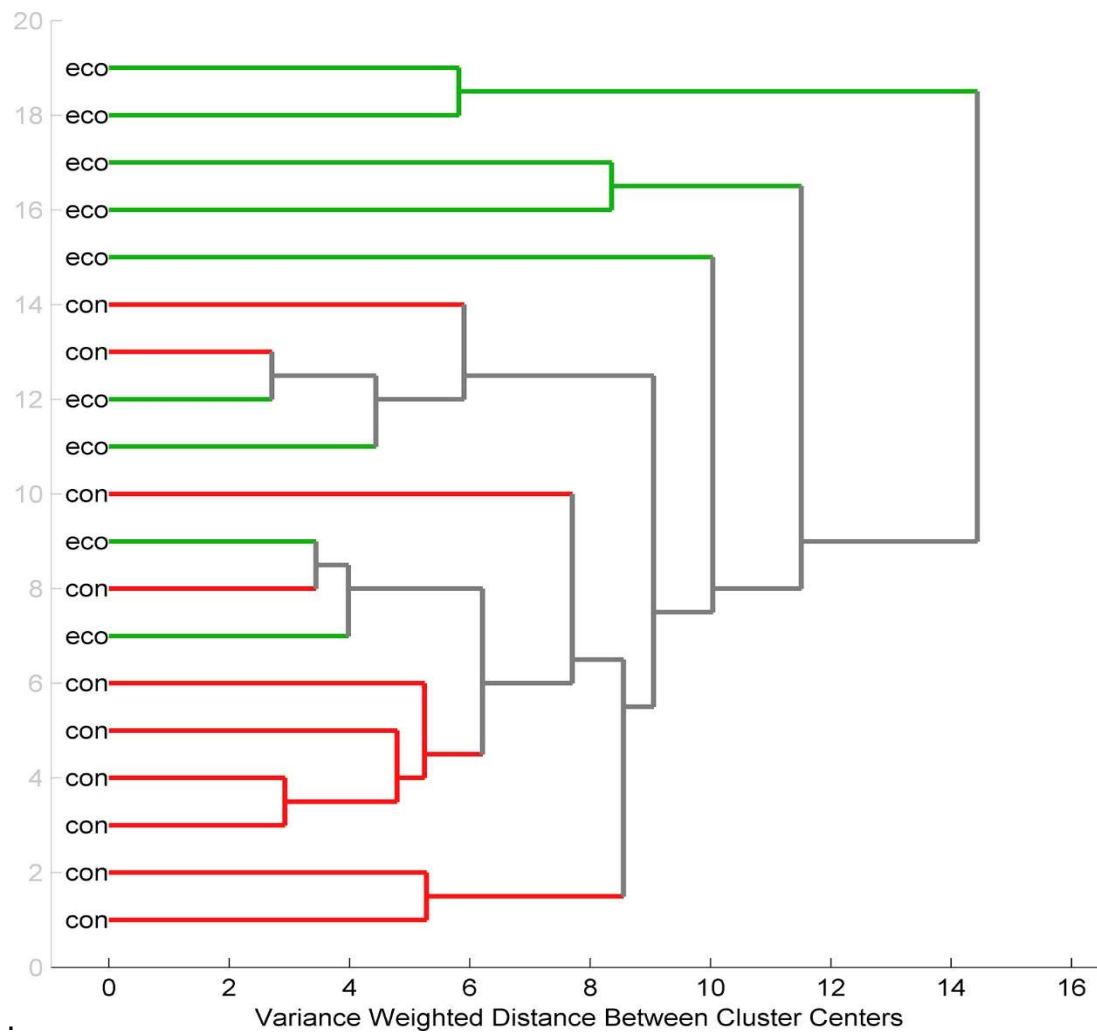
- Bajoub, A., Medina-Rodríguez, S., Gómez-Romero, M., Bagur-González, M. G., Fernández-Gutiérrez, A., & Carrasco-Pancorbo, A. (2017). Assessing the varietal origin of extra-virgin olive oil using liquid chromatography fingerprints of phenolic compound, data fusion and chemometrics. *Food Chemistry*, 215, 245–255.
- Baldwin, E. A., Bai, J., Plotto, A., Cameron, R., Luzio, G., Narciso, J., et al. (2012). Effect of extraction method on quality of orange juice: Hand-squeezed, commercial-fresh squeezed and processed. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(10), 2029–2042.
- Ballabio, D., & Consonni, V. (2013). Classification tools in chemistry. Part 1: Linear models. PLS-DA. *Analytical Methods*, 5(16), 3790–3798.
- Biancolillo, A., Bucci, R., Magri, A. L., Magri, A. D., & Marini, F. (2014). Data-fusion for multiplatform characterization of an Italian craft beer aimed at its authentication. *Analytica Chimica Acta*, 820, 23–31.
- Boccard, J., & Rutledge, D. N. (2013). A consensus orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) strategy for multiblock Omics data fusion. *Analytica Chimica Acta*, 769, 30–39.
- Borrás, E., Ferré, J., Boqué, R., Mestres, M., Aceña, L., & Busto, O. (2015). Data fusion methodologies for food and beverage authentication and quality assessment—A review. *Analytica Chimica Acta*, 891, 1–14.
- Borrás, E., Ferré, J., Boqué, R., Mestres, M., Aceña, L., Calvo, A., et al. (2016). Olive oil sensory defects classification with data fusion of instrumental techniques and multivariate analysis (PLS-DA). *Food Chemistry*, 203, 314–322.
- Buettner, A., & Schieberle, P. (2000). Influence of mastication on the concentrations of aroma volatiles—some aspects of flavour release and flavour perception. *Food Chemistry*, 71(3), 347–354.
- Bylesjö, M., Rantalainen, M., Cloarec, O., Nicholson, J. K., Holmes, E., & Trygg, J. (2006). OPLS discriminant analysis: Combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. *Journal of Chemometrics*, 20(8–10), 341–351.
- Capuano, E., Boerrigter-Eenling, R., Veer, G., & Ruth, S. M. (2013). Analytical authentication of organic products: An overview of markers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(1), 12–28.
- Cubero-Leon, E., Peñalver, R., & Maquet, A. (2014). Review on metabolomics for food authentication. *Food Research International*, 60, 95–107.
- Cuevas, F. J., Moreno-Rojas, J. M., Arroyo, F., Daza, A., & Ruiz-Moreno, M. J. (2016). Effect of management (organic vs conventional) on volatile profiles of six plum cultivars (*Prunus salicina* Lindl.). A chemometric approach for varietal classification and determination of potential markers. *Food Chemistry*, 199, 479–484.
- Cuevas, F. J., Moreno-Rojas, J. M., & Ruiz-Moreno, M. J. (2017). Assessing a traceability technique in fresh oranges (*Citrus sinensis* L. Osbeck) with an HS-SPME-GC-MS method. Towards a volatile characterisation of organic oranges. *Food Chemistry*, 221, 1930–1938.
- Danezis, G. P., Tzakaris, A. S., Brusica, V., & Georgiou, C. A. (2016). Food authentication: State of the art and prospects. *Current Opinion in Food Science*, 10, 22–31.
- Di Guida, R., Engel, J., Allwood, J. W., Weber, R. J. M., Jones, M. R., Sommer, U., et al. (2016). Non-targeted UHPLC-MS metabolomic data processing methods: A comparative investigation of normalisation, missing value imputation, transformation and scaling. *Metabolomics*, 12(5), 1–14.
- Díaz, R., Pozo, O. J., Sancho, J. V., & Hernández, F. (2014). Metabolomic approaches for orange origin discrimination by ultra-high performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Food Chemistry*, 157, 84–93.
- Erlund, I., Meririnne, E., Alfthan, G., & Aro, A. (2001). Plasma kinetics and urinary excretion of the flavanones naringenin and hesperetin in humans after ingestion of orange juice and grapefruit juice. *The Journal of Nutrition*, 131(2), 235–241.
- Gika, H. G., Macpherson, E., Theodoridis, G. A., & Wilson, I. D. (2008). Evaluation of the repeatability of ultra-performance liquid chromatography–TOF-MS for global metabolic profiling of human urine samples. *Journal of Chromatography B*, 871(2), 299–305.
- González-Mas, M. C., Rambla, J. L., Alamar, M. C., Gutiérrez, A., & Granell, A. (2011). Comparative analysis of the volatile fraction of fruit juice from different Citrus species. *PLoS One*, 6(7), e22016.
- Hui, Y. H., Chen, F., Nollet, L. M. L., Guiné, R. P. F., Martín-Belloso, O., Mínguez-Mosquera, M. I., et al. (2010). *Handbook of fruit and vegetable flavors*. Wiley Online Library.
- Jandrić, Z., & Cannavan, A. (2015). An investigative study on differentiation of citrus fruit/fruit juices by UPLC-QToF MS and chemometrics. *Food Control*, 72B.
- Jandrić, Z., Islam, M., Singh, D. K., & Cannavan, A. (2015). Authentication of Indian citrus fruit/fruit juices by untargeted and targeted metabolomics. *Food Control*, 72B.
- Kessler, N., Bonte, A., Albaum, S. P., Mäder, P., Messmer, M., Goesmann, A., et al. (2015). Learning to classify organic and conventional wheat—A machine learning driven approach using the MeltDB 2.0 metabolomics analysis platform. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3.
- Lai, L., Michopoulos, F., Gika, H., Theodoridis, G., Wilkinson, R. W., Odedra, R., et al. Wilson, I. D. (2009). Methodological considerations in the development of HPLC-MS methods for the analysis of rodent plasma for metabolomic studies. *Molecular Biosystems*, 6(1), 108–120.
- Marrubini, G., Papetti, A., Genorini, E., & Ulrici, A. (2016). Determination of the sugar content in commercial plant milks by near infrared spectroscopy and luffa-schoor total glucose titration. *Food Analytical Methods*, 1–12.
- Mehmood, T., Liland, K. H., Snipen, L., & Sæbø, S. (2012). A review of variable selection methods in partial least squares regression. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 118, 62–69.
- Nagy, S., Nordby, H. E., & Smoot, J. M. (1978). Changing lipid class patterns during maturation of sweet oranges. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(4), 838–842.
- Pereira-Caro, G., Ludwig, I. A., Polyviou, T., Malkova, D., García, A., Moreno-Rojas, J. M., et al. (2016). Identification of plasma and urinary metabolites and catabolites derived from orange juice (poly) phenols: Analysis by high-performance liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(28), 5724–5735.
- Perez-Cacho, P. R., & Rouseff, R. (2008). Processing and storage effects on orange juice aroma: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(21), 9785–9796.
- Plotto, A., Margarita, C. A., Goodner, K. L., & Baldwin, E. A. (2008). Odour and flavour thresholds for key aroma components in an orange juice matrix: Esters and

- miscellaneous compounds. *Flavour and Fragrance Journal*, 23(6), 398–406.
- Putri, S. P., & Fukusaki, E. (2014). *Mass spectrometry-based metabolomics: A practical guide*. CRC Press.
- Röhlig, R. M., & Engel, K.-H. (2010). Influence of the input system (conventional versus organic farming) on metabolite profiles of maize (*Zea mays*) kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(5), 3022–3030.
- Roussos, P. A. (2011). Phytochemicals and antioxidant capacity of orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Salustiana) juice produced under organic and integrated farming system in Greece. *Scientia Horticulturae*, 129(2), 253–258.
- Saccetti, E., Hoefsloot, H. C. J., Smilde, A. K., Westerhuis, J. A., & Hendriks, M. M. W. B. (2014). Reflections on univariate and multivariate analysis of metabolomics data. *Metabolomics*, 10(3), 361–374.
- Saccetti, E., & Timmerman, M. E. (2016). Approaches to sample size determination for multivariate data: Applications to PCA and PLS-DA of omics data. *Journal of Proteome Research*, 15(8), 2379–2393.
- Schwab, W., Davidovich-Rikanati, R., & Lewinsohn, E. (2008). Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *The Plant Journal*, 54(4), 712–732.
- Smilde, A. K., van der Werf, M. J., Bijlsma, S., van der Werff-van der Vat, B. J. C., & Jellema, R. H. (2005). Fusion of mass spectrometry-based metabolomics data. *Analytical Chemistry*, 77(20), 6729–6736.
- Stanimirova, I., Üstün, B., Cajka, T., Riddelova, K., Hajslova, J., Buydens, L. M. C., et al. (2010). Tracing the geographical origin of honeys based on volatile compounds profiles assessment using pattern recognition techniques. *Food Chemistry*, 118(1), 171–176.
- Szymańska, E., Saccetti, E., Smilde, A. K., & Westerhuis, J. A. (2012). Double-check: Validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies. *Metabolomics*, 8(1), 3–16.
- Tarozzi, A., Hrelia, S., Angeloni, C., Morroni, F., Biagi, P., Guardigli, M., et al. (2006). Antioxidant effectiveness of organically and non-organically grown red oranges in cell culture systems. *European Journal of Nutrition*, 45(3), 152–158.
- Tranchida, P. Q., Bonaccorsi, I., Dugo, P., Mondello, L., & Dugo, G. (2012). Analysis of citrus essential oils: State of the art and future perspectives. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 27(2), 98–123.
- Tripoli, E., La Guardia, M., Giammanco, S., Di Majo, D., & Giammanco, M. (2007). Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chemistry*, 104(2), 466–479.
- Vallverdú-Queralt, A., Bendini, A., Tesini, F., Valli, E., Lamuela-Raventos, R. M., & Toschi, T. G. (2013). Chemical and sensory analysis of commercial tomato juices present on the Italian and Spanish markets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(5), 1044–1050.
- Van der Voet, H. (1994). Comparing the predictive accuracy of models using a simple randomization test. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 25(2), 313–323.
- Westerhuis, J. A., Hoefsloot, H. C. J., Smit, S., Vis, D. J., Smilde, A. K., van Velzen, E. J. J., et al. (2008). Assessment of PLS-DA cross validation. *Metabolomics*, 4(1), 81–89.

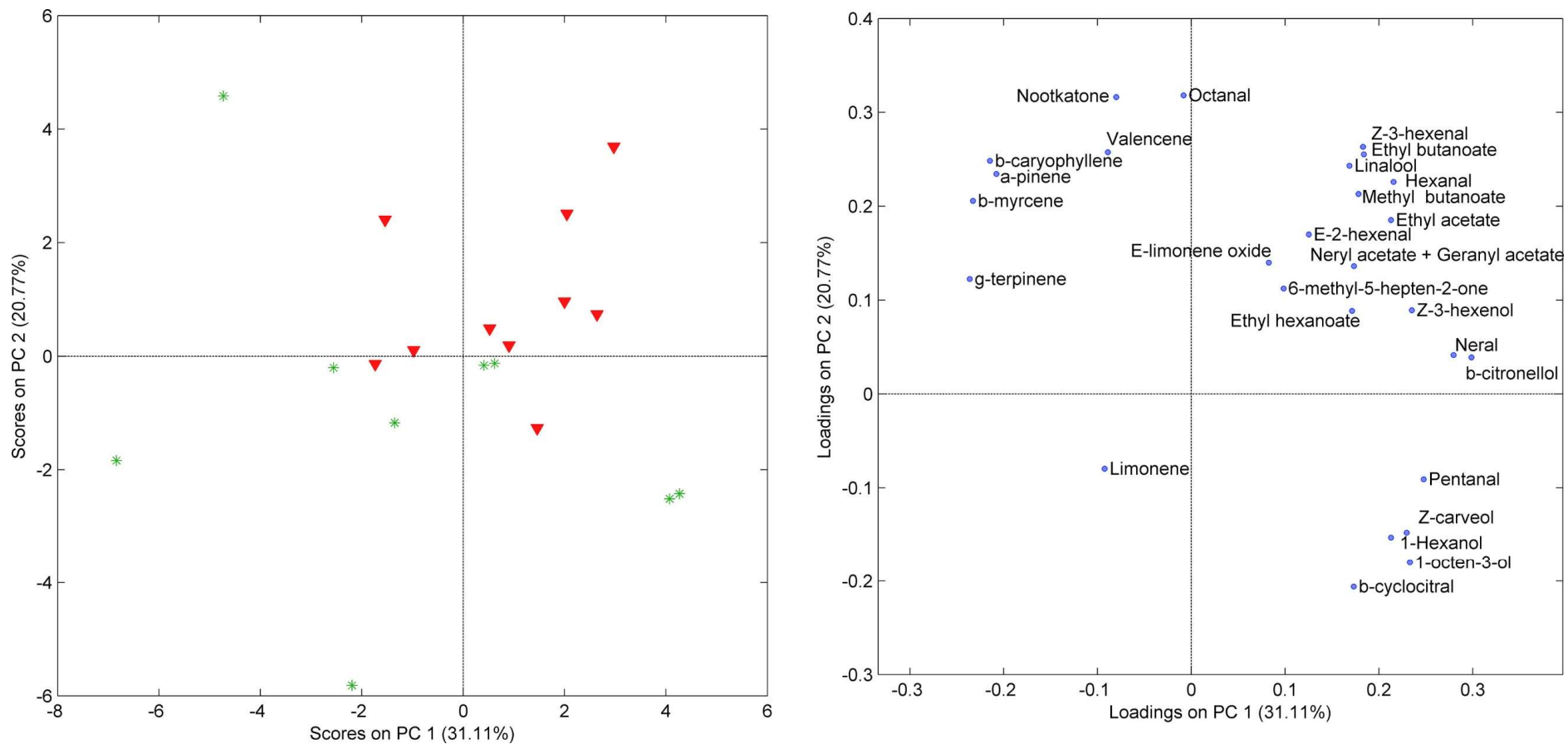
Supplementary Fig. 1. Principal component analysis for the metabolomic fingerprinting. Scores plot at the left side and loading plot at the right side. Red inverse triangles for conventional samples and green stars for organic ones.



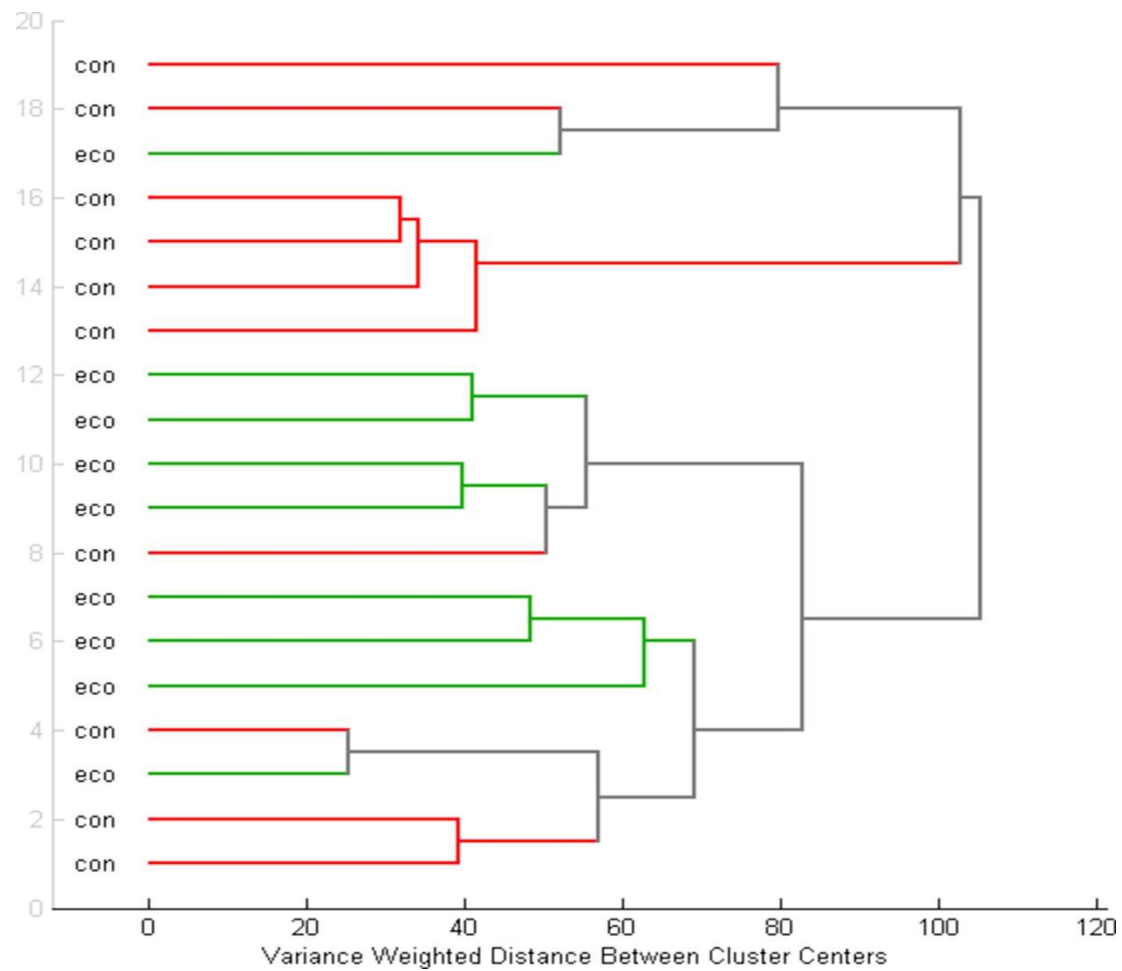
Supplementary Fig. 2. Hierarchical Cluster Analysis for the metabolomic fingerprinting. Ward's method and Euclidean distances were used to generate a dendrogram



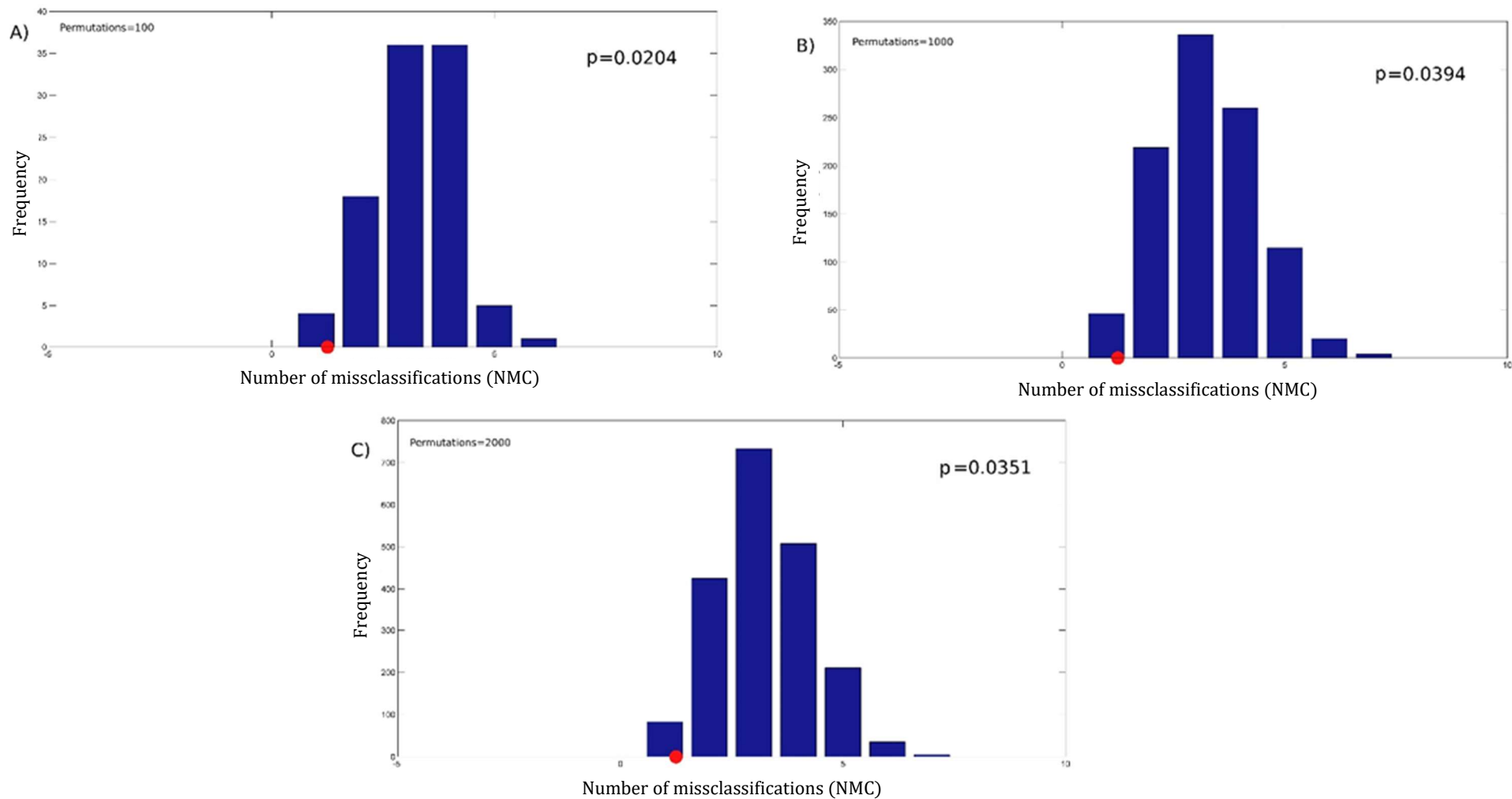
Supplementary Fig. 3. Principal component analysis for the volatile profile. Scores plot at the left side and loading plot at the right side. Red inverse triangles for conventional samples and green stars for organic ones.



Supplementary Fig. 4. Hierarchical Cluster Analysis for the volatile profile. Ward's method and Euclidean distances were used to generate a dendrogram.



Supplementary Fig. 5. Results of the PLS-DA permutation test (number of misclassifications; NMC) using A) 100 permutations; B) 1000 permutations and C) 2000 permutations.



Supplementary Table 1 . Independent Student t-test for the conventional and organic juices

	Conventional		Organic		p-value
	Mean	Desv.Std.	Mean	Desv.Std.	
Moisture	89.7	1.77	89.3	0.78	0.52
SSC	11.6	0.27	11.9	0.61	0.18
TPC	215	35	238	43	0.22
TEAC	1.97	0.28	2.06	0.27	0.47

Units: Moisture: percentage. SSC expressed Brix degrees. TPC (Total phenol content): ug/mL of GAE gallic acid equivalent. TEAC: mM of Trolox equivalent antioxidant capacity

Supplementary Table 2. Tentative identification of the main contributors for the organic and conventional discrimination in the HPLC-HR-MS data set

Metabolite ID	Exact mass [M-H] ⁻ (m/z)	RT ¹ [min]	Tentative compound group ²	Ratio ³	CONV. [RSD %]:	ORG. [RSD %]:	p-value	VIP
1658	531.3116	49.77	Amino acids, peptides, and analogues	0.761	31.5	34.0	0.482	4.89
1242	516.1862	23.97	Amino acids, peptides, and analogues	0.622	35.7	34.3	0.018	4.27
1516	191.0618	7.39	Amino acids, peptides, and analogues	0.671	60.0	28.2	0.253	4.25
194	314.0653	6.56	Amino acids, peptides, and analogues	0.905	22.8	27.4	0.733	4.12
1442	558.3306	50.33	Amino acids, peptides, and analogues	0.841	20.0	27.2	0.293	4.02
618	557.3270	50.33	Amino acids, peptides, and analogues	0.816	19.2	30.1	0.271	3.95
1609	474.2114	27.34	Amino acids, peptides, and analogues	0.735	45.0	62.4	0.743	3.77
1626	135.0539	3.70	Amino acids, peptides, and analogues	1.263	13.0	29.6	0.015	3.55
1241	460.2320	30.64	Amino acids, peptides, and analogues	1.526	27.8	50.2	0.012	3.52
424	420.1647	16.65	Amino acids, peptides, and analogues	0.578	75.6	39.0	0.179	3.47
1398	532.3148	50.10	Amino acids, peptides, and analogues	0.897	24.6	31.0	0.702	3.46
1515	518.2021	24.72	Amino acids, peptides, and analogues	0.641	61.1	48.1	0.539	3.43
837	500.1911	37.46	Amino acids, peptides, and analogues	0.408	85.7	53.8	0.027	3.42
1048	434.2165	23.23	Amino acids, peptides, and analogues	0.901	31.8	35.9	0.665	3.35
546	531.3115	50.10	Amino acids, peptides, and analogues	0.89	23.9	31.9	0.773	3.27
1570	464.1340	25.93	Amino acids, peptides, and analogues	0.783	38.0	17.6	0.202	3.20
648	516.1342	3.53	Amino acids, peptides, and analogues	0.712	24.4	24.3	0.004	3.12
967	542.2749	47.71	Amino acids, peptides, and analogues	0.639	50.3	35.0	0.025	3.08
1254	557.3270	49.98	Amino acids, peptides, and analogues	0.828	29.0	41.5	0.970	2.97
549	516.1861	21.82	Amino acids, peptides, and analogues	0.638	30.4	19.8	0.008	2.89
816	553.2960	49.19	Amino acids, peptides, and analogues	0.604	31.4	40.2	0.068	2.80
1524	570.2342	31.54	Amino acids, peptides, and analogues	0.707	43.6	72.1	0.926	2.73
1084	366.1537	15.62	Amino acids, peptides, and analogues	0.84	43.5	22.5	0.658	2.62
611	207.0899	17.56	Amino acids, peptides, and analogues	0.826	26.1	19.5	0.646	2.51
774	283.0925	4.02	Amino acids, peptides, and analogues	1.33	33.9	83.2	0.418	2.47
559	499.1643	24.26	Amino acids, peptides, and analogues	0.668	28.9	42.3	0.026	2.46
1569	442.1852	27.26	Amino acids, peptides, and analogues	1.494	22.7	38.0	0.013	2.38
993	448.1960	11.971	Amino acids, peptides, and analogues	1.308	14.0	32.8	0.094	2.30
735	376.1745	20.361	Amino acids, peptides, and analogues	0.868	38.8	22.6	0.973	2.27
895	518.2017	22.926	Amino acids, peptides, and analogues	0.794	66.1	37.3	0.310	2.26
911	500.1913	38.266	Amino acids, peptides, and analogues	0.452	73.0	102.0	0.220	2.26
317	392.1696	22.232	Amino acids, peptides, and analogues	1.386	49.7	54.2	0.062	2.23
869	518.2018	22.949	Amino acids, peptides, and analogues	0.794	67.6	37.2	0.320	2.22
157	597.3016	50.766	Amino acids, peptides, and analogues	0.672	33.1	33.2	0.541	2.21
1455	553.2957	48.975	Amino acids, peptides, and analogues	0.676	35.3	55.6	0.728	2.01
1436	466.2064	30.078	Amino acids, peptides, and analogues	1.067	56.7	54.4	0.526	2.01
1205	313.1032	3.697	Benzenoids	1.362	15.9	31.2	0.007	4.28
288	314.0650	6.357	Benzenoids	0.805	30.4	34.6	0.858	3.26
1300	166.0626	16.419	Benzenoids	0.532	54.6	41.2	0.020	2.06
164	150.0528	1.519	Carbohydrate derivate	1.04	21.3	24.7	0.549	2.79
865	418.1490	15.766	Carbohydrate derivate	0.837	25.3	33.3	0.020	2.48
813	630.2188	30.032	Carbohydrate derivate	0.806	43.6	50.1	0.192	2.47

1360	180.0632	11.21	Carbohydrate derivate	0.804	50.6	43.4	0.539	2.38
870	148.0365	2.757	Carbohydrate derivate	0.755	34.5	27.0	0.044	2.37
1169	238.0690	1.531	Carbohydrate derivate	1.034	17.9	24.4	0.852	2.29
226	196.0584	1.511	Carbohydrate derivate	1.088	26.3	29.2	0.186	2.22
734	180.0631	11.353	Carbohydrate derivate	0.84	60.5	44.9	0.957	2.07
11	192.0269	2.025	Carbohydrate derivate	0.755	25.9	28.0	0.119	2.06
875	130.0260	2.859	Carbohydrate derivate	0.917	32.2	26.9	0.801	2.03
1719	332.2573	47.904	Fatty acids	0.866	18.2	14.3	0.027	3.94
1657	292.2048	48.343	Fatty acids	0.943	40.0	52.0	0.512	3.36
74	280.2408	50.335	Fatty acids	0.718	36.1	24.0	0.008	3.06
1141	298.2516	48.684	Fatty acids	0.804	24.6	24.7	0.030	2.95
1715	266.2255	49.809	Fatty acids	0.527	46.6	28.3	0.003	2.48
1725	214.1571	47.44	Fatty acids	0.588	77.0	48.5	0.744	2.23
432	130.0258	3.088	Fatty acyls	0.822	13.8	23.5	0.008	2.94
140	314.0651	11.022	Fatty acyls	0.953	26.3	33.3	0.510	2.92
1669	292.2049	48.167	Fatty acyls	0.644	93.9	73.3	0.448	2.85
814	418.1489	15.722	Fatty acyls	0.808	24.5	36.3	0.023	2.72
109	282.2562	51.284	Fatty acyls	1.117	41.2	45.5	0.983	2.35
410	294.2205	48.516	Fatty acyls	0.527	67.9	68.2	0.609	2.31
393	748.2735	37.369	Fatty acyls	0.886	22.0	21.1	0.665	2.29
1452	144.0419	4.081	Fatty acyls	0.652	35.3	31.7	0.008	2.15
842	436.1515	13.285	Flavanoids	0.663	32.7	31.7	0.202	4.36
1291	408.1199	15.890	Flavanoids	0.673	23.3	25.8	0.001	3.88
1465	612.1717	30.246	Flavanoids	0.721	45.8	36.6	0.540	3.82
1180	410.1361	16.662	Flavanoids	0.52	84.8	41.0	0.093	3.60
253	772.2461	25.927	Flavanoids	0.781	34.1	17.4	0.344	3.41
1124	422.0994	17.651	Flavanoids	0.817	23.7	31.6	0.266	3.17
1531	468.1286	23.679	Flavanoids	0.729	39.1	23.4	0.177	3.10
956	382.1405	22.242	Flavanoids	1.228	39.3	49.5	0.273	2.85
882	490.1127	33.872	Flavanoids	0.805	34.6	27.7	0.368	2.82
1251	916.2892	29.735	Flavanoids	0.73	65.1	48.9	0.757	2.67
1320	406.1772	31.592	Flavanoids	0.884	26.2	15.3	0.045	2.65
1444	634.1926	32.191	Flavanoids	0.774	67.6	38.6	0.141	2.48
881	490.1128	34.061	Flavanoids	0.847	32.1	23.5	0.475	2.35
1582	436.2243	47.546	Flavanoids	1.161	29.8	49.3	0.574	2.29
1526	564.1860	36.880	Flavanoids	0.888	16.1	21.9	0.167	2.28
1602	286.0850	37.954	Flavanoids	0.8	19.5	33.2	0.331	2.23
1379	490.1129	30.387	Flavanoids	0.897	32.1	26.2	0.339	2.21
878	490.1129	33.932	Flavanoids	0.877	32.2	27.4	0.607	2.17
898	662.1642	20.724	Flavanoids	0.896	21.3	28.6	0.318	2.16
888	532.1239	24.221	Flavanoids	0.904	26.8	22.0	0.028	2.13
76	594.1976	37.958	Flavanoids	0.817	18.4	33.9	0.465	2.08
873	532.1238	24.176	Flavanoids	0.895	30.1	23.2	0.034	2.04
1015	801.5918	50.334	Glycerophospholipids	0.72	43.2	35.2	0.112	3.11
1128	1820.9711	47.335	Glycerophospholipids	0.518	40.4	56.1	0.646	2.72

187	521.2771	49.544	Glycerophospholipids	0.804	34.3	38.7	0.565	2.59
1615	495.2612	49.244	Glycerophospholipids	0.73	34.0	36.6	0.117	2.45
1153	246.0509	1.515	Glycerophospholipids	1.236	29.6	44.3	0.083	2.29
3	192.0269	1.862	Organic acids and derivates	0.802	31.6	31.3	0.342	3.51
324	174.0162	2.073	Organic acids and derivates	0.9	24.8	23.9	0.285	3.02
185	206.0430	4.068	Organic acids and derivates	0.613	36.5	26.7	0.011	2.95
1567	322.1639	27.739	Organic acids and derivates	0.794	37.2	28.2	0.744	2.77
258	210.0375	1.529	Organic acids and derivates	0.939	24.5	24.4	0.780	2.70
240	206.0429	4.198	Organic acids and derivates	0.647	29.7	19.7	0.001	2.38
1107	144.0416	4.367	Organic acids and derivates	0.704	36.9	16.5	0.009	2.34
1111	144.0417	4.329	Organic acids and derivates	0.651	28.8	20.9	0.001	2.18
51	174.0161	1.758	Organic acids and derivates	0.762	15.4	23.6	0.004	2.10
1543	330.0964	3.908	Phenolic glycosides	0.866	46.9	22.7	0.852	2.28
540	356.0754	9.573	Phenolic glycosides	0.775	27.0	34.6	0.183	2.12
699	356.0755	12.21	Phenolic glycosides	0.58	39.6	36.5	0.035	2.01
296	356.0752	9.812	Phenolic glycosides	0.724	23.3	34.2	0.074	2.11
357	314.0651	6.300	Phenolic glycosides	0.812	28.9	32.0	0.853	2.11
966	342.0961	10.252	Phenolic glycosides	0.782	31.0	36.4	0.061	2.04
1489	472.1596	32.815	Phenylpropanoids derivates	0.796	36.3	44.4	0.888	4.02
534	356.0754	9.627	Phenylpropanoids derivates	0.681	27.9	34.6	0.051	3.79
1405	580.2180	30.26	Phenylpropanoids derivates	0.555	40.1	17.1	0.001	3.75
390	386.0860	12.168	Phenylpropanoids derivates	0.895	30.5	30.0	0.647	3.20
431	386.0861	14.851	Phenylpropanoids derivates	0.72	32.1	27.1	0.112	3.10
306	386.0862	12.215	Phenylpropanoids derivates	0.779	36.6	37.8	0.379	2.98
609	356.0755	8.768	Phenylpropanoids derivates	0.782	38.3	47.8	0.337	2.94
509	356.0754	8.824	Phenylpropanoids derivates	0.715	36.4	36.9	0.167	2.77
128	386.1224	17.653	Phenylpropanoids derivates	0.941	24.9	30.7	0.660	2.58
1024	370.0912	15.007	Phenylpropanoids derivates	0.895	33.8	45.6	0.945	2.57
203	386.0862	14.926	Phenylpropanoids derivates	0.704	29.3	20.6	0.012	2.55
1277	694.2137	44.607	Phenylpropanoids derivates	0.623	45.0	35.8	0.013	2.35
1132	296.0541	20.397	Phenylpropanoids derivates	0.73	30.6	26.6	0.237	2.33
1209	296.0541	9.081	Phenylpropanoids derivates	0.783	32.9	28.3	0.372	2.26
1278	296.0541	8.951	Phenylpropanoids derivates	0.788	35.1	23.6	0.342	2.20
867	324.0854	13.695	Phenylpropanoids derivates	0.878	24.8	30.9	0.729	2.19
1043	338.0654	12.908	Phenylpropanoids derivates	0.616	29.4	38.3	0.046	2.12
1194	296.0541	9.000	Phenylpropanoids derivates	0.863	31.9	32.0	0.752	2.11
1158	338.0649	13.202	Phenylpropanoids derivates	0.731	31.8	41.8	0.695	2.02
438	400.1747	13.282	Terpenoids	0.798	20.3	28.0	0.565	3.61
152	596.2993	50.473	Terpenoids	0.767	42.9	41.6	0.270	2.63
1610	716.3781	49.175	Terpenoids	0.721	30.8	22.3	0.009	2.49
1525	394.2863	51.067	Terpenoids	1.063	12.0	9.8	0.027	2.12

¹Retention time expressed as minutes ²Tentative compound family, excluding heavy metals and halogens and best matching compound using METLIN, LIPID MAPS and KEGG databases. ³Coefficient obtained by dividing conventional and organic (Conv) / (Org) areas. ⁴Metabolite identified according to the Human Metabolome Data Base (HMDB) and METLIN.

Supplementary Table 3. Model Statistics Partial Least Squares Discriminant Analysis given by the outer loop in the double cross validation

	OUTER LOOP	k-fold V2_001	k-fold CV2_002	k-fold CV2_003	k-fold CV2_004
Calibration					
Conventional	Sensitivity (%)	100	100	100	100
	Specificity (%)	100	100	100	100
Organic	Sensitivity (%)	100	100	100	100
	Specificity (%)	100	100	100	100
	RMSEc	0,06	0,10	0,10	0,09
	R ²	0,99	0,96	0,96	0,97
Internal cross-validation					
Conventional	Sensitivity (%)	100	100	100	100
	Specificity (%)	100	100	100	100
Organic	Sensitivity (%)	100	100	100	100
	Specificity (%)	100	100	100	100
	RMSEcv	0,16	0,26	0,20	0,17
	R ²	0,90	0,77	0,85	0,89
External cross-validation					
Conventional	Sensitivity (%)	100	100	100	100
	Specificity (%)	100	100	100	100
Organic	Sensitivity (%)	100	100	100	100
	Specificity (%)	100	100	100	100
	RMSEp	0,16	0,23	0,23	0,23
	R ²	0,96	0,95	0,89	0,81
Permutation tests ¹	RMSEC	0,004	0,008	0,006	0,010
	RMSECV	0,006	0,014	0,010	0,006

The number of Latent variables was selected according to the inner loop (4 latent variables). ¹p-value given by the Pairwise Wilcoxon signed rank test. RMSEc=Root mean square error of calibration. RMSEcv=Root mean square error of cross validation. RMSEp=Root mean square error of prediction

Capítulo 4

Industria auxiliar ecológica

Capítulo 4. Industria auxiliar agroecológica: los fertilizantes

La demanda de alimentos ecológicos ha aumentado constantemente a lo largo de los años. Los costes de producción y, por tanto, los precios finales y son más altos que los equivalentes productos convencionales. Este mayor precio ha provocado una expansión del número de agricultores ecológicos y todo ello hace aumentar los riesgos de prácticas fraudulentas en la producción o a lo largo de la cadena alimentaria. La agricultura ecológica prohíbe los fertilizantes y fitosanitarios de síntesis y se basa en principios como la reducción de incorporar “inputs” (fertilizantes) externos. Pese a las buenas intenciones del sector productivo, este principio es difícil de llevar a cabo en regiones semi-áridas o áridas en los que la cantidad de materia orgánica necesaria y el agua escasean como es el caso de la agricultura ecológica intensiva bajo plástico que se desarrolla en Almería. Por lo tanto, estos agricultores ecológicos son extraordinariamente dependientes del uso de fertilizantes ecológicos. Las diferencias en las composiciones de $\delta^{15}\text{N}$ de fertilizantes sintéticos y ecológicos se reflejan en los valores de $\delta^{15}\text{N}$ de los productos cultivados con ellos pudiendo ser utilizada para diferenciar la producción ecológica. Debido a este hecho, se ha considerado importante profundizar en el estudio de la firma isotópica $\delta^{15}\text{N}$ (‰) de los insumos en general y más específicamente en aquellos aprobados en agricultura ecológica. El objetivo de este documento es proporcionar una revisión actualizada de las firmas isotópicas de los fertilizantes utilizados en la agricultura ecológica intensiva, incluidos los nuevos tipos de fertilizantes como son algunos micronutrientes (fertilizantes quelados) y fertilizantes con proteínas hidrolizadas utilizados en la agricultura ecológica cuyos valores de $\delta^{15}\text{N}$ son una incógnita para el sector.

Publicación 6

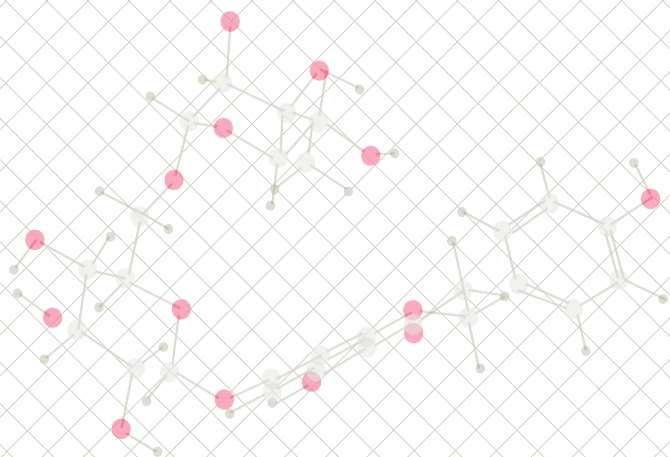
An update of isotopic fertilizer databases used in intensive organic farming. Case study: hydrolyzed protein and chelated nutrients

Francisco J. Cuevas, José C. Montenegro, José M. Moreno-Rojas

Enviado: Food Control

Q1: 12/133 (JCR-ISI, Food Science & Technology, 2017)

Impact Factor: 3.667



Capítulo 5

La autenticación del cerdo ibérico

Sección B. La autenticación en el cerdo ibérico

La producción del cerdo ibérico en extensivo es un sistema ganadero que proporciona unas calidades excepcionales a sus productos cárnicos y da lugar a productos de alto valor añadido. Desafortunadamente, este sector no cuenta con ninguna técnica analítica que le permita asegurar que la producción ganadera ha seguido la normativa actual (RD 4/2014). Tradicionalmente, la autenticación del cerdo ibérico ha sido un tema recurrente para el campo de la trazabilidad de los alimentos. La diferencia de calidad encontrada en los productos derivados del cerdo ibérico de bellota está basada en el incremento de ácidos grasos mono-insaturados que afectan a la calidad aromática y sensorial final que los consumidores perciben. Esta idea ha hecho que la comunidad científica enfocara los esfuerzos dirigidos a la trazabilidad sobre la parte grasa del animal. Y para ello, se han utilizado una gran cantidad de técnicas analíticas (triglicéridos, ácidos grasos, fosfolípidos, etc.) sin conseguir resultados concluyentes que permita diferenciarlos. De entre las técnicas utilizadas, se ha demostrado que el uso de isótopos estables es una de las técnicas más prometedoras para este tipo de estudios, comprobándose que el uso de isótopos estables en diferentes órganos y fracciones bioquímicas pueden aportar información complementaria mejorando definitivamente los modelos discriminatorios realizados hasta la fecha. Por ello, en esta sección, se desarrolla el último de los objetivos de la presente Tesis Doctoral. Para tal fin, se analizaron animales pertenecientes a las actuales categorías alimentarias de la normativa. A su vez, se separaron las fracciones lipídicas y no lipídicas de los órganos estudiados (hígado, riñón y lomo) por primera vez en el cerdo ibérico para verificar la información isotópica de las fracciones de los órganos. Y además se analizaron las relaciones isotópicas de los isótopos del carbono y del nitrógeno. Asimismo, se utilizaron técnicas avanzadas de análisis de datos para obtener un modelo que nos permitiese conseguir los objetivos planteados.

Publicación 7

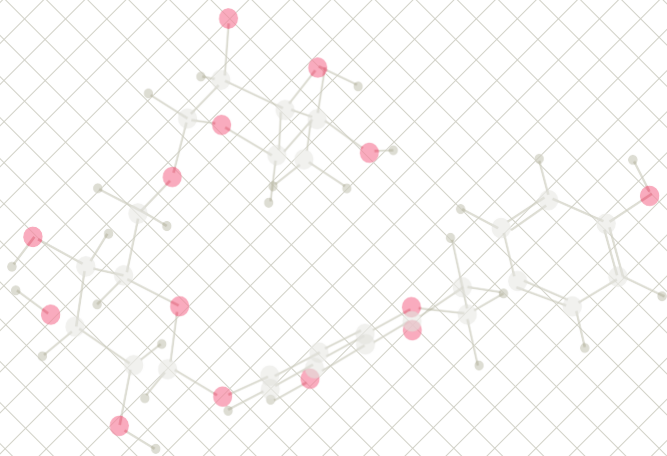
The use of stable isotope signatures ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) from different organs to authenticate the Iberian pig carcass based on the feeding regime

Francisco J. Cuevas, José M. Moreno Rojas

Enviado: Food chemistry

Q1: 7/133 (JCR-ISI, Food Science & Technology, 2017)

Impact Factor: 4.946





Conclusiones



A continuación, se enumeran las principales conclusiones obtenidas en la presente tesis doctoral, de acuerdo a los objetivos inicialmente propuestos:

- 1.- De las ciruelas estudiadas, las producidas en ecológico, incrementaron su contenido de capacidad antioxidante, polifenoles totales, antocianinas totales, y varios ácidos orgánicos. Además, otros factores como el año y la variedad afectaron significativamente a las variables estudiadas.
- 2.- La evaluación del perfil volátil de las ciruelas puso de manifiesto que, como cabía esperar, el factor genético fue el principal responsable de la variabilidad encontrada, sin embargo, este estudio nos permitió concluir que el manejo ecológico disminuyó la concentración de diferentes compuestos entre otros, algunos mayoritarios como el hexanal. Este estudio puso de manifiesto la identificación de nuevos compuestos volátiles en diferentes variedades de ciruela, algunas de las cuales no se habían caracterizado hasta la fecha. Además, el enfoque quimiométrico permitió la identificación de potenciales marcadores varietales.
- 3.- Tras la evaluación del perfil volátil de las naranjas estudiadas se concluyó que el manejo del cultivo afectaba de manera significativa a determinados compuestos encontrados. Este trabajo es el primer estudio comparativo del perfil volátil de la naranja entre manejos agrícolas. En las frutas bajo manejo ecológico disminuyó el contenido de ésteres y potenció el de determinados terpenoides, lo cual, podría contribuir a la percepción sensorial de los productos. Se desarrolló un modelo capaz de clasificar las naranjas según su modo de producción y se determinaron por primera vez potenciales marcadores volátiles asociados al manejo.
- 4.- La evaluación de los parámetros fisicoquímicos, el perfil fenólico y el uso de isótopos estables de las partes comestibles y no comestibles de las naranjas nos permitió crear una plataforma analítica capaz de clasificar correctamente las muestras en función del manejo seguido (ecológico o convencional). En este estudio, se destaca el importante peso de la

información que aporta el albedo en ambas técnicas (perfil fenólico e isótopos estables) para la discriminación. Por tanto, los resultados destacan el potencial de discriminación que las técnicas de fusión de datos ofrecen y abren nuevas perspectivas analíticas que pueden utilizarse para la autentificación de productos ecológicos.

- 5.- Se utilizó por primera vez la evaluación del perfil metabolómico, perfil volátil y el uso de quimometría para autentificar zumos premium de naranja. La utilización de diferentes técnicas de fusión de datos en conjunto con PLS-DA mejoró el poder discriminante de los modelos individuales consiguiendo un 100% de sensibilidad y especificidad. El nivel medio de fusión de datos demostró ser una aproximación apropiada para la autentificación de este producto. Por tanto, este estudio enfatiza el uso de nuevas plataformas analíticas multidisciplinares para resolver autentificaciones complejas en producto transformado de alto valor añadido.

- 6.- El estudio de caracterización de los fertilizantes ecológicos utilizados en agricultura puso de manifiesto la diversidad de firmas isotópicas del nitrógeno que éstos presentan. Esta investigación identificó una importante cantidad de fertilizantes ecológicos nuevos derivados de hidrolizados de proteínas y aminoácidos y que poseen una firma isotópica diversa. Por otro lado, algunos micronutrientes y fertilizantes quelatados contienen una cantidad elevada de nitrógeno, así como una firma isotópica muy diferente a las encontradas en otros fertilizantes ecológicos. Por lo tanto, se requiere una investigación más profunda de estos nuevos fertilizantes, así como su impacto en los productos ecológicos, con el fin de validar la técnica de isótopos estables como herramienta de autentificación en agricultura ecológica.

- 7.- La utilización de los isótopos estables del nitrógeno y del carbono en el cerdo ibérico, demostró su potencial discriminante para diferenciar la alimentación utilizada durante el cebo del animal. Como novedad, las determinaciones se realizaron en las fracciones lipídica y no lipídica de

determinados órganos del animal. En este estudio, se desarrollaron modelos quimiométricos basado en máquinas de soporte vectorial (SVM) y vecinos cercanos (k-NN) y finalmente se obtuvo un modelo que clasificó todas las muestras correctamente según el régimen alimenticio seguido por los animales. En conclusión, esta investigación supone el primer estudio exhaustivo basado en isótopos estables y quimiometría que consigue clasificar correctamente las categorías conforme a la nueva legislación vigente (Real Decreto nº 4/2014).



Conclusions



The main conclusions obtained in this doctoral thesis are listed below and they are according to the objectives initially proposed:

- 1.- The antioxidant capacity, the total polyphenols, the total anthocianins, and some organic acids of plums increased under an organic management regarding the plums studied. In addition, other factors such as year and the variety affected notably the variables studied.
- 2.- The evaluation of the volatile profile of plums showed that, as expected, the genetic factor was the main responsible for the variability found. However, this study allowed us to conclude that the organic management decreased the concentration of different compounds among others, some majorities volatile compound, such as the hexanal. This study revealed the identification of new volatile compounds in different varieties of plum, some of which had not been characterized to date. In addition, the chemometric approach allowed the identification of potential markers.
- 3.- The evaluation of the volatile profile of oranges studied, it was concluded that the organic management notably affected certain volatile compounds. This is the first time that a comparative study dealing with farming systems in oranges. The organic management reduced the content of esters and increased some terpenoids which could contribute to their sensory perceptions. A model was developed able to classify oranges according to their agricultural management and potential markers associated to the management were identified for the first time.
- 4.- The evaluation of the physicochemical parameters, the phenolic profile and the stable isotopes in the edible and non-edible parts allowed us to create an analytical platform able to classify correctly the samples according to the management followed (organic or conventional). This study highlighted the important information provided by the albedo in both techniques (phenolic profile and stable isotope analysis) for the discrimination of the organic oranges. Therefore, the results highlight the discrimination power that data fusion techniques offer and open up new analytical perspectives that can be used for the authentication of organic foodstuffs.

- 5.- The evaluation of the metabolomic profile, volatile profiles and chemometrics were used for the first time to authenticate premium oranges juices. The use of different data fusion techniques coupled to PLS-DA improved the discriminant power of the individual models, achieving 100% of sensitivity and specificity. The Mid-level data fusion approach proved to be an appropriate approach for the authentication of these products. Therefore, this study emphasizes the use of multidisciplinary analytical platforms to solve complex authentication purposes in high-added processed foodstuffs.
- 6.- The characterization of the organic fertilizers used in agriculture revealed diverse isotopic nitrogen signatures. This research identified a significant amount of new organic fertilizers derived from such hydrolyzed proteins and amino acids that showed diverse isotopic signatures. Otherwise, some micronutrients and chelated fertilizers contain high amount of nitrogen, as well as, diverse isotopic fingerprints compared to the organic fertilizers. Therefore, a deeper research of these new fertilizers and their impact on the final organic foodstuffs are required to validate the use of stable nitrogen isotope as a reliable authentication tool in organic farming.
- 7.- The determination of stable isotopes of nitrogen and carbon showed their potential as discriminant potential according to the feeding regime followed by the animals. This is the first that the isotopic determinations are made in the lipid and free-lipid fractions of certain organs of the Iberian pigs. In this study developed chemometric models based on vector support machines (SVM) and k-nearest neighbors (k-NN) were developed and finally a model was obtained that classified all the samples correctly according to the diet followed by the animals. In conclusion, this research is the first comprehensive study based on stable isotopes and chemometrics that successfully classifies the categories according to the new legislation in force (Royal Decree nº 4/2014).



Bibliografía



1. Abad-García, B., Berrueta, L. A., Garmón-Lobato, S., Urkaregi, A., Gallo, B., & Vicente, F. (2012). Chemometric characterization of fruit juices from Spanish cultivars according to their phenolic compound contents: I. citrus fruits. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(14), 3635-3644.
2. ABC Sevilla (2018) https://sevilla.abc.es/economia/sevi-nuevo-protocolo-inspeccion-iberico-encarece-gestion-ganadera-201807300813_noticia.html
3. Abrodo, P. A., Llorente, D. D., Corujedo, S. J., de la Fuente, E. D., Álvarez, M. D. G., & Gomis, D. B. (2010). Characterisation of Asturian cider apples on the basis of their aromatic profile by high-speed gas chromatography and solid-phase microextraction. *Food chemistry*, 121(4), 1312-1318.
4. addition of fructose and glucose using near-infrared transreflectance spectroscopy.
5. AIJN Informe de 2018. <http://www.aijn.org/files/default/aijn-fjm-report-final-digital.pdf>
6. Alonso-Salces, R. M., Héberger, K., Holland, M. V., Moreno-Rojas, J. M., Mariani, C., Bellan, G., ... & Guillou, C. (2010a). Multivariate analysis of NMR fingerprint of the unsaponifiable fraction of virgin olive oils for authentication purposes. *Food Chemistry*, 118(4), 956-965.
7. Alonso-Salces, R. M., Moreno-Rojas, J. M., Holland, M. V., Reniero, F., Guillou, C., & Héberger, K. (2010b). Virgin olive oil authentication by multivariate analyses of ¹H NMR fingerprints and $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{2}\text{H}$ data. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(9), 5586-5596.
8. Altman, D. G., & Bland, J. M. (1994). Diagnostic tests. 1: Sensitivity and specificity. *BMJ: British Medical Journal*, 308(6943), 1552.
9. Angerosa, F., Servili, M., Selvaggini, R., Taticchi, A., Esposto, S., & Montedoro, G. (2004). Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality. *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2), 17-31.
10. Aparicio, R., & Aparicio-Ruíz, R. (2000). Authentication of vegetable oils by chromatographic techniques. *Journal of Chromatography A*, 881(1-2), 93-104.
11. application of multi-element and multi-isotope analysis, *Trends Food Sci. Tech.*

12. Araghipour, N., Colineau, J., Koot, A., Akkermans, W., Rojas, J. M. M., Beauchamp, J., ... & Mannina, L. (2008). Geographical origin classification of olive oils by PTR-MS. *Food Chemistry*, *108*(1), 374-383.
13. Arce, L., Domínguez-Vidal, A., Rodríguez-Estévez, V., López-Vidal, S., Ayora-Cañada, M. J., & Valcárcel, M. (2009). Feasibility study on the use of infrared spectroscopy for the direct authentication of Iberian pig fattening diet. *Analytica chimica acta*, *636*(2), 183-189.
14. Asensio, L., González, I., García, T., & Martín, R. (2008). Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food control*, *19*(1), 1-8.
15. Aung, M. M., & Chang, Y. S. (2014). Traceability in a food supply chain: Safety and quality perspectives. *Food control*, *39*, 172-184.
16. Bajoub, A., Medina-Rodríguez, S., Gómez-Romero, M., Bagur-González, M. G., Fernández-Gutiérrez, A., & Carrasco-Pancorbo, A. (2017). Assessing the varietal origin of extra-virgin olive oil using liquid chromatography fingerprints of phenolic compound, data fusion and chemometrics. *Food chemistry*, *215*, 245-255.
17. Baker, M. (2017). "Check your chemistry." *Nature* 548: 485.
18. Barański, M., Rempelos, L., Iversen, P. O., & Leifert, C. (2017). Effects of organic food consumption on human health; the jury is still out!. *Food & nutrition research*, *61*(1), 1287333.
19. Barański, M., Średnicka-Tober, D., Volakakis, N., Seal, C., Sanderson, R., Stewart, G. B., ... & Gromadzka-Ostrowska, J. (2014). Higher antioxidant and lower cadmium concentrations and lower incidence of pesticide residues in organically grown crops: a systematic literature review and meta-analyses. *British Journal of Nutrition*, *112*(5), 794-811.
20. Barbaste, M., Medina, B., Sarabia, L., Ortiz, M. C., & Pérez-Trujillo, J. P. (2002). Analysis and comparison of SIMCA models for denominations of origin of wines from de Canary Islands (Spain) builds by means of their trace and ultratrace metals content. *Analytica Chimica Acta*, *472*(1-2), 161-174.
21. Barker, A. V., & Pilbeam, D. J. (2015). Nitrogen, chapter 2. *Handbook of plant nutrition*. CRC press.

22. Bateman, A. S., & Kelly, S. D. (2007). Fertilizer nitrogen isotope signatures. *Isotopes in environmental and health studies*, 43(3), 237-247.
23. Bateman, A. S., Kelly, S. D., & Jickells, T. D. (2005). Nitrogen isotope relationships between crops and fertilizer: implications for using nitrogen isotope analysis as an indicator of agricultural regime. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(14), 5760-5765.
24. Baudry, J., Debrauwer, L., Durand, G., Limon, G., Delcambre, A., Vidal, R., ... & Lairon, D. (2018). Urinary pesticide concentrations in French adults with low and high organic food consumption: results from the general population-based NutriNet-Santé. *Journal of exposure science & environmental epidemiology*, 1.
25. Baudry, J., Debrauwer, L., Durand, G., Limon, G., Delcambre, A., Vidal, R., ... & Lairon, D. (2018). Urinary pesticide concentrations in French adults with low and high organic food consumption: results from the general population-based NutriNet-Santé. *Journal of exposure science & environmental epidemiology*, 1.
26. Baxter, M. J., Crews, H. M., Dennis, M. J., Goodall, I., & Anderson, D. (1997). The determination of the authenticity of wine from its trace element composition. *Food Chemistry*, 60(3), 443-450.
27. Bensaid, F. F., Wietzerbin, K., & Martin, G. J. (2002). Authentication of natural vanilla flavorings: isotopic characterization using degradation of vanillin into guaiacol. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(22), 6271-6275.
28. Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.
29. Berlioz, B., Cordella, C., Cavalli, J.F., Lizzani-Cuvelier, L., Loiseau, A.M. and Fernandez, X. (2006) Comparison of the amounts of volatile compounds in French protected designation of origin virgin olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 10092-101.
30. Berrueta, L. A., Alonso-Salces, R. M., & Héberger, K. (2007). Supervised pattern recognition in food analysis. *Journal of chromatography A*, 1158(1-2), 196-214.

31. Biancolillo, A., Bucci, R., Magrì, A. L., Magrì, A. D., & Marini, F. (2014). Data-fusion for multiplatform characterization of an Italian craft beer aimed at its authentication. *Analytica chimica acta*, *820*, 23-31.
32. Borràs, E., Ferré, J., Boqué, R., Mestres, M., Aceña, L., & Busto, O. (2015). Data fusion methodologies for food and beverage authentication and quality assessment—A review. *Analytica Chimica Acta*, *891*, 1-14.
33. Borràs, E., Ferré, J., Boqué, R., Mestres, M., Aceña, L., Calvo, A., & Busto, O. (2016). Olive oil sensory defects classification with data fusion of instrumental techniques and multivariate analysis (PLS-DA). *Food chemistry*, *203*, 314-322.
34. Bortoleto, G. G., De Nadai Fernandes, E. A., Tagliaferro, F. S., Ferrari, A. A., & Bueno, M. I. (2008). Potential of X-ray spectrometry and chemometrics to discriminate organic from conventional grown agricultural products.
35. Bourn, D., & Prescott, J. (2002). A comparison of the nutritional value, sensory qualities, and food safety of organically and conventionally produced foods. *Critical reviews in food science and nutrition*, *42*(1), 1-34.
36. Bowen, G. J., Winter, D. A., Spero, H. J., Zierenberg, R. A., Reeder, M. D., Cerling, T. E., & Ehleringer, J. R. (2005). Stable hydrogen and oxygen isotope ratios of bottled waters of the world. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry*, *19*(23), 3442-3450.
37. Bradman, A., Quirós-Alcalá, L., Castorina, R., Schall, R. A., Camacho, J., Holland, N. T., ... & Eskenazi, B. (2015). Effect of organic diet intervention on pesticide exposures in young children living in low-income urban and agricultural communities. *Environmental health perspectives*, *123*(10), 1086.
38. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, *28*(1), 25-30.
39. Brandt, K., & Mølgaard, J. P. (2001). Organic agriculture: does it enhance or reduce the nutritional value of plant foods?. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *81*(9), 924-931.

40. Brantsæter, A. L., Ydersbond, T. A., Hoppin, J. A., Haugen, M., & Meltzer, H. M. (2017). Organic food in the diet: exposure and health implications. *Annual review of public health, 38*, 295-313.
41. Brat, P., Rega, B., Alter, P., Reynes, M., & Brillouet, J. M. (2003). Distribution of volatile compounds in the pulp, cloud, and serum of freshly squeezed orange juice. *Journal of agricultural and food chemistry, 51*(11), 3442-3447.
42. Brereton, R. G. (2011). One-class classifiers. *Journal of Chemometrics, 25*(5), 225-246.
43. Bro, R., & Smilde, A. K. (2014). Principal component analysis. *Analytical Methods, 6*(9), 2812-2831.
44. Bucci, R., Magrí, A. D., Magrí, A. L., Marini, D., & Marini, F. (2002). Chemical authentication of extra virgin olive oil varieties by supervised chemometric procedures. *Journal of agricultural and food chemistry, 50*(3), 413-418.
45. Camin, F., Boner, M., Bontempo, L., Fauhl-Hassek, C., Kelly, S. D., Riedl, J., & Rossmann, A. (2017). Stable isotope techniques for verifying the declared geographical origin of food in legal cases. *Trends in food science & technology, 61*, 176-187.
46. Camin, F., Larcher, R., Perini, M., Bontempo, L., Bertoldi, D., Gagliano, G., ... & Versini, G. (2010). Characterisation of authentic Italian extra-virgin olive oils by stable isotope ratios of C, O and H and mineral composition. *Food chemistry, 118*(4), 901-909.
47. Camin, F., Perini, M., Bontempo, L., Fabroni, S., Faedi, W., Magnani, S., ... & Rossmann, A. (2011). Potential isotopic and chemical markers for characterising organic fruits. *Food Chemistry, 125*(3), 1072-1082.
48. Capuano, E., Boerrigter-Eenling, R., van der Veer, G., & van Ruth, S. M. (2013). Analytical authentication of organic products: an overview of markers. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 93*(1), 12-28.
49. Carrapiso, A. I., Jurado, A., Martin, L., & Garcia, C. (2007). The duration of the outdoor rearing period of pigs influences Iberian ham characteristics. *Irish Journal of Agricultural and Food Research, 105*-115.

50. Castillo, S., Gopalacharyulu, P., Yetukuri, L., & Orešič, M. (2011). Algorithms and tools for the preprocessing of LC–MS metabolomics data. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, *108*(1), 23-32.
51. Cava, R., Ruiz, J., López-Bote, C., Martín, L., García, C., Ventanas, J., & Antequera, T. (1997). Influence of finishing diet on fatty acid profiles of intramuscular lipids, triglycerides and phospholipids in muscles of the Iberian pig. *Meat Science*, *45*(2), 263-270.
52. Cerri, J., Thøgersen, J., & Testa, F. (2019). Social desirability and sustainable food research: A systematic literature review. *Food Quality and Preference*, *71*, 136-140.
53. Cevallos-Cevallos, J. M., Reyes-De-Corcuera, J. I., Etxeberria, E., Danyluk, M. D., & Rodrick, G. E. (2009). Metabolomic analysis in food science: a review. *Trends in Food Science & Technology*, *20*(11-12), 557-566.
54. Chambery, A., del Monaco, G., Di Maro, A., & Parente, A. (2009). Peptide fingerprint of high quality Campania white wines by MALDI-TOF mass spectrometry. *Food chemistry*, *113*(4), 1283-1289.
55. Chem. 40 (2012) 38–51.
56. Choi, W. J., Kwak, J. H., Lim, S. S., Park, H. J., Chang, S. X., Lee, S. M., ... & Kim, H. Y. (2017). Synthetic fertilizer and livestock manure differently affect $\delta^{15}\text{N}$ in the agricultural landscape: a review. *Agriculture, ecosystems & environment*, *237*, 1-15.
57. Chudzinska, M., & Baralkiewicz, D. (2010). Estimation of honey authenticity by multielements characteristics using inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) combined with chemometrics. *Food and Chemical Toxicology*, *48*(1), 284-290.
58. Chudzinska, M., & Baralkiewicz, D. (2011). Application of ICP-MS method of determination of 15 elements in honey with chemometric approach for the verification of their authenticity. *Food and Chemical Toxicology*, *49*(11), 2741-2749.
59. Cirlini, M., Caligiani, A., Palla, L., & Palla, G. (2011). HS-SPME/GC–MS and chemometrics for the classification of Balsamic Vinegars of Modena of different maturation and ageing. *Food chemistry*, *124*(4), 1678-1683.

60. Clark, M. S., Horwath, W. R., Shennan, C., & Scow, K. M. (1998). Changes in soil chemical properties resulting from organic and low-input farming practices. *Agronomy Journal*, *90*(5), 662-671.
61. Codex procedural manual (15th ed.) 2005 CAC. Retrieved from. In: ftp://ftp.fao.org/codex/Publications/ProcManuals/Manual_15e.pdf
62. Cody, R. B., Laramée, J. A., & Durst, H. D. (2005). Versatile new ion source for the analysis of materials in open air under ambient conditions. *Analytical chemistry*, *77*(8), 2297-2302.
63. Coetzee, P. P., Steffens, F. E., Eiselen, R. J., Augustyn, O. P., Balcaen, L., & Vanhaecke, F. (2005). Multi-element analysis of South African wines by ICP–MS and their classification according to geographical origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(13), 5060-5066.
64. Coetzee, P. P., Van Jaarsveld, F. P., & Vanhaecke, F. (2014). Intraregional classification of wine via ICP-MS elemental fingerprinting. *Food Chemistry*, *164*, 485-492.
65. Coletta, L. D., A. L. Pereira, A. A. D. Coelho, V. J. M. Savino, J. F. M. Menten, E. Correr, L. C. França and L. A. Martinelli. 2012. Barn vs. free-range chickens: Differences in their diets determined by stable isotopes. *Food Chemistry* *131*: 155–160.
66. Comisión Europea 2011. https://ec.europa.eu/agriculture/organic/sites/orgfarming/files/docs/body/controls-working-document-20110708_en.pdf
67. Cubero-Leon, E., De Rudder, O., & Maquet, A. (2018). Metabolomics for organic food authentication: Results from a long-term field study in carrots. *Food chemistry*, *239*, 760-770.
68. Cubero-Leon, E., Peñalver, R., & Maquet, A. (2014). Review on metabolomics for food authentication. *Food Research International*, *60*, 95-107.
69. Cuevas-Glory, L., Ortiz-Vázquez, E., Pino, J.A. and Sauri-Duch, E. (2012) Floral classification of Yucatan Peninsula honeys by PCA and HS-SPME/GC–MS of volatile compounds. *International Journal of Food Science and Technology*, *47*, 1378–83.
70. Curl, C. L., Beresford, S. A., Fenske, R. A., Fitzpatrick, A. L., Lu, C., Nettleton, J. A., & Kaufman, J. D. (2015). Estimating pesticide exposure from dietary

- intake and organic food choices: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Environmental health perspectives*, 123(5), 475.
71. Curl, C. L., Fenske, R. A., & Elgethun, K. (2003). Organophosphorus pesticide exposure of urban and suburban preschool children with organic and conventional diets. *Environmental health perspectives*, 111(3), 377.
72. D'Amico, M., Di Vita, G., Monaco, L., 2016. Exploring environmental consciousness and consumer preferences for organic wines without sulfites. *J. Clean. Prod.* 120, 64–71.
73. Dangour, A. D., Dodhia, S. K., Hayter, A., Allen, E., Lock, K., & Uauy, R. (2009). Nutritional quality of organic foods: a systematic review-. *The American journal of clinical nutrition*, 90(3), 680-685.
74. Daza, A., Camacho, M., Galindo, I., Arroyo, F. T., Casanova, L., & Santamaría, C. (2012). Comparative fruit quality parameters of several Japanese plum varieties in two newly established orchards, organic and conventionally managed. *International journal of food science & technology*, 47(2), 341-349.
75. Daza, A., Rey, A. I., Ruiz, J., & Lopez-Bote, C. J. (2005). Effects of feeding in free-range conditions or in confinement with different dietary MUFA/PUFA ratios and α -tocopheryl acetate, on antioxidants accumulation and oxidative stability in Iberian pigs. *Meat Science*, 69(1), 151-163.
76. De Pedro, E., Garrido, A., Bares, I., Casillas, M., & Murray, I. (1992). Application of near infrared spectroscopy for quality control of Iberian pork industry. *Near infrared spectroscopy bridging the gap between data analysis and NIR applications*, 345-348.
77. Decreto 166/2003 de 17 de junio, sobre la producción agroalimentaria ecológica en Andalucía.
78. Del Pulgar, J. S., Soukoulis, C., Carrapiso, A. I., Cappellin, L., Granitto, P., Aprea, E., ... & Biasioli, F. (2013). Effect of the pig rearing system on the final volatile profile of Iberian dry-cured ham as detected by PTR-ToF-MS. *Meat science*, 93(3), 420-428.
79. DelPulgar, J. S., Soukoulis, C., Carrapiso, A. I., Cappellin, L., Granitto, P., Aprea, E., ... & Biasioli, F. (2013). Effect of the pig rearing system on the final

- volatile profile of Iberian dry-cured ham as detected by PTR-ToF-MS. *Meat science*, 93(3), 420-428.
80. Derde, M. P., & Massart, D. L. (1986). UNEQ: a disjoint modelling technique for pattern recognition based on normal distribution. *Analytica Chimica Acta*, 184, 33-51.
81. determine the geographical origin of foods in the European Union, Trends Anal.
82. Di Rosa, A. R., Leone, F., Cheli, F., & Chiofalo, V. (2017). Fusion of electronic nose, electronic tongue and computer vision for animal source food authentication and quality assessment—A review. *Journal of Food Engineering*, 210, 62-75.
83. Di Stefano, V., Avellone, G., Bongiorno, D., Cunsolo, V., Muccilli, V., Sforza, S., ... & Vékey, K. (2012). Applications of liquid chromatography–mass spectrometry for food analysis. *Journal of Chromatography A*, 1259, 74-85.
84. Di, H. J., & Cameron, K. C. (2002). Nitrate leaching in temperate agroecosystems: sources, factors and mitigating strategies. *Nutrient cycling in agroecosystems*, 64(3), 237-256.
85. Díaz, I., Regueiro, J. G., Casillas, M., & De Pedro, E. (1996). Triglyceride composition of fresh ham fat from Iberian pigs produced with different systems of animal nutrition. *Food chemistry*, 55(4), 383-387.
86. Dieterle, F., Ross, A., Schlotterbeck, G., & Senn, H. (2006). Probabilistic quotient normalization as robust method to account for dilution of complex biological mixtures. Application in ¹H NMR metabonomics. *Analytical chemistry*, 78(13), 4281-4290.
87. Directiva 2001/112/CE del consejo de 20 de diciembre de 2001 relativa a los zumos de frutas y otros productos similares destinados a la alimentación humana
88. Downey , G. , Fouratier , V. and Kelly , J.D. (2003). Detection of honey adulteration by
89. Downey , G. and Flynn , S.J. (2002). Discrimination between virgin olive oils from Crete, the Peloponese and other Greek Islands using near-infrared transfl ectance spectroscopy . In: A.M.C. Davies and R.K. Cho (eds) , N ear-

- infrared Spectroscopy: Proceedings of the 10th International Conference .
Chichester : NIR Publications , pp. 239 – 241 .
90. Downey, G. (1998). Food and food ingredient authentication by mid-infrared spectroscopy and chemometrics. *TrAC trends in analytical chemistry*, 17(7), 418-424.
 91. El confidencial (2018a) https://www.elconfidencial.com/empresas/2018-10-18/enac-cerdo-iberico-carne-jamon-fraude-bellota_1631273/
 92. El confidencial (2018b) https://www.elconfidencial.com/espana/2018-01-14/la-guardia-civil-investiga-el-jamon-iberico-de-carrefour-por-fraude-en-la-distribucion_1505207/
 93. Elortondo, F. P., Ojeda, M., Albisu, M., Salmerón, J., Etayo, I., & Molina, M. (2007). Food quality certification: An approach for the development of accredited sensory evaluation methods. *Food quality and Preference*, 18(2), 425-439.
 94. Esslinger, S., Riedl, J., & Faulh-Hassek, C. (2014). Potential and limitations of non-targeted fingerprinting for authentication of food in official control. *Food Research International*, 60, 189-204.
 95. Esteki, M., Simal-Gandara, J., Shahsavari, Z., Zandbaaf, S., Dashtaki, E., & Vander Heyden, Y. (2018). A review on the application of chromatographic methods, coupled to chemometrics, for food authentication (Chromatography-chemometrics in food authentication). *Food control*.
 96. EXTENDA (2017) Agencia Andaluza de Promoción exterior. https://www.extenda.es/wp-content/uploads/2018/01/EXT_Hortofrut%C3%ADcola_2017publicado.pdf
 97. F. Augusto, C.A. Zini; Pawliszyn, J. (Ed.). (2002). *Sampling and sample preparation for field and laboratory: fundamentals and new directions in sample preparation* (Vol. 37). Elsevier.
 98. F. Longobardi, A. Ventrella, A. Bianco, L. Catucci, I. Cafagna, V. Gallo, et al., Non-targeted 1H NMR fingerprinting and multivariate statistical analyses for the characterisation of the geographical origin of Italian sweet cherries, *Food Chem.* 141 (3) (2013) 3028–3033.

99. Fageria, N. K., & Baligar, V. C. (2005). Enhancing nitrogen use efficiency in crop plants. *Advances in agronomy*, *88*, 97-185.
100. Faller, A. L. K., & Fialho, E. (2009). The antioxidant capacity and polyphenol content of organic and conventional retail vegetables after domestic cooking. *Food Research International*, *42*(1), 210-215.
101. FAO , OMS. (2003). Garantía de la inocuidad y calidad de los alimentos: directrices para el fortalecimiento de los sistemas nacionales de control de los alimentos.
102. Federal Bureau of Investigation. 2012. <https://archives.fbi.gov/archives/sanfrancisco/press-releases/2012/former-president-of-organic-fertilizer-company-pleads-guilty-to-fraud-in-connection-with-selling-synthetic-fertilizer-to-organic-farms>
103. Fernández-Cabanás, V. M., Garrido-Varo, A., Olmo, J. G., De Pedro, E., & Dardenne, P. (2007). Optimisation of the spectral pre-treatments used for Iberian pig fat NIR calibrations. *Chemometrics and Intelligent laboratory systems*, *87*(1), 104-112.
104. Flores, G., Del Castillo, M. L. R., Blanch, G. P., & Herraiz, M. (2006). Detection of the adulteration of olive oils by solid phase microextraction and multidimensional gas chromatography. *Food chemistry*, *97*(2), 336-342.
105. Flores, J., Biron, C., Izquierdo, L., & Nieto, P. (1988). Characterization of green hams from Iberian pigs by fast analysis of subcutaneous fat. *Meat Science*, *23*(4), 253-262.
106. Flores, P., Fenoll, J., & Hellín, P. (2007). The feasibility of using $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values for discriminating between conventionally and organically fertilized pepper (*Capsicum annum* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, *55*(14), 5740-5745.
107. Forster, D., Adamtey, N., Messmer, M. M., Pfiffner, L., Baker, B., Huber, B., & Niggli, U. (2013). Organic agriculture—driving innovations in crop research. In *Agricultural Sustainability* (pp. 21-46).
108. Fraser, K., Lane, G. A., Otter, D. E., Hemar, Y., Quek, S. Y., Harrison, S. J., & Rasmussen, S. (2013). Analysis of metabolic markers of tea origin by

- UHPLC and high resolution mass spectrometry. *Food research international*, 53(2), 827-835.
109. Freyer, H. D., & Aly, A. I. M. (1974). Nitrogen-15 Variations in Fertilizer Nitrogen 1. *Journal of Environmental Quality*, 3(4), 405-406.
110. Gabriel, D., Sait, S. M., Kunin, W. E., & Benton, T. G. (2013). Food production vs. biodiversity: comparing organic and conventional agriculture. *Journal of Applied Ecology*, 50(2), 355-364.
111. Gallardo, E., Narváez-Rivas, M., Pablos, F., Jurado, J. M., & León-Camacho, M. (2012). Subcutaneous fat triacylglycerols profile from Iberian pigs as a tool to differentiate between intensive and extensive fattening systems. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(7), 1645-1651.
112. Galle, S. A., Koot, A., Soukoulis, C., Cappellin, L., Biasioli, F., Alewijn, M., & van Ruth, S. M. (2011). Typicality and geographical origin markers of protected origin cheese from the Netherlands revealed by PTR-MS. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(6), 2554-2563.
113. García-Galavís, P. A., Santamaría, C., Jiménez-Bocanegra, J. A., Casanova, L., & Daza, A. (2009). Susceptibility of several Japanese plum cultivars to pests and diseases in a newly established organic orchard. *Scientia horticultrae*, 123(2), 210-216.
114. Garcia-Olmo, J., De Pedro, E., Garrido, A., Paredes, A., Sanabria, C., Santolalla, M., ... & Guirao, J. (2002). Determination of the precision of the fatty acid analysis of Iberian pig fat by gas chromatography. Results of a mini collaborative study. *Meat Science*, 60(1), 103-109.
115. García-Olmo, J., Garrido-Varo, A., & De Pedro, E. (2001). The transfer of fatty acid calibration equations using four sets of unsealed liquid standardisation samples. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 9(1), 49-62.
116. Garrido-Novell, C., Garrido-Varo, A., Pérez-Marín, D., Guerrero-Ginel, J. E., & Kim, M. (2015). Quantification and spatial characterization of moisture and NaCl content of Iberian dry-cured ham slices using NIR hyperspectral imaging. *Journal of Food Engineering*, 153, 117-123.
117. Georgiou, C. A. (2017). *Food Authentication: Management, Analysis and Regulation*. John Wiley & Sons.

118. Giannenas, I., Nisianakis, P., Gavriil, A., Kontopidis, G., & Kyriazakis, I. (2009). Trace mineral content of conventional, organic and courtyard eggs analysed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *Food Chemistry*, *114*(2), 706-711.
119. Girard, J., Baril, A., Mineau, P., & Fahrig, L. (2011). Carbon and nitrogen stable isotope ratios differ among invertebrates from field crops, forage crops, and non-cropped land uses. *Ecoscience*, *18*(2), 98-109.
120. Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. Current protocols in food analytical chemistry.
121. González-Martín, I., González-Pérez, C., Hernández-Méndez, J., & Alvarez-Garcia, N. (2002). Mineral analysis (Fe, Zn, Ca, Na, K) of fresh Iberian pork loin by near infrared reflectance spectrometry: Determination of Fe, Na and K with a remote fibre-optic reflectance probe. *Analytica Chimica Acta*, *468*(2), 293-301.
122. González-Martín, I., González-Pérez, C., Mendez, J. H., Marqués-Macias, E., & Poveda, F. S. (1999). Use of isotope analysis to characterize meat from Iberian-breed swine. *Meat Science*, *52*(4), 437-441.
123. González-Martín, I., Pérez, C. G., Méndez, J. H., & González, C. S. (2001). Differentiation of dietary regimene of Iberian swine by means of isotopic analysis of carbon and sulphur in hepatic tissue. *Meat Science*, *58*(1), 25-30.
124. Good, P. (2013). *Permutation tests: a practical guide to resampling methods for testing hypotheses*. Springer Science & Business Media.
125. Granato, D., Margraf, T., Brotzakis, I., Capuano, E., & van Ruth, S. M. (2015). Characterization of conventional, biodynamic, and organic purple grape juices by chemical markers, antioxidant capacity, and instrumental taste profile. *Journal of food science*, *80*(1), C55-C65.
126. Granato, D., Santos, J. S., Escher, G. B., Ferreira, B. L., & Maggio, R. M. (2017). Use of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for multivariate association between bioactive compounds and functional properties in foods: A critical perspective. *Trends in food science & technology*.

127. Gromski, P. S., Muhamadali, H., Ellis, D. I., Xu, Y., Correa, E., Turner, M. L., & Goodacre, R. (2015). A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis—a marriage of convenience or a shotgun wedding. *Analytica chimica acta*, *879*, 10-23.
128. Grunert, K. G. (2005). Food quality and safety: consumer perception and demand. *European review of agricultural economics*, *32*(3), 369-391.
129. Gurdeniz, G., & Ozen, B. (2009). Detection of adulteration of extra-virgin olive oil by chemometric analysis of mid-infrared spectral data. *Food chemistry*, *116*(2), 519-525
130. Hajslova, J., Cajka, T., & Vaclavik, L. (2011). Challenging applications offered by direct analysis in real time (DART) in food-quality and safety analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *30*(2), 204-218.
131. Harris, G. A., Galhena, A. S., & Fernandez, F. M. (2011). Ambient sampling/ionization mass spectrometry: applications and current trends. *Analytical Chemistry*, *83*(12), 4508-4538.
132. Hoefkens C, Vandekinderen I, De Meulenaer B, Devlieghere F, Baert K, Sioen I, et al, A literature-based comparison of nutrient and contaminant contents between organic and conventional vegetables and potatoes. *Br Food J* 111:1078–1097 (2009).
133. Hoefkens, C., Vandekinderen, I., De Meulenaer, B., Devlieghere, F., Baert, K., Sioen, I., ... & Van Camp, J. (2009). A literature-based comparison of nutrient and contaminant contents between organic and conventional vegetables and potatoes. *British Food Journal*, *111*(10), 1078-1097.
134. Hori, K., Kiriya, T., & Tsumura, K. (2016). A liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry-based metabolomics approach for the discrimination of cocoa beans from different growing regions. *Food analytical methods*, *9*(3), 738-743.
135. *Horticulturae*, **717**, 347 – 350 .
136. [https://juntadeandalucia.es/export/drupaljda/181123_Balanza Comercial_Agroalimentaria_Ago_2018..pdf](https://juntadeandalucia.es/export/drupaljda/181123_Balanza_Comercial_Agroalimentaria_Ago_2018..pdf)
137. <https://www.sueddeutsche.de/wirtschaft/report-schweinerei-1.3512914>

138. Hunter, D., Foster, M., McArthur, J. O., Ojha, R., Petocz, P., & Samman, S. (2011). Evaluation of the micronutrient composition of plant foods produced by organic and conventional agricultural methods. *Critical reviews in food science and nutrition*, *51*(6), 571-582.
139. Hurtado-Barroso, S., Tresserra-Rimbau, A., Vallverdú-Queralt, A., & Lamuela-Raventós, R. M. (2017). Organic food and the impact on human health. *Critical reviews in food science and nutrition*, 1-11.
140. Inácio, C. T., Chalk, P. M., & Magalhães, A. M. (2015). Principles and limitations of stable isotopes in differentiating organic and conventional foodstuffs: 1. Plant products. *Critical reviews in food science and nutrition*, *55*(9), 1206-1218.
141. INE 2017, primera estimación. Contabilidad Regional de España. Base 2010. Serie 2010-2017.
142. Jandrić, Z., Roberts, D., Rathor, M. N., Abraham, A., Islam, M., & Cannavan, A. (2014). Assessment of fruit juice authenticity using UPLC-QToF MS: A metabolomics approach. *Food chemistry*, *148*, 7-17.
143. Jandrić, Z., Roberts, D., Rathor, M. N., Abraham, A., Islam, M., & Cannavan, A. (2014). Assessment of fruit juice authenticity using UPLC-QToF MS: A metabolomics approach. *Food chemistry*, *148*, 7-17.
144. *Journal of Near-infrared Spectroscopy*, **11**, 447 – 456 .
145. Jurado, J. M., Jiménez-Lirola, A., Narváez-Rivas, M., Gallardo, E., Pablos, F., & León-Camacho, M. (2013). Characterization and quantification of 4-methylsterols and 4, 4-dimethylsterols from Iberian pig subcutaneous fat by gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-flame ionization detector and their use to authenticate the fattening systems. *Talanta*, *106*, 14-19.
146. K.H. Laursen, J.K. Schjoerring, S.D. Kelly, S. Husted, Authentication of organically grown plants – advantages and limitations of atomic spectroscopy for multi-element and stable isotope analysis, *Trends Anal. Chem.* *59* (2014) 73–82
147. Karabagias, I. K., Vavoura, M. V., Nikolaou, C., Badeka, A. V., Kontakos, S., & Kontominas, M. G. (2014). Floral authentication of Greek unifloral

- honeys based on the combination of phenolic compounds, physicochemical parameters and chemometrics. *Food research international*, 62, 753-760.
148. Kelly, S., Heaton, K., & Hoogewerff, J. (2005). Tracing the geographical origin of food: The application of multi-element and multi-isotope analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 16(12), 555-567.
149. Kendall, C. (1998). Tracing nitrogen sources and cycling in catchments. In *Isotope tracers in catchment hydrology* (pp. 519-576).
150. Lairon, D. (2011). Nutritional quality and safety of organic food. A review. *Médecine & Nutrition*, 47(1), 19-31.
151. Laursen, K. H., Schjoerring, J. K., Olesen, J. E., Askegaard, M., Halekoh, U., & Husted, S. (2011). Multielemental fingerprinting as a tool for authentication of organic wheat, barley, faba bean, and potato. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 59(9), 4385-4396.
152. Lawless, H. T., & Heymann, H. (2010). *Sensory evaluation of food: principles and practices*. Springer Science & Business Media.
153. Lee, H.-J., 2016. Individual and situational determinants of U.S. consumers' buying behavior havior of organic foods. *J. Int. Food Agribus. Mark.* 28, 117-131
154. Lee, S. K., & Kader, A. A. (2000). Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest biology and technology*, 20(3), 207-220.
155. Lehesranta, S. J., Koistinen, K. M., Massat, N., Davies, H. V., Shepherd, L. V., McNicol, J. W., ... & Leifert, C. (2007). Effects of agricultural production systems and their components on protein profiles of potato tubers. *Proteomics*, 7(4), 597-604.
156. Letaief, H., Zemni, H., Mliki, A., & Chebil, S. (2016). Composition of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv «Maltaise demi-sanguine» juice. A comparison between organic and conventional farming. *Food chemistry*, 194, 290-295.
157. Ley 2/2015 de 25 de marzo
<https://www.boe.es/boe/dias/2011/04/26/pdfs/BOE-A-2011-7405.pdf>
158. Ley 28/2015 del 30 de julio.
<https://www.boe.es/boe/dias/2015/07/31/pdfs/BOE-A-2015-8563.pdf>

159. Lindinger, W., Hansel, A., & Jordan, A. (1998). On-line monitoring of volatile organic compounds at pptv levels by means of proton-transfer-reaction mass spectrometry (PTR-MS) medical applications, food control and environmental research. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 173(3), 191-241.
160. Llorent-Martínez, E. J., Ortega-Barrales, P., Fernández-de Córdoba, M. L., Domínguez-Vidal, A. R. M. A., & Ruiz-Medina, A. (2011). Investigation by ICP-MS of trace element levels in vegetable edible oils produced in Spain. *Food Chemistry*, 127(3), 1257-1262.
161. Llorent-Martínez, E. J., Ortega-Barrales, P., Fernández-de Córdoba, M. L., Domínguez-Vidal, A. R. M. A., & Ruiz-Medina, A. (2011). Investigation by ICP-MS of trace element levels in vegetable edible oils produced in Spain. *Food Chemistry*, 127(3), 1257-1262.
162. Lockley, A. K., & Bardsley, R. G. (2000). DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science & Technology*, 11(2), 67-77.
163. Lombardi-Boccia, G., Lucarini, M., Lanzi, S., Aguzzi, A., & Cappelloni, M. (2004). Nutrients and antioxidant molecules in yellow plums (*Prunus domestica* L.) from conventional and organic productions: a comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(1), 90-94.
164. López-Bascón, M. A., Priego-Capote, F., Calderón-Santiago, M., Sánchez de Medina, V., Moreno-Rojas, J. M., García-Casco, J. M., & Luque de Castro, M. D. (2015). Determination of fatty acids and stable carbon isotopic ratio in subcutaneous fat to identify the feeding regime of Iberian pigs. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(2), 692-699.
165. López-Bote, M. O., de la Hoz, L., Cambero, M. I., Gallardo, E., Reglero, G., & Ordóñez, J. A. (1992). Volatile compounds of dry hams from Iberian pigs. *Meat Science*, 31(3), 267-277.
166. Loutfi, A., Coradeschi, S., Mani, G. K., Shankar, P., & Rayappan, J. B. B. (2015). Electronic noses for food quality: A review. *Journal of Food Engineering*, 144, 103-111.
167. Louw, E. D., & Theron, K. I. (2012). Volatile dynamics during maturation, ripening and cold storage of three Japanese plum cultivars (*Prunus salicina* Lindl.). *Postharvest biology and technology*, 70, 13-24.

168. Lu, C., Toepel, K., Irish, R., Fenske, R. A., Barr, D. B., & Bravo, R. (2005). Organic diets significantly lower children's dietary exposure to organophosphorus pesticides. *Environmental health perspectives*, 114(2), 260-263.
169. Madesis, P., Ganopoulos, I., Sakaridis, I., Argiriou, A., & Tsaftaris, A. (2014). Advances of DNA-based methods for tracing the botanical origin of food products. *Food Research International*, 60, 163-172.
170. Magkos, F., Arvaniti, F., & Zampelas, A. (2003). Organic food: nutritious food or food for thought? A review of the evidence. *International journal of food sciences and nutrition*, 54(5), 357-371.
171. Magkos, F., Arvaniti, F., & Zampelas, A. (2006). Organic food: buying more safety or just peace of mind? A critical review of the literature. *Critical reviews in food science and nutrition*, 46(1), 23-56.
172. Manning, L. (2016). Food fraud: Policy and food chain. *Current Opinion in Food Science*, 10, 16-21.
173. MAPAMA 2018.
https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/produccion-ecologica/default_antigua.aspx
174. MAPAMA. Informe anual de la industria alimentaria 2015-2016
https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/industria-agroalimentaria/informeanualindustriaalimentaria2015-2016_ok_tcm30-380020.pdf
175. Marfisi, C., Audergon, J. M., Albagnac, G., Bureau, S., & Reich, M. (2005, June). Application of Fourier-Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy for the Evaluation of Quality Traits in Apricot Fruits. In *XIII International Symposium on Apricot Breeding and Culture 717* (pp. 347-350).
176. Marmioli, N., Maestri, E., Gulli, M., Malcevschi, A., Peano, C., Bordoni, R., & De Bellis, G. (2008). Methods for detection of GMOs in food and feed. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 392(3), 369.
177. McFadden, J. R., & Huffman, W. E. (2017). Willingness-to-pay for natural, organic, and conventional foods: The effects of information and meaningful labels. *Food Policy*, 68, 214-232.

178. Monahan, F. J., Schmidt, O., & Moloney, A. P. (2018). Meat provenance: Authentication of geographical origin and dietary background of meat. *Meat science*.
179. Nakajima, E. S., & Ortega, E. (2015). Exploring the sustainable horticulture productions systems using the emergy assessment to restore the regional sustainability. *Journal of Cleaner Production*, *96*, 531-538.
180. Narváez-Rivas, M., Pablos, F., Jurado, J. M., & León-Camacho, M. (2011). Authentication of fattening diet of Iberian pigs according to their volatile compounds profile from raw subcutaneous fat. *Analytical and bioanalytical chemistry*, *399*(6), 2115-2122.
181. Nascimento, C. F., Santos, P. M., Pereira-Filho, E. R., & Rocha, F. R. (2017). Recent advances on determination of milk adulterants. *Food chemistry*, *221*, 1232-1244.
182. Ni, B., Liu, M., Lu, S., Xie, L., & Wang, Y. (2011). Environmentally friendly slow-release nitrogen fertilizer. *Journal of agricultural and food chemistry*, *59*(18), 10169-10175.
183. Niñoles, L., Mulet, A., Ventanas, S., & Benedito, J. (2010). Ultrasonic assessment of the melting behaviour in fat from Iberian dry-cured hams. *Meat science*, *85*(1), 26-32.
184. Oates, L., Cohen, M., Braun, L., Schembri, A., & Taskova, R. (2014). Reduction in urinary organophosphate pesticide metabolites in adults after a week-long organic diet. *Environmental research*, *132*, 105-111.
185. Ogrinc, N. K. I. J., Košir, I. J., Spangenberg, J. E., & Kidrič, J. (2003). The application of NMR and MS methods for detection of adulteration of wine, fruit juices, and olive oil. A review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *376*(4), 424-430.
186. Oliveira, R. C., Oliveira, L. S., Franca, A. S., & Augusti, R. (2009). Evaluation of the potential of SPME-GC-MS and chemometrics to detect adulteration of ground roasted coffee with roasted barley. *Journal of Food Composition and analysis*, *22*(3), 257-261.
187. Orden PRE/3844/2004, de 18 de noviembre, por la que se establecen los métodos oficiales de toma de muestras en canales de cerdos ibéricos y el método de análisis para la determinación de la composición de

- ácidos grasos de los lípidos totales del tejido adiposo subcutáneo de cerdos ibéricos.
188. Ouyang, Q., Zhao, J., & Chen, Q. (2014). Instrumental intelligent test of food sensory quality as mimic of human panel test combining multiple cross-perception sensors and data fusion. *Analytica chimica acta*, *841*, 68-76.
 189. Pafundo, S., Gulli, M., & Marmioli, N. (2009). SYBR® GreenER™ Real-Time PCR to detect almond in traces in processed food. *Food Chemistry*, *116*(3), 811-815.
 190. Palupi, E., Jayanegara, A., Ploeger, A., & Kahl, J. (2012). Comparison of nutritional quality between conventional and organic dairy products: a meta-analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *92*(14), 2774-2781.
 191. Parlamento Europeo 2013. <http://www.europarl.europa.eu/sides/getDoc.do?pubRef=-//EP//NONSGML+REPORT+A7-2013-0434+0+DOC+PDF+V0//EN>
 192. Parra, V., Petró, M. J., Martín, L., Broncano, J. M., & Timón, M. L. (2010). Modification of the fat composition of the Iberian pig using *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*. *European journal of lipid science and technology*, *112*(7), 720-726.
 193. Pereira-Caro, G., Borges, G., Van Der Hooft, J., Clifford, M. N., Del Rio, D., Lean, M. E., ... & Crozier, A. (2014). Orange juice (poly) phenols are highly bioavailable in humans—. *The American journal of clinical nutrition*, *100*(5), 1378-1384.
 194. Perez-Cacho, P. R., & Rouseff, R. (2008). Processing and storage effects on orange juice aroma: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(21), 9785-9796.
 195. Pérez-Marín, D., Sanz, E. D. P., Guerrero-Ginel, J. E., & Garrido-Varo, A. (2009). A feasibility study on the use of near-infrared spectroscopy for prediction of the fatty acid profile in live Iberian pigs and carcasses. *Meat Science*, *83*(4), 627-633.
 196. Pérez-Palacios, T., Ruiz, J., Tejeda, J. F., & Antequera, T. (2009). Subcutaneous and intramuscular lipid traits as tools for classifying Iberian

- pigs as a function of their feeding background. *Meat science*, *81*(4), 632-640.
197. Pérez-Romero, L. F., Arroyo, F. T., Santamaría, C., Herencia, J. F., & Daza, A. (2014). Growth, phenology and fruit set of *Prunus armeniaca* L.(cv. Ninfa) grafted on two rootstocks in organic and conventional management. *Horticultural Science*, *41*(3), 101-106.
198. Pérez-Romero, L. F., Daza, A., Herencia, J. F., & Arroyo, F. T. (2017). Carbohydrate and nitrogen reserves in two cultivars of Japanese plum grown under organic and conventional management. *Horticultural Science*, *44*(4), 163-170.
199. Peris, M., & Escuder-Gilabert, L. (2016). Electronic noses and tongues to assess food authenticity and adulteration. *Trends in Food Science & Technology*, *58*, 40-54.
200. Perona, J. S., & Ruiz-Gutierrez, V. (2005). Quantitative lipid composition of Iberian pig muscle and adipose tissue by HPLC. *Journal of liquid chromatography & related technologies*, *28*(15), 2445-2457.
201. Petrón, M. J., Antequera, T., Muriel, E., Tejeda, J. F., & Ventanas, J. (2004). Linear hydrocarbons content of intramuscular lipids of dry-cured Iberian ham. *Meat science*, *66*(2), 295-300.
202. Petrón, M. J., Durán, L., Ávila, M., Cernadas, E., & Antequera, T. (2003). A computer vision system to discriminate iberian pigs from ham images. *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem*, *2*(5), 549-557.
203. Ponisio, L. C., M'Gonigle, L. K., Mace, K. C., Palomino, J., de Valpine, P., & Kremen, C. (2015). Diversification practices reduce organic to conventional yield gap. *Proc. r. soc. b*, *282*(1799), 20141396.
204. Pouliarekou, E., Badeka, A., Tasioula-Margari, M., Kontakos, S., Longobardi, F. and Kontominas, M.G. (2011) Characterization and classification of Western Greek olive oils according to cultivar and geographical origin based on volatile compounds. *Journal of Chromatography A*, *1218*, 7534-42.
205. Ramírez, R., & Cava, R. (2007). Carcass composition and meat quality of three different Iberian× Duroc genotype pigs. *Meat science*, *75*(3), 388-396.

206. Rapisarda, P., Camin, F., Fabroni, S., Perini, M., Torrisi, B., & Intrigliolo, F. (2010). Influence of different organic fertilizers on quality parameters and the $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$, $\delta^{34}\text{S}$, and $\delta^{18}\text{O}$ values of orange fruit (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Journal of agricultural and food chemistry*, *58*(6), 3502-3506.
207. Real Decreto 1050/2003, de 1 de agosto, por el que se aprueba la Reglamentación técnico-sanitaria de zumos de frutas y de otros productos similares, destinados a la alimentación humana.
208. Real Decreto 1083/2001, de 5 de octubre, por el que se aprueba la norma de calidad para el jamón ibérico, paleta ibérica y caña de lomo ibérico elaborados en España.
209. Real Decreto 144/2003, de 7 de febrero, por el que se modifica el Real Decreto 1083/2001, de 5 de octubre, por el que se aprueba la norma de calidad para el jamón ibérico, paleta ibérica y caña de lomo ibérico elaborados en España.
210. Real Decreto 1469/2007, de 2 de noviembre, por el que se aprueba la norma de calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomo ibéricos.
211. Real Decreto 1781/2004, de 30 de julio, por el que se modifica el Real Decreto 1083/2001, de 5 de octubre, por el que se aprueba la norma de calidad para el jamón ibérico, paleta ibérica y caña de lomo ibérico elaborados en España.
212. Real Decreto 4/2014, de 10 de enero, por el que se aprueba la norma de calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomo ibérico.
213. Real Decreto 476/2014, de 13 de junio, por el que se regula el registro nacional de movimientos de subproductos animales y los productos derivados no destinados a consumo humano.
214. Reganold, J. P., & Wachter, J. M. (2016). Organic agriculture in the twenty-first century. *Nature plants*, *2*(2), 15221.
215. Reglamento (CE) n o 555/2008 de la Comisión, de 27 de junio de 2008 , por el que se establecen normas de desarrollo del Reglamento (CE) n o 479/2008 del Consejo, por el que se establece la organización común del mercado vitivinícola, en lo relativo a los programas de apoyo, el comercio

- con terceros países, el potencial productivo y los controles en el sector vitivinícola.
216. Reglamento (CE) nº 110/2008, relativo a la definición, designación, presentación, etiquetado y protección de las indicaciones geográficas de bebidas espirituosas.
217. Reglamento (CE) nº 1151/2012 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de noviembre de 2012, sobre los regímenes de calidad de los productos agrícolas y alimenticios.
218. Reglamento (CE) nº 1308/2013 por el que se crea la organización común de mercados de los productos agrarios (OCM única)
219. Reglamento (CE) nº 834/2007 sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos
220. Reglamento (CE) no 889/2008 de la comisión de 5 de septiembre de 2008 por el que se establecen disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) no 834/2007 del Consejo sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos, con respecto a la producción ecológica, su etiquetado y su control
221. Reglamento (CEE) nº 2348/91 de la Comisión, de 29 de julio de 1991, por el que se crea un banco de datos de los resultados de los análisis mediante resonancia magnética nuclear del deuterio en los productos del sector vitivinícola.
222. Reglamento (CEE) nº 2347/91 de la Comisión, de 29 de julio de 1991, relativo a la toma de muestras de productos del sector vitivinícola en el marco de la colaboración entre Estados miembros para el análisis mediante resonancia magnética nuclear para el banco de datos comunitario
223. Reglamento europeo 178/2002. <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2002R0178:20080325:ES:PDF>
224. Reglamento nº 882/2004 <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2004R0882:20070101:ES:PDF>

225. Reilly, K. (2013). On farm and fresh produce management. John Wiley & Sons, Ltd. (Eds.). (2013). *Handbook of plant food phytochemicals: sources, stability and extraction*. John Wiley & Sons.
226. Rembiałkowska, E. (2007). Quality of plant products from organic agriculture. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(15), 2757-2762.
227. Rey, A. I., Daza, A., López-Carrasco, C., & López-Bote, C. J. (2006). Feeding Iberian pigs with acorns and grass in either free-range or confinement affects the carcass characteristics and fatty acids and tocopherols accumulation in Longissimus dorsi muscle and backfat. *Meat science*, 73(1), 66-74.
228. Rey, A. I., López-Bote, C. J., Daza, A., & Lauridsen, C. (2010). Accumulation and evolution of tocopherols in dry-cured hams from Iberian pigs as affected by their feeding and rearing system. *Food chemistry*, 123(4), 1170-1175.
229. Reyes-Garces, N., Gionfriddo, E., Gómez-Ríos, G. A., Alam, M. N., Boyacı, E., Bojko, B., ... & Pawliszyn, J. (2017). Advances in solid phase microextraction and perspective on future directions. *Analytical chemistry*, 90(1), 302-360.
230. Riedl, J., Esslinger, S., & Fahl-Hassek, C. (2015). Review of validation and reporting of non-targeted fingerprinting approaches for food authentication. *Analytica Chimica Acta*, 885, 17-32.
231. Rinnan, Å., van den Berg, F., & Engelsen, S. B. (2009). Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28(10), 1201-1222.
232. Rock, L. (2012). The use of stable isotope techniques in egg authentication schemes: a review. *Trends in food science & technology*, 28(2), 62-68.
233. Rodrigues, C. I., Maia, R., Miranda, M., Ribeirinho, M., Nogueira, J. M. F., & Máguas, C. (2009). Stable isotope analysis for green coffee bean: a possible method for geographic origin discrimination. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(5), 463-471.

234. Rodríguez, N., Ortiz, M. C., Sarabia, L. A., & Herrero, A. (2010). A multivariate multianalyte screening method for sulfonamides in milk based on front-face fluorescence spectroscopy. *Analytica chimica acta*, *657*(2), 136-146.
235. Rodríguez-Estévez, V., García, A., Perea, J., Mata, C., & Gómez, A. G. (2007). Producción de bellota en la dehesa: factores influyentes. *Arch. Zootec*, *56*(2).
236. Rodriguez-Saona, L. E., Koca, N., Harper, W. J., & Alvarez, V. B. (2006). Rapid determination of Swiss cheese composition by Fourier transform infrared/attenuated total reflectance spectroscopy. *Journal of dairy science*, *89*(5), 1407-1412.
237. Rogers, K. M. (2008). Nitrogen isotopes as a screening tool to determine the growing regimen of some organic and nonorganic supermarket produce from New Zealand. *Journal of agricultural and food chemistry*, *56*(11), 4078-4083.
238. Roussos P. (2016), Orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). Simmonds, M., & Preedy, V. R. (Eds.). (2015). *Nutritional composition of fruit cultivars*. Academic Press.
239. Roussos, P. A. (2011). Phytochemicals and antioxidant capacity of orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Salustiana) juice produced under organic and integrated farming system in Greece. *Scientia horticulturae*, *129*(2), 253-258.
240. Rubert, J., Lacina, O., Fauhl-Hassek, C., & Hajslova, J. (2014). Metabolic fingerprinting based on high-resolution tandem mass spectrometry: a reliable tool for wine authentication?. *Analytical and bioanalytical chemistry*, *406*(27), 6791-6803.
241. Rubert, J., Lacina, O., Zachariasova, M., & Hajslova, J. (2016). Saffron authentication based on liquid chromatography high resolution tandem mass spectrometry and multivariate data analysis. *Food chemistry*, *204*, 201-209.
242. Ruiz, J., Cava, R., Antequera, T., Martín, L., Ventanas, J., & López-Bote, C. J. (1998). Prediction of the feeding background of Iberian pigs using the

- fatty acid profile of subcutaneous, muscle and hepatic fat. *Meat science*, 49(2), 155-163.
243. Ruiz, J., Ventanas, J., Cava, R., Andrés, A., & García, C. (1999). Volatile compounds of dry-cured Iberian ham as affected by the length of the curing process. *Meat Science*, 52(1), 19-27.
244. Ruiz-Samblás, C., Tres, A., Koot, A., van Ruth, S. M., González-Casado, A., & Cuadros-Rodríguez, L. (2012). Proton transfer reaction-mass spectrometry volatile organic compound fingerprinting for monovarietal extra virgin olive oil identification. *Food Chemistry*, 134(1), 589-596.
245. S. Kelly, K. Heaton, J. Hoogewerff, Tracing the geographical origin of food: the
246. S.A. Drivelos, C.A. Georgiou, Multi-element and multi-isotope-ratio analysis to
247. Sassi, M., Arena, S., & Scaloni, A. (2015). MALDI-TOF-MS platform for integrated proteomic and peptidomic profiling of milk samples allows rapid detection of food adulterations. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(27), 6157-6171.
248. Sato , T. (1994). Application of principal component analysis on near-infrared spectroscopic data of vegetable oils for their classification. *Journal of the American Oil Chemists' Society* , 71 (3) , 293 – 298 .
249. Savchuk, S. A., Vlasov, V. N., Appolonova, S. A., Arbuzov, V. N., Vedenin, A. N., Mezinov, A. B., & Grigor'yan, B. R. (2001). Application of chromatography and spectrometry to the authentication of alcoholic beverages. *Journal of Analytical Chemistry*, 56(3), 214-231.
250. Schlesinger, W. H. (2009). On the fate of anthropogenic nitrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(1), 203-208.
251. Serrano, M. P., Valencia, D. G., Fuentetaja, A., Lázaro, R., & Mateos, G. G. (2008). Effect of gender and castration of females and slaughter weight on performance and carcass and meat quality of Iberian pigs reared under intensive management systems. *Meat Science*, 80(4), 1122-1128.
252. Serrano, S., Perán, F., Jiménez-Hornero, F. J., & de Ravé, E. G. (2013). Multifractal analysis application to the characterization of fatty infiltration in Iberian and White pork sirloins. *Meat science*, 93(3), 723-732.

253. Seufert, V., Ramankutty, N., & Foley, J. A. (2012). Comparing the yields of organic and conventional agriculture. *Nature*, *485*(7397), 229.
254. Shearer, G. B., Kohl, D. H., & Commoner, B. (1974). The precision of determinations of the natural abundance of nitrogen-15 in soils, fertilizers, and shelf chemicals. *Soil Science*, *118*(5), 308-316.
255. Shi, T., Zhu, M., Chen, Y., Yan, X., Chen, Q., Wu, X., ... & Xie, M. (2018). ¹H NMR combined with chemometrics for the rapid detection of adulteration in camellia oils. *Food chemistry*, *242*, 308-315.
256. Slinkard, K., & Singleton, V. L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American journal of enology and viticulture*, *28*(1), 49-55.
257. Simpkins, W. A., Louie, H., Wu, M., Harrison, M., & Goldberg, D. (2000). Trace elements in Australian orange juice and other products. *Food Chemistry*, *71*(4), 423-433.
258. Smith, L. G., Williams, A. G., & Pearce, B. D. (2015). The energy efficiency of organic agriculture: A review. *Renewable agriculture and Food systems*, *30*(3), 280-301.
259. Smith-Spangler, C., Brandeau, M. L., Hunter, G. E., Bavinger, J. C., Pearson, M., Eschbach, P. J., ... & Olkin, I. (2012). Are organic foods safer or healthier than conventional alternatives?: a systematic review. *Annals of internal medicine*, *157*(5), 348-366.
260. Smyth, H., & Cozzolino, D. (2012). Instrumental methods (spectroscopy, electronic nose, and tongue) as tools to predict taste and aroma in beverages: advantages and limitations. *Chemical Reviews*, *113*(3), 1429-1440.
261. Souza-Silva, É. A., Gionfriddo, E., & Pawliszyn, J. (2015). A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices II. Food analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *71*, 236-248.
262. Spink, J., & Moyer, D. C. (2011). Defining the public health threat of food fraud. *Journal of Food Science*, *76*(9), R157-R163.
263. Spiteri, M., Dubin, E., Cotton, J., Poirel, M., Corman, B., Jamin, E., ... & Rutledge, D. (2016). Data fusion between high resolution ¹H-NMR and

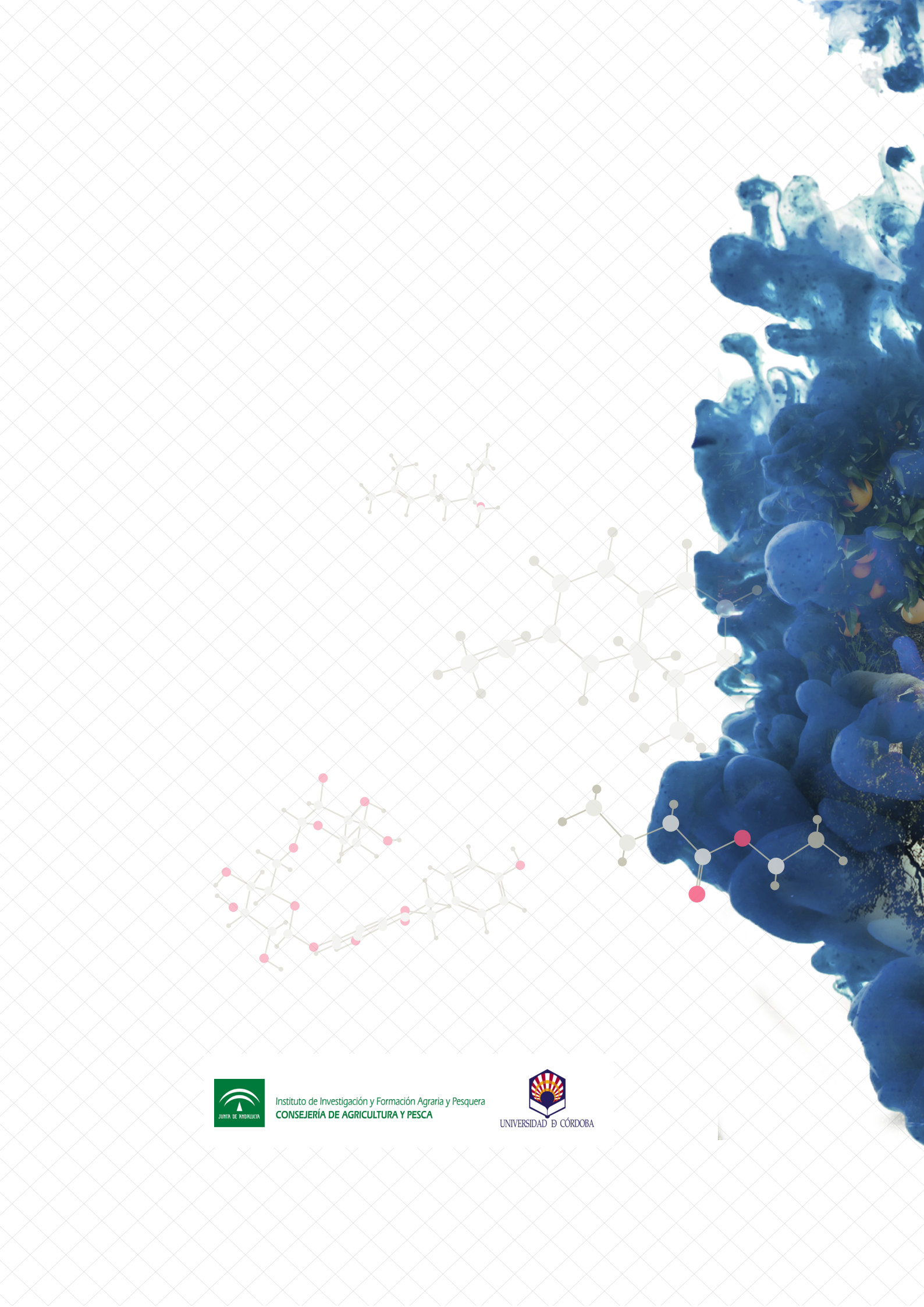
- mass spectrometry: a synergetic approach to honey botanical origin characterization. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 408(16), 4389-4401.
264. Średnicka-Tober, D., Barański, M., Seal, C., Sanderson, R., Benbrook, C., Steinshamn, H., ... & Cozzi, G. (2016). Composition differences between organic and conventional meat: a systematic literature review and meta-analysis. *British Journal of Nutrition*, 115(6), 994-1011.
265. Stuart, D., Schewe, R. L., & McDermott, M. (2014). Reducing nitrogen fertilizer application as a climate change mitigation strategy: Understanding farmer decision-making and potential barriers to change in the US. *Land use policy*, 36, 210-218.
266. Szulc, M., Kahl, J., Busscher, N., Mergardt, G., Doesburg, P., & Ploeger, A. (2010). Discrimination between organically and conventionally grown winter wheat farm pair samples using the copper chloride crystallisation method in combination with computerised image analysis. *Computers and Electronics in Agriculture*, 74(2), 218-222.
267. Takats, Z., Wiseman, J. M., Gologan, B., & Cooks, R. G. (2004). Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. *Science*, 306(5695), 471-473.
268. Tarozzi, A., Hrelia, S., Angeloni, C., Morroni, F., Biagi, P., Guardigli, M., ... & Hrelia, P. (2006). Antioxidant effectiveness of organically and non-organically grown red oranges in cell culture systems. *European Journal of Nutrition*, 45(3), 152-158.
269. Tejada, J. F., Antequera, T., Martín, L., Ventanas, J., & Garcia, C. (2001). Study of the branched hydrocarbon fraction of intramuscular lipids from Iberian fresh ham. *Meat Science*, 58(2), 175-179.
270. Tejerina, D., García-Torres, S., de Vaca, M. C., Vázquez, F. M., & Cava, R. (2012). Study of variability in antioxidant composition and fatty acids profile of Longissimus dorsi and Serratus ventralis muscles from Iberian pigs reared in two different Montanera seasons. *Meat science*, 90(2), 414-419.

271. Tejerina, D., García-Torres, S., de Vaca, M. C., Vázquez, F. M., & Cava, R. (2011). Acorns (*Quercus rotundifolia* Lam.) and grass as natural sources of antioxidants and fatty acids in the “montanera” feeding of Iberian pig: Intra- and inter-annual variations. *Food Chemistry*, *124*(3), 997-1004.
272. Tena, N., Lazzez, A., Aparicio-Ruiz, R. and Garcia-Gonzalez, D.L. (2007) Volatile compounds characterizing Tunisian Chemlali and Chétoui virgin olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 7852-8.
273. Teye, E., Huang, X., Dai, H., & Chen, Q. (2013). Rapid differentiation of Ghana cocoa beans by FT-NIR spectroscopy coupled with multivariate classification. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *114*, 183-189.
274. Tilman, D., Cassman, K. G., Matson, P. A., Naylor, R., & Polasky, S. (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*, *418*(6898), 671.
275. Tiwari, U., & Cummins, E. (2013). Factors influencing levels of phytochemicals in selected fruit and vegetables during pre-and post-harvest food processing operations. *Food Research International*, *50*(2), 497-506.
276. Twomey, M., Downey, G., & McNulty, P. B. (1995). The potential of NIR spectroscopy for the detection of the adulteration of orange juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *67*(1), 77-84.
277. Valentin, J. L., & Watling, R. J. (2013). Provenance establishment of coffee using solution ICP-MS and ICP-AES. *Food chemistry*, *141*(1), 98-104.
278. Vallverdú-Queralt, A., & Lamuela-Raventós, R. M. (2016). Foodomics: a new tool to differentiate between organic and conventional foods. *Electrophoresis*, *37*(13), 1784-1794.
279. Van Dijk, J. P., Cankar, K., Hendriksen, P. J., Beenen, H. G., Zhu, M., Scheffer, S., ... & Wilcockson, S. J. (2012). The identification and interpretation of differences in the transcriptomes of organically and conventionally grown potato tubers. *Journal of agricultural and food chemistry*, *60*(9), 2090-2101.

280. Van Rijswijk, W., & Frewer, L. J. (2008). Consumer perceptions of food quality and safety and their relation to traceability. *British Food Journal*, *110*(10), 1034-1046.
281. Van Rijswijk, W., Frewer, L. J., Menozzi, D., & Faioli, G. (2008). Consumer perceptions of traceability: A cross-national comparison of the associated benefits. *Food Quality and Preference*, *19*(5), 452-464.
282. Van Ruth, S. M., Guerri, J. E., & Alewijn, M. (2011). Orange juice authentication: typicality, organic production and geographical origin. In *Proceedings of the 9th Wartburg Symposium on Flavor Chemistry & Biology-Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie-Advances and challenges in flavor chemistry & biology, 10-16 Apr. 2010, Eisenach, Germany* (pp. 417-420).
283. Van Ruth, S. M., Koot, A., Akkermans, W., Araghpour, N., Rozijn, M., Baltussen, M., ... & Frankhuizen, R. (2008). Butter and butter oil classification by PTR-MS. *European Food Research and Technology*, *227*(1), 307-317.
284. Vargas J. de D.; Aparicio, M. A. 2001. Análisis de la evolución de los censos y sistemas de producción del cerdo ibérico. Estudios Agrosociales y Pesqueros, 193. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid: 887-118.
285. Varmuza, K., & Filzmoser, P. (2016). *Introduction to multivariate statistical analysis in chemometrics*. CRC press.
286. Ventanas, S., Ruiz, J., García, C., & Ventanas, J. (2007). Preference and juiciness of Iberian dry-cured loin as affected by intramuscular fat content, crossbreeding and rearing system. *Meat Science*, *77*(3), 324-330.
287. Verenitch, S., & Mazumder, A. (2012). Carbon and nitrogen isotopic signatures and nitrogen profile to identify adulteration in organic fertilizers. *Journal of agricultural and food chemistry*, *60*(34), 8278-8285.
288. Viera-Alcaide, I., Vicario, I. M., Constante, E. G., & León-Camacho, M. (2007). Authentication of fattening diet of Iberian pig according to their triacylglycerols profile from subcutaneous fat. *Analytica chimica acta*, *596*(2), 319-324.

289. Vigneau, E., & Thomas, F. (2012). Model calibration and feature selection for orange juice authentication by ¹H NMR spectroscopy. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, *117*, 22-30.
290. Vitòria, L., Otero, N., Soler, A., & Canals, À. (2004). Fertilizer characterization: isotopic data (N, S, O, C, and Sr). *Environmental Science & Technology*, *38*(12), 3254-3262.
291. volatile compounds in the pulp, cloud, and serum of freshly squeezed orange juice. *Journal of agricultural and food chemistry*, *51*(11), 3442-3447.
292. von Barga, C., Brockmeyer, J., & Humpf, H. U. (2014). Meat authentication: a new HPLC-MS/MS based method for the fast and sensitive detection of horse and pork in highly processed food. *Journal of agricultural and food chemistry*, *62*(39), 9428-9435.
293. Westad, F., & Marini, F. (2015). Validation of chemometric models—a tutorial. *Analytica chimica acta*, *893*, 14-24.
294. White, J. W., Winters, K., Martin, P., & Rossmann, A. (1998). Stable carbon isotope ratio analysis of honey: validation of internal standard procedure for worldwide application. *Journal of AOAC International (USA)*.
295. Willer, H., & Lernoud, J. (2016). *The world of organic agriculture. Statistics and emerging trends 2016* (pp. 1-336). Research Institute of Organic Agriculture FiBL and IFOAM Organics International.
296. Wold, S. (1976). Pattern recognition by means of disjoint principal components models. *Pattern recognition*, *8*(3), 127-139.
297. Wulff, T., Nielsen, M. E., Deelder, A. M., Jessen, F., & Palmblad, M. (2013). Authentication of fish products by large-scale comparison of tandem mass spectra. *Journal of proteome research*, *12*(11), 5253-5259.
298. Yang, D., & Ying, Y. (2011). Applications of Raman spectroscopy in agricultural products and food analysis: A review. *Applied Spectroscopy Reviews*, *46*(7), 539-560.
299. YBC Man, Y. C., Aida, A. A., Raha, A. R., & Son, R. (2007). Identification of pork derivatives in food products by species-specific polymerase chain reaction (PCR) for halal verification. *Food Control*, *18*(7), 885-889.

300. Zeaiter, M., Roger, J. M., & Bellon-Maurel, V. (2005). Robustness of models developed by multivariate calibration. Part II: The influence of pre-processing methods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 24(5), 437-445.
301. Zhang, J., Li, L., Gao, N., Wang, D., Gao, Q., & Jiang, S. (2010). Feature extraction and selection from volatile compounds for analytical classification of Chinese red wines from different varieties. *Analytica chimica acta*, 662(2), 137-142.
302. Zhang, W. F., Dou, Z. X., He, P., Ju, X. T., Powlson, D., Chadwick, D., ... & Chen, X. P. (2013). New technologies reduce greenhouse gas emissions from nitrogenous fertilizer in China. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(21), 8375-8380.
303. Zielinski, R. A., Asher-Bolinder, S., Meier, A. L., Johnson, C. A., & Szabo, B. J. (1997). Natural or fertilizer-derived uranium in irrigation drainage: A case study in southeastern Colorado, USA. *Applied Geochemistry*, 12(1), 9-21.
304. GP Danezis., Aristidis, S., & Constantinos, A. (2016). Food authentication: state of the art and prospects. *Current Opinion in Food Science*.
305. Cartografía de invernaderos en Almería, Granada y Málaga. Año 2017.
https://juntadeandalucia.es/export/drupaljda/Cartografia%20inv_AL_GR_MA_SEE.pdf



Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA Y PESCA



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA