

**MÁSTER UNIVERSITARIO DE PROYECTOS Y GESTIÓN DE
PLANTAS AGROINDUSTRIALES**

TRABAJO FIN DE MÁSTER



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**“PREDICCIÓN DEL COLOR DE LA PULPA EN
MELONES INTACTOS USANDO LA ESPECTROSCOPIA
NIRS”**

Autora: Irina Torres Rodríguez

Directoras:

Dra. M^a Teresa Sánchez Pineda de las Infantas
Dra. María José de la Haba de la Cerda

Córdoba, Julio de 2014



Departamento de Bromatología
y Tecnología de los Alimentos

M^a TERESA SÁNCHEZ PINEDA DE LAS INFANTAS, Catedrática de Universidad del Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Córdoba y M^a JOSÉ DE LA HABA DE LA CERDA, Profesora Contratada Doctora del Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Córdoba

INFORMAN:

Que el Trabajo Fin de Máster titulado “**Predicción del color de la pulpa en melones intactos usando la Espectroscopía NIRS**”, ha sido realizado por Dña. Irina Torres Rodríguez, bajo nuestra dirección, para la obtención del título de Máster Universitario en Proyectos y Gestión de Plantas Agroindustriales por la Universidad de Córdoba, siendo un trabajo original e inédito y que reúne los requisitos necesarios para su exposición y defensa.

Y para que conste, firman el presente informe en Córdoba a 3de Julio de 2014.

Prof^a. Dra. M^a Teresa Sánchez Pineda de las
Infantas.

Prof^a. Dra. M^a José De la Haba De la Cerda.

Agradecimientos

Agradecimientos

Deseo expresar mi sincera gratitud y reconocimiento a todas las personas que han hecho posible la realización de este Trabajo Fin de Máster:

A la Dra. María Teresa Sánchez Pineda de las Infantas, Catedrática de Universidad del Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Córdoba, y directora de este Trabajo Fin de Máster.

A la Dra. M^a José De la Haba De la Cerda, Profesora Contratada Doctora del Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Córdoba, y directora de este Trabajo Fin de Máster.

A la Dra. Dolores Pérez Marín, Profesora Titular de Universidad del Departamento de Producción Animal de la Universidad de Córdoba, y colaboradora en el desarrollo de este Trabajo Fin de Máster.

Índice

RESUMEN	3
SUMMARY	7
Capítulo 1. ESPECTROSCOPIA DE REFLECTANCIA EN EL INFRARROJO CERCANO	11
1.1. DESARROLLO Y FUNDAMENTOS	12
1.2. MODOS DE ANÁLISIS NIRS	14
1.3. TIPOS DE INSTRUMENTOS NIRS	17
1.4. ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICO	21
<i>1.4.1. Técnicas quimiométricas de análisis cuantitativo</i>	<i>22</i>
<i>1.4.2. Técnicas quimiométricas de análisis cualitativo</i>	<i>26</i>
1.5. APLICACIONES DE LA TECNOLOGÍA NIRS AL CONTROL DE CALIDAD Y TRAZABILIDAD DE FRUTAS Y HORTALIZAS	30
<i>1.5.1. Profundidad de penetración de la luz en alimentos</i>	<i>33</i>
Capítulo 2. OBJETIVOS	37
2.1. OBJETIVO GENERAL	37
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
Capítulo 3. RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN	41
3.1. FIRST STEPS TO PREDICTING PULP COLOUR IN WHOLE MELONS USING NEAR-INFRARED REFLECTANCE SPECTROSCOPY. Biosystems Engineering (2014) 123, 12-18	41
Capítulo 4. CONCLUSIONES	53
Capítulo 5. BIBLIOGRAFÍA	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Profundidad de penetración de la luz en distintos cuerpos.....	34
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diseños ópticos básicos empleados en la instrumentación NIRS.....	14
Figura 2. Esquema de un equipo de redes de difracción (grating) móviles	19
Figura 3. Esquema de un equipo de red de diodos (DA)	20

Resumen

RESUMEN

La tecnología NIRS fue evaluada para determinar de forma no destructiva el color (a^* , b^* , C^* y h^*) de la pulpa del melón, uno de los principales índices empleados para determinar el grado de madurez y calidad del mismo. Un total de 432 melones Cantaloupe y Galia fueron empleados para el desarrollo de los modelos de predicción de color interno utilizando distintos pretratamientos de la señal espectral y algoritmos de regresión lineales y no lineales. Los valores del coeficiente de determinación (r^2) y del error típico de validación cruzada (ETVC) obtenidos para los parámetros a^* (0.96, 2.16), b^* (0.85, 3.25), C^* (0.82, 3.76) y h^* (0.96, 3.64) en fruta intacta indican la viabilidad inicial del empleo de la tecnología NIRS con la regresión MPLS para la determinación de la madurez y calidad de frutas enteras. Más aún, la aplicación del algoritmo de regresión no lineal Local mejoró considerablemente la capacidad predictiva de los modelos desarrollados para la determinación de los parámetros de color interno estudiados. Por tanto, los resultados obtenidos sugieren que la tecnología NIRS es una herramienta de futuro para la monitorización del proceso de maduración de melones y el establecimiento del momento óptimo de su cosecha.

Summary

SUMMARY

Near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) technology was used for the non-destructive measurement of melon-pulp colour (a^* , b^* , C^* and h^*), one of the main indicators of ripeness and quality. A total of 432 Cantaloupe and Galia melons were used in the construction of calibration models, testing various spectral signal pretreatments and both linear and non-linear regression algorithms. The coefficient of determination (r^2) and the standard error of cross-validation (SECV) obtained for parameters a^* (0.96, 2.16), b^* (0.85, 3.25), C^* (0.82, 3.76) and h^* (0.96, 3.64) in intact fruit confirmed the *a priori* viability of NIRS technology with modified partial least squares (MPLS) regression for measuring melon ripeness and quality. Moreover, the application of a LOCAL algorithm improved the ability of models to predict all the internal-colour quality parameters studied. These results suggest that NIRS technology is a promising tool for monitoring ripening in melons and thus for establishing the optimal harvesting time.

Capítulo 1

Capítulo 1. ESPECTROSCOPIA DE REFLECTANCIA EN EL INFRARROJO CERCANO

Desde su aparición en la década de los sesenta, la Espectroscopía de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano o Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) se ha convertido en una de las técnicas más usadas para el análisis cualitativo y cuantitativo en la industria agroalimentaria, farmacéutica y química, así como para otras aplicaciones en medicina, medio ambiente, etc., fundamentalmente debido a su rapidez y precisión.

Además de éstas, la tecnología NIRS presenta otras muchas ventajas que la hacen idónea para satisfacer las demandas actuales en materia de control de calidad y trazabilidad en la industria agroalimentaria, tales como: precisar escasa o nula preparación de la muestra; permitir el análisis de muestras muy diversas (multiproducto) y, al mismo tiempo, proporcionar resultados de múltiples analitos (multiatributo); ser una técnica no destructiva, por lo que la muestra puede almacenarse y ser utilizada de nuevo en posteriores análisis; no utilización de reactivos, por lo que no produce residuos que deban ser eliminados, siendo de ésta manera respetuosa con el medio ambiente; simplicidad en el uso, no se necesita un entrenamiento específico para su uso y posibilidad de incorporación a nivel del proceso productivo (Shenk y Westerhaus, 1995; Garrido et al., 2000).

No obstante, la tecnología NIRS no está exenta de limitaciones. La principal desventaja es la de que su uso más difundido es como técnica indirecta, esto es, necesita del desarrollo de calibraciones basadas en un método convencional usado como referencia (Shenk y Westerhaus, 1995). En aplicaciones cuantitativas, la forma de operar se basa en obtener la relación matemática óptima existente entre los datos espectrales y los datos proporcionados por el método de referencia, lo que a veces se ve dificultado por la falta de concordancia entre ambos, ya que los métodos de laboratorio y el equipo NIR podrían medir distintas entidades físicoquímicas. Generalmente, los métodos utilizados como referencia aportan información sobre las propiedades químicas y/o físicas del producto, mientras que la tecnología NIRS mide las vibraciones moleculares. A esto se une que dicha tecnología está influenciada por factores de

naturaleza no química, como pueden ser la temperatura, la humedad, el tamaño de partícula, etc.

Otro aspecto a considerar es la complejidad de la señal espectroscópica generada. En los primeros años de desarrollo de esta tecnología, uno de los problemas encontrados fue el manejo de la gran cantidad de datos espectrales obtenidos en una determinada aplicación NIRS, parte de los cuales son, a menudo, redundantes, dificultando considerablemente la interpretación de los resultados. No obstante, los avances en los métodos de compresión de datos y en los pretratamiento de la señal espectral permitieron superar esta limitación inicial.

Asimismo, cabe indicar que aunque su uso en rutina es simple e instantáneo, el desarrollo de calibraciones y modelos cualitativos o de clasificación requiere disponer de conocimientos en el ámbito quimiométrico y que el período de obtención de modelos robustos se puede prologar años, particularmente, en el caso de productos agroalimentarios.

En el momento actual, existen varios libros y/o monografías que describen de forma detallada la historia y las bases científico-técnicas de la Espectroscopía NIR (Williams y Norris, 2001; Roberts et al., 2004; Burns y Ciurczak, 2007; Ozaki et al., 2007). Es por ello por lo que, a continuación, únicamente se van a abordar los aspectos científicos más estrechamente relacionados con los objetivos y metodología del presente Trabajo.

1.1. DESARROLLO Y FUNDAMENTOS

La región del infrarrojo cercano, descubierta por Herschel (1800), se sitúa en el espectro electromagnético en la zona comprendida entre la región del visible y la del infrarrojo medio, concretamente entre las longitudes de onda de 800 a 2500 nm (Barton II, 1989). No obstante, su aplicación analítica en lo que se ha denominado Espectroscopía de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano o NIRS no comienza a desarrollarse hasta casi un siglo después.

Las primeras aplicaciones conocidas en el análisis de productos agroalimentarios fueron desarrolladas por Karl Norris y sus colaboradores, y se correspondieron con la determinación del contenido en humedad de cereales (Ben-Gera y Norris, 1968). Años más tarde, Norris et al. (1976) añaden una nueva dimensión al análisis NIR de productos agroalimentarios demostrando la posibilidad de estimar parámetros in vivo, como digestibilidad o ingesta en forrajes. No obstante, no fue hasta finales de los ochenta y, sobre todo, en los noventa, cuando la tecnología NIRS experimentó un mayor desarrollo en ámbitos muy diversos. Su expansión, se debió a las mejoras instrumentales acontecidas y, especialmente, al desarrollo de programas quimiométricos de tratamiento de la señal espectroscópica (Bokobza, 2004).

La tecnología NIR se define como una técnica espectroscópica vibracional basada en la absorción producida cuando la radiación proveniente del infrarrojo cercano vibra a la misma frecuencia específica que los enlaces moleculares del producto analizado (Miller, 2001; Shenk et al., 2001; Siesler, 2004).

Las absorciones moleculares en la región del infrarrojo cercano están causadas principalmente por enlaces del tipo $-CH$, $-NH$ y $-OH$, de forma que los principales componentes químicos de una muestra tienen propiedades de absorción en esa región del espectro. La suma de esas propiedades de absorción, combinadas con las conocidas como propiedades de radiación scatter (dispersa) de una muestra, determina el espectro de reflectancia difusa de esa muestra, el cual proporciona información sobre las propiedades químicas, físicas y sensoriales de la misma (Shenk et al., 2001).

Normalmente, la recogida de datos NIRS de una muestra determinada se realiza en la forma correspondiente al logaritmo de la inversa de la reflectancia o $\log(1/R)$. En otras ocasiones, también se expresa en términos de transmitancia, como $\log(1/T)$.

La forma más general de cuantificar la absorción de energía es a través de la medida de la energía reflejada (o transmitida). Esta energía sigue la ley de Lambert-Beer, de forma que el valor de la absorbancia (o transmitancia) es directamente proporcional a la concentración de la sustancia que absorba radiación (Williams y Norris, 2001; Workman, 2004).

Cada sustancia tiene un espectro NIR único (Workman y Shenk, 2004). Llamamos espectro NIR de una muestra a la representación gráfica de los valores de absorbancia a las diferentes longitudes de onda del rango espectral considerado. Cada espectro representa el ratio entre la medida fotométrica de la muestra a una determinada longitud de onda dividida por la medida de un material de referencia a la misma longitud de onda y para cada una de las longitudes de onda del rango espectral.

Las características generales de un espectro vienen influenciadas tanto por parámetros concernientes a la muestra a analizar (tamaño, forma y distribución de las partículas, índice de refracción, etc.), como por características físicas del instrumentos (geometría óptica del propio instrumento, compartimento de colocación de la muestra, grosor del cristal de la cápsula porta-muestras, etc.) (Shenk et al., 2001).

1.2. MODOS DE ANÁLISIS NIRS

La presentación de la muestra al instrumento NIR es uno de los factores más importantes que afectan a la medida espectroscópica (Kawano, 2004). Existen distintos modos de análisis NIRS dependiendo de la disposición de los detectores con respecto a la muestra. Shenk y Westerhaus (1995) diferencian entre los modos conocidos como transmisión, reflexión, transflectancia e interactancia-reflectancia (Figura 1).

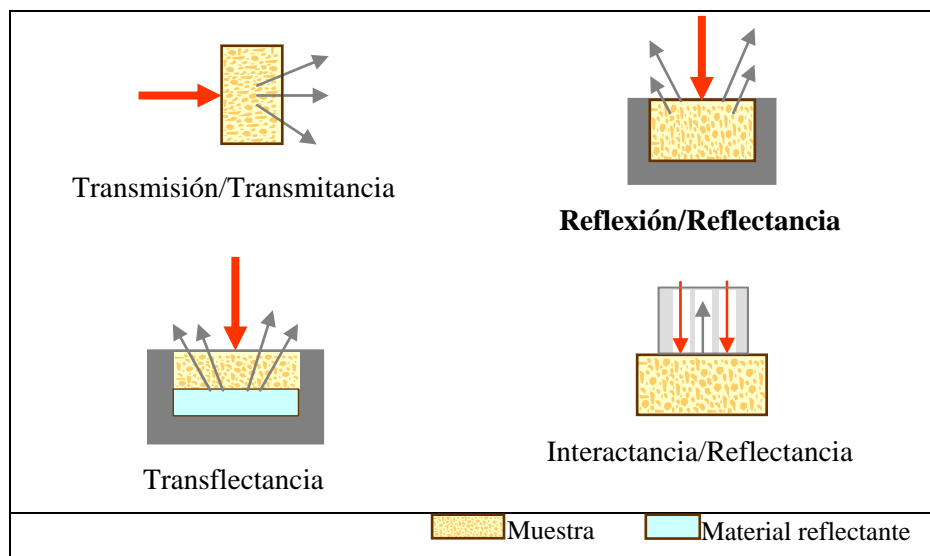


Figura 1.- Diseños ópticos básicos empleados en la instrumentación NIRS.

Fuente: Adaptado de Kawano (2004).

En Espectroscopía NIR, se habla de reflectancia y transmitancia cuando se trata de medidas de reflexión y transmisión en materias sólidas, respectivamente. En el caso de la transmisión, la luz incidente ilumina uno de los lados de la muestra, y la luz transmitida a su través es recogida por los detectores situados en el lado opuesto. En el caso de la reflexión, más conocida como reflectancia, la luz incidente ilumina la superficie de la muestra, la cual debe ser opaca, y los detectores recogen la reflectancia difusa procedente de la muestra. La transflectancia, por su parte, combina los dos modos anteriores. Así, la luz incidente es transmitida a través de la muestra hasta una superficie totalmente reflectante, que devuelve la radiación transmitida otra vez a través de la muestra hasta los detectores. Por ello, se la denomina también a esta modalidad “de doble transmisión”. Por último, la modalidad de interactancia-reflectancia hace alusión al uso de una sonda de fibra óptica constituida por anillos concéntricos, siendo el exterior de los mismos por el que se ilumina la muestra y el interior por el que se devuelve la energía reflejada de ésta. Para la recogida del espectro NIR, la sonda debe contactar con la superficie de la muestra (Kawano, 2004).

En el caso del análisis NIRS de productos sólidos y semi-sólidos se recomienda el uso de la modalidad de reflectancia (Kawano, 2004), por la que la luz incidente ilumina la superficie de la muestra. El haz de luz se difunde por la muestra para ser reflejado de vuelta a los detectores. En este caso, se cuantifica la energía NIR absorbida por los enlaces moleculares en su contacto con la muestra.

Puede ocurrir que las partículas demasiado gruesas de la muestra actúen como una superficie reflectante que no permita la penetración de la radiación en la muestra, llegando una información mínima al detector. Este es el caso de la reflectancia especular, que debe tratarse de reducir lo más posible, ya que no posee ninguna información de la muestra (Shenk y Westerhaus, 1995).

Brimmer y Hall (2001) consideran que la presentación de la muestra al instrumento es usualmente una de las mayores fuentes de error en las medidas NIR y, al mismo tiempo, una de las áreas en las que las actuaciones se traducen más fácilmente en mejoras de la medida realizada. Los mismos autores indican que mejorar la reproducibilidad de la forma de presentación y, asimismo, suprimir los efectos de otras

variables físicas que pueden afectar a la medida, como la temperatura, es de suma importancia en el desarrollo de un método NIR fiable.

Cuando se trata de muestras líquidas, la recogida de espectros NIRS se realiza habitualmente en la modalidad de transmisión. Este tipo de medidas presentan normalmente mayor repetibilidad que las medidas de reflexión. No obstante, las muestras líquidas también pueden ser analizadas en reflectancia, denominándose en este caso transflectancia, utilizando cápsulas con fondo reflectante o cápsulas de doble transmisión, cuya limpieza es además más fácil (Kawano, 2004). Para productos pastosos, generalmente con efectos de radiación dispersa acusados, se suele utilizar transmisión, si bien, con las potentes herramientas de tratamiento de la señal disponibles en la actualidad, que permiten corregir dichos efectos, cada día se usa más reflectancia y transflectancia para su análisis NIRS.

Para las medidas de reflectancia en sólidos, conseguir la repetibilidad de la forma de presentación es un reto complicado, ya que el espectro NIR obtenido con este tipo de medidas es la combinación de fenómenos de reflexión, refracción y difracción. En este caso, se persigue minimizar la variación en la presentación de la muestra, con el fin de conseguir una desviación típica de la repetibilidad en las medidas aceptable. Las muestras pulverulentas, finamente molidas y compactables uniformemente, son una de las matrices cuyo análisis NIRS es más fácil y preciso. Es por esta razón por que la tradicionalmente en el análisis NIR de productos sólidos se ha procedido a la molienda de la muestra para conseguir una mayor homogeneidad de la misma y, por consiguiente, una mayor repetibilidad en la toma de espectros NIR; si bien la molienda puede afectar a los constituyentes físico-químicos medidos (Brimmer y Hall, 2001).

En este sentido, la tendencia en el análisis NIRS desde inicios de los noventa es analizar el producto en forma intacta, sin molienda previa e incluso sin secado previo. Según indican Shenk et al. (2001), el análisis NIRS de muestras sólidas en intacto podría proporcionar, a nivel de precisión y exactitud de las aplicaciones desarrolladas, resultados similares a los obtenidos analizando el producto molido.

1.3. TIPOS DE INSTRUMENTOS NIRS

A principios de los años 40, con el desarrollo de la tecnología y de las técnicas de fabricación, el uso de la espectrofotometría despertó mayor interés entre los analistas químicos. Esto se tradujo en la aparición de una gama amplia de instrumentos que trabajaban en las regiones ultravioleta (UV) (190-350 nm), visible (350-750 nm), infrarrojo cercano (780-2500 nm) e infrarrojo medio y lejano. A finales de la década de los 40 y principios de los 50 proliferaron los trabajos de investigación que trataban del uso de instrumentos de infrarrojo (IR) en la identificación de productos químicos naturales o sintéticos. Sin embargo, la región del infrarrojo cercano fue considerada menos adecuada para este tipo de trabajos que las regiones correspondientes al IR medio y lejano.

El avance en el perfeccionamiento de la instrumentación NIRS ha ido evolucionando desde finales de los años 60 hasta nuestros días. Los cambios más relevantes que se han producido en los instrumentos NIRS son aquellos relacionados con la mejora de la relación señal/ruido, la precisión en la longitud de onda, la disponibilidad de diferentes sistemas de interacción de la radiación con la muestra y la existencia de una gran variedad de accesorios (cápsulas y cubetas de diferente forma, diferentes tipos de fibras ópticas para su utilización (“in line”, “on line” y “at line”, etc.). también ha sido importante la mejora de los programas informáticos para la obtención y tratamiento de los espectros NIR y la posibilidad de clonación entre diferentes instrumentos para la transferencia de ecuaciones o modelos quimiométricos entre ellos (Garrido et al., 1996; Workman y Burns, 2001; Brimmer et al., 2001; Garrido et al., 2003).

Básicamente, los equipos NIRS constan de: una fuente de energía radiante, un dispositivo para la selección y dispersión de las longitudes de onda, un sistema de presentación de muestras y un detector que convierte la energía radiante en señal eléctrica.

Con la ayuda de un amplificador de alta tensión y bajo ruido, la señal procedente de los detectores es amplificada. Posteriormente, esta señal es convertida en digital

mediante un convertidor analógico-digital y, por último, la señal digital es transmitida a un ordenador para su procesado (Shenk y Westerhaus, 1995).

Los instrumentos NIRS se pueden distinguir o clasificar atendiendo a diferentes criterios. Algunos de ellos son, por ejemplo, la configuración óptica del equipo, la velocidad de recogida del espectro, el tipo de fuente o de detector empleados, la técnica de muestreo (para mediar los efectos de presentación de las muestras), la protección contra polvo y humedad y la tolerancia a las vibraciones (Workman y Burns, 2001). El más utilizado de todos ellos es, sin duda, el que hace referencia al diseño óptico del equipo.

Una diferencia importante en el diseño óptico de equipos es la relativa al dispositivo utilizado para la discriminación de las longitudes de onda, pudiendo encontrar dos tipos de instrumentos: equipos de filtros y equipos de barrido continuo o monocromadores (Davies, 1999).

La diferencia entre ambos estriba en el número de longitudes de onda que son capaces de obtener a partir de la radiación emitida por la fuente de energía radiante. Así, los equipos de filtros pueden obtener únicamente un rango limitado de longitudes de onda (de 10 a 20 nm de amplitud) por cada filtro, existiendo entre 5 y 20 en un equipo, mientras que los cromadores realizan medidas a lo largo de toda la región NIR, proporcionando mayor información espectral, haciéndolos más versátiles en sus aplicaciones y sustituyendo casi por completo a los anteriores (Workman y Burns, 2001; Barton, 2002).

En la actualidad existe una amplia variedad de instrumentos NIRS de barrido continuo, cada uno con características particulares que determinan su aptitud para distintas aplicaciones, facilidad de uso y coste. Se distinguen desde monocromadores que utilizan una red de difracción móvil (grating) para la selección de longitudes de onda hasta equipos con tecnologías más actuales, como los de red de diodos (diode array, DA), los de transformada de Fourier (FT-NIR) o los basados en la tecnología MEMS, conocida así por sus siglas en inglés: Micro-Electro-Mechanical System.

En el primer caso, una red de difracción móvil consiste, básicamente, en un material óptico reflectante en cuya superficie hay numerosos surcos paralelos. Su función es dispersar la radiación policromática procedente de la fuente de energía en las distintas longitudes de onda que la componen. El movimiento de esta red es necesario para conseguir que las longitudes de onda pasen secuencialmente a través de una rendija de salida y se dirijan hacia la muestra (Brimmer et al., 2001).

Los instrumentos que incorporen este dispositivo de dispersión se denominan pre-dispersivos por producir la separación de las longitudes de onda antes de que alcancen la muestra a analizar (Workman y Burns, 2001).

En la Figura 2 se puede observar el esquema correspondiente a un equipo de red de difracción móvil.

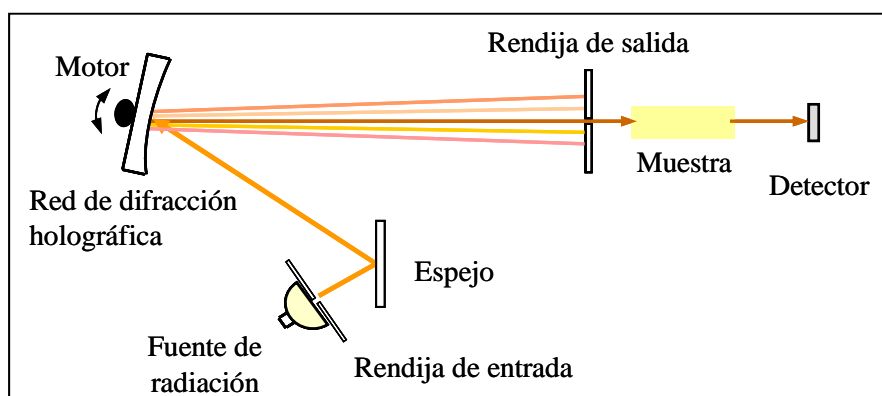


Figura 2. Esquema de un equipo de redes de difracción (grating) móviles

Fuente: Adaptado de Brimmer et al., (2001).

La necesidad creciente de realizar medidas espectrales de muestras en movimiento ha llevado al desarrollo en los últimos años de los denominados instrumentos de red de diodos. Estos equipos, al igual que los de redes de difracción móviles, utilizan para la dispersión de las longitudes de onda una red de difracción (grating). A pesar de esta característica común, existen importantes diferencias entre ambos diseños. En los equipos DA, el rayo de luz incide en la red, que es fija, después de interactuar con la muestra. Posteriormente, la detección de todas las longitudes de

onda es realizada por una matriz de detectores (fotodiodos) individuales. Estos sistemas presentan la ventaja de no tener partes móviles (Figura 3).

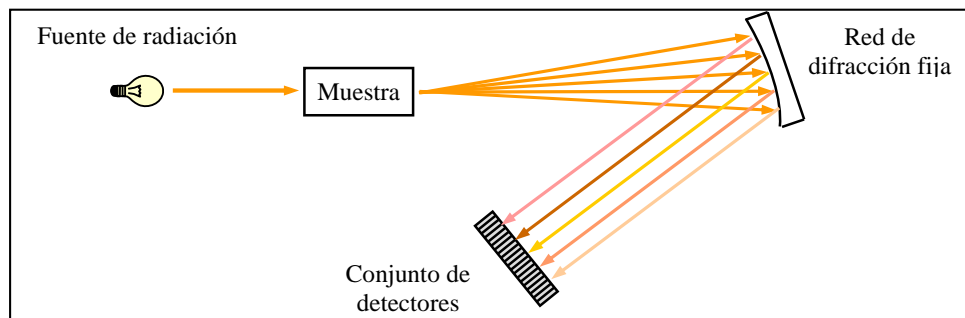


Figura 3. Esquema de un equipo de red de diodos (DA)

Fuente: Adaptada de Brimmer et al., 2001).

Los equipos de red de diodos se denominan post-dispersivos, ya que la luz interacciona con la muestra y, posteriormente, se separan en longitudes de onda individuales (Workman y Burns, 2001).

La ventaja principal de este tipo de espectrofotómetros es que cada detector en la red registra su propia parte del espectro y, debido a que todos los detectores trabajan en paralelo, la totalidad del espectro es adquirida simultáneamente, provocando una velocidad de análisis superior (Greensill y Walsh, 2002; Saranwong y Kawano, 2005).

Por último, señalar el desarrollo de los instrumentos NIRS portátiles basados en la tecnología MEMS, la cual ofrece enormes ventajas en cuanto a tamaño y robustez de los instrumentos, rango espectral y bajo coste de fabricación (Coates y Ramani, 2006). La Espectroscopía de Transformación Digital (DTS: Digital Transform Spectroscopy) es una nueva técnica en la cual el espectro recogido de una muestra determinada es dispersado a través de un chip o dispositivo MEMS. Aplicando el voltaje apropiado a los distintos píxeles es posible controlar qué píxeles van a difractar la luz en su región espectral correspondiente y cuáles son los encargados de reflejar la luz. Por lo tanto, el dispositivo MEMS puede controlar la luz para difractarla en determinadas regiones del espectro, mientras que en otras es reflejada. La luz reflejada es posteriormente recogida y recombinada (usando una rendija fija) en un único foto-detector de InGaAs, siendo

ésta la principal ventaja respecto a los instrumentos de red de diodos, ya que permite construir equipos más competitivos en relación a su coste (Day et al., 2005).

Dado que en los últimos años se ha incrementado el interés por desarrollar aplicaciones de la tecnología NIRS en el lugar de origen de la muestra (en campo), la utilización de estos equipos puede resultar muy beneficiosa, ya que funcionan con baterías, son de tamaño reducido y carecen de elementos móviles que pudieran dañarse o desalinearse en el traslado.

1.4. ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICO

El término “quimiometría” fue acuñado por primera vez por Svante Wold en 1972 (Heise y Winzen, 2004), experimentando un desarrollo rápido a partir de este momento. Wold la definió como *la disciplina de la química analítica que mediante el uso de métodos estadísticos, matemáticos y otros de lógica formal, diseña o selecciona procedimientos y experiencias de forma óptima y/o trata de obtener la máxima información química relevante a partir de análisis químico.*

La gran superposición de las bandas de absorción de los diferentes constituyentes presentes en la muestra, la gran cantidad de datos existentes y la elevada información redundante (colinealidad) provocan una baja selectividad de los datos espectrales NIR. Cuando todo ello concurre, es difícil poder llegar a establecer una ecuación capaz de estimar una propiedad físico-química de una muestra con el valor de absorbancia a una única longitud de onda. Por ello, es muy poco útil en la tecnología NIRS la aproximación univariante, tradicionalmente empleada en el resto de técnica espectroscópicas (Osborne et al., 1993; Workman, 2001; Naes et al., 2002; Heise y Winzen, 2004).

El análisis multivariante podría definirse como los diferentes métodos, ya sean estadísticos, matemáticos o gráficos, empleados en el análisis de datos, siempre y cuando se consideren para dicho análisis varias variables de forma simultánea (Martens y Naes, 1989; Martens y Martens, 2001). En el caso de la tecnología NIRS, el análisis multivariante se empleará para estimar cualquier propiedad de la muestra (físico-

química, fundamentalmente) a partir de múltiples variables espectrales (valores de absorbancia a diferentes longitudes de onda) (Shenk y Westerhaus, 1995).

Uno de los mayores problemas cuando se aplican los modelos quimiométricos al análisis NIRS es que el espectro de una muestra es dependiente de numerosos factores, siendo algunos de ellos incontrolables. Así, por ejemplo, las muestras sólidas, que suelen ser medidas mediante reflectancia difusa, como consecuencia del efecto scatter o radiación dispersa, producen espectros diferentes, aún cuando se realizan dos medidas seguidas de la misma muestra (Duckworth, 2004).

Para separar la información existente en el espectro NIR debido a las variaciones de origen físico (textura, tamaño y geometría de las partículas, etc.), de aquellas variaciones que aporten información meramente química, se han desarrollado numerosos métodos de pretratamiento de la señal espectroscópica NIRS. Dado que el origen del problema es la presencia del efecto scatter o de radiación dispersa, a los métodos se les suele agrupar bajo el nombre de tratamientos de corrección de scatter (Shenk y Westerhaus, 1995; Duckworth, 2004). Los métodos más usuales para el pretratamiento de los datos espectroscópicos son el suavizado, la derivación, la corrección multiplicativa de scatter, Estándar Normal Variate (SNV) y Detrend (D) (Shenk y Westerhaus, 1995; Naes et al., 2002; Duckworth, 2004; Heise y Winzen, 2004).

1.4.1. Técnicas quimiométricas de análisis cuantitativo

El análisis cuantitativo es el más extendido dentro de las aplicaciones de la tecnología NIRS, y consiste básicamente en estimar la concentración de un analito en las muestras que constituyen el grupo de calibración, estableciendo para ello la relación matemática (ecuación de calibración) existente entre los valores de absorbancia en la región NIR y la concentración de dicho analito. Para ello, la concentración de este analito ha sido previamente determinada mediante un método de referencia. Una vez establecida la ecuación de calibración, ésta permite predecir el contenido de otras muestras de similares características a las incluidas en el colectivo de calibración (Shenk y Westerhaus, 1995; Brimmer y Hall, 2001).

La exactitud de las predicciones NIRS obtenidas con los modelos desarrollados depende principalmente de tres factores, que son la exactitud del dato de referencia, el tamaño y distribución del colectivo de calibración empleado y el método de ajuste seleccionado. Las muestras de calibración usadas deben ser representativas de toda la variabilidad, que posteriormente puede ser encontrada en el análisis de rutina diario de nuevas muestras. Es obvio que la representatividad, en el caso de productos agroalimentario es un proceso complejo y costoso y que, a mayor heterogeneidad de las muestras de calibración, es necesario disponer de un colectivo de mayor tamaño. Distintos autores señalan que las características que definen al colectivo de calibración empleado determinan tanto la estabilidad como la exactitud de las ecuaciones desarrolladas (Shenk y Westerhaus, 1991; Shenk et al., 2001; Williams, 2001).

Cuando se manejan datos espectroscópicos NIR, tradicionalmente se asume que se puede aplicar la Ley de Lambert-Beer (Hruschka, 2001), la cual establece que los valores de absorbancia están relacionados de una forma lineal con las concentraciones de los constituyentes de interés para cada muestra. De acuerdo con esto, la mayoría de las técnicas matemáticas aplicadas para el desarrollo de calibraciones, se basan en métodos lineales de ajuste, tales como la Regresión Lineal Múltiple (RLM) o Multiple Linear Regression (MLR), la Regresión por Componentes Principales (RCP) o Principal Component Regression (PCR) y la Regresión mediante Mínimos Cuadrados Parciales (RMCP) o Partial Least Squares Regression (PLS), siendo esta última la más empleada en aplicaciones agroalimentarias (Shenk y Westerhaus, 1996).

La RLM, en sus diferentes variantes (“step-up” o “step-wise”), realiza el ajuste del modelo utilizando unas pocas variables espectrales seleccionadas del espectro NIR completo. Las longitudes de onda seleccionadas son aquellas que presentan una correlación más elevada entre el valor de absorbancia a una longitud de onda determinada y el dato de referencia correspondiente (Marten y Naes, 1989; Workman, 2001).

Por su parte, la RCP y la RMCP son métodos de calibración que trabajan con el espectro completo, aunque sintetizando el mismo en una serie de variables linealmente independientes para evitar la colinealidad de los datos (Shenk y Westerhaus, 1995). El uso de estas técnicas presenta, entre otras muchas, la ventaja de no tener que seleccionar

a priori las longitudes de ondas con las que desarrollar el modelo (Mark y Workman, 1991; Workman, 2001).

La RCP utiliza exclusivamente la información espectral para calcular unas nuevas variables ortogonales entre sí, que se denominan componentes principales, y con estas nuevas variables realiza un ajuste de regresión múltiple. La RMCP es un método de calibración similar a la RCP. Mediante la aplicación de este método se pretende generar unas nuevas variables, combinación lineal de los datos espectrales originales, y emplear estas nuevas variables en el desarrollo de la ecuación de regresión, utilizando para el cálculo de las nuevas variables no sólo la información espectral, sino asimismo el valor de referencia del parámetro medido para cada muestra (Westerhaus et al., 2004).

Una variante de la RMCP es la Regresión mediante Mínimos Cuadrados Parciales Modificada (RMCPM) o Modified Partial Least Squares Regresión (MPLS), en la que los residuos NIR a cada longitud de onda, obtenidos después de calcular cada factor, son estandarizados (divididos por la desviación estándar de los residuales a esa longitud de onda) antes de calcular el siguiente factor (Shenk y Westerhaus, 1995). Según indican estos mismos autores, este método es a menudo más preciso y estable que el algoritmo RMCP.

Cuando se desarrollan métodos de regresión mediante RMCPM, Shenk y Westerhaus (1995) recomiendan el uso de la validación cruzada para seleccionar el número de factores o términos de la regresión. El procedimiento de validación cruzada consiste en dividir el colectivo de calibración en grupos (4, 5, 6, etc., según el número de muestras de calibración), cada uno de los cuales validará en diferentes pases la ecuación desarrollada con el resto de muestras.

La validación cruzada permite que todas las muestras sean usadas para calibrar y validar, y previene el sobreajuste del modelo (Shenk y Westerhaus, 1995; Williams, 2001).

Los errores de validación de cada grupo son presentados mediante el estadístico Error Típico de Validación Cruzada (ETVC). Este estadístico, además, es considerado

como el mejor estimador de la capacidad predictiva de una ecuación y es equivalente al error típico de predicción (ETP) medio de 10 grupos de validación elegidas al azar (Shenk y Westerhaus, 1996).

No obstante, en muchas de las aplicaciones actuales y potenciales de las medidas espectroscópicas NIR, la relación que se pretende modelar no es siempre lineal. Esto significa que en ocasiones los métodos de regresión clásicos no son la opción óptima, existiendo distintos algoritmos de ajuste no lineal como son LOCAL, redes neuronales artificiales (Artificial Neuronal Networks, ANN) o análisis mediante vectores de soporte (Support Vector Machine, SVM) (Vandeginste et al., 1998; Naes et al., 2002).

Barton et al. (2000) indican que cuando se trabaja con colectivos muestrales muy amplios y diversos, con grandes rangos de variación para los parámetros medidos, la precisión de las predicciones normalmente disminuye con el uso de calibraciones universales por la presencia de no-linealidad en los datos. Una posible solución para el manejo en calibración de grandes poblaciones muestrales sería utilizar aproximaciones “locales”, las cuales permiten el manejo de la no-linealidad existente a través de la producción de modelos lineales “locales”.

Según Shenk et al. (1997) el mejor método de predicción, en teoría, debe ser aquel que calcule una calibración específica para cada muestra a predecir, usando un pequeño colectivo muestral de aprendizaje constituido por muestras semejantes a la desconocida, seleccionadas dentro de una amplia biblioteca. Dichos autores señalan que este método, denominado de “regresión local”, combina las ventajas de las calibraciones globales al usar una amplia base de datos muestral para cubrir un extenso dominio del producto, junto con la exactitud obtenida con el desarrollo de calibraciones específicas.

Las aproximaciones de calibración local pueden mejorar los resultados obtenidos con estrategias de calibración global por dos motivos distintos (Sinnaeve et al., 1994). Por un lado, como se ha comentado, pueden modelizar la no-linealidad presente en los datos, a través de la selección de subgrupos de muestras que presenten rangos de variabilidad para el parámetro analizado más restringidos, para los que la aplicación de técnicas de regresión lineal sí es adecuada. Pero además, pueden aprovechar la falta de

homogeneidad de las muestras de la librería espectral de partida, usando información para la selección de los colectivos de calibración local que, por ejemplo, tengan similares tamaños de partícula o similares contenidos en humedad que la muestra desconocida que se quiere predecir.

Dentro del marco de definición general de los fundamentos de la calibración local existe una amplia variación entre los distintos métodos propuestos, tanto en la forma de seleccionar el colectivo de calibración a usar como en la forma de llevar a cabo la regresión posterior (Anderssen et al., 2003; Fearn y Davies, 2003).

En la bibliografía se describen fundamentalmente tres tipos de aproximaciones locales, que son las denominadas CARNAC (Comparison Analysis Using Restructured Near Infrared and Constituent Data), LWR (Locally-Weighted Regression) y el algoritmo LOCAL patentado por Shenk y Westerhaus. Una revisión exhaustiva de estas tres aproximaciones y de otras estrategias de calibración no lineal (redes neuronales artificiales) puede encontrarse en Pérez-Marín et al. (2007).

1.4.2. Técnicas quimiométricas de análisis cualitativo

El análisis cualitativo NIRS persigue el desarrollo de modelos de clasificación de muestras en base a sus características espectrales, agrupándolas junto a aquellas muestras con espectros similares y separándolas de otras con espectros distintos (Downey, 1994 y 1996).

Se puede decir, por tanto, que la mayoría de los métodos de análisis cualitativo se basan en medidas de similitud entre características espectrales de unas muestras y otras. Dicha similitud puede ser expresada en función de distintas herramientas como correlación espectral, operaciones lógicas o cálculo de distancias (distancia Euclídea ó distancia de Mahalanobis) (Lavine, 2000; Ortiz y Sarabia, 2000; Martens y Martens, 2001). Existen muchas medidas de la distancia. Las más común es la distancia Euclídea o variaciones de la misma, como la distancia Euclídea al cuadrado. Estas medidas se caracterizan porque no presentan datos estandarizados y plantean el problema de que pueden dar soluciones muy distintas con sólo cambiar la escala de medida de la variable.

En el análisis cualitativo NIRS, normalmente, se utiliza la distancia de Mahalanobis, la cual incorpora un procedimiento de estandarización de los datos, si bien presenta el problema de que en el caso de que exista un grupo de variables muy correlacionadas, éstas podrían poseer un peso desproporcionado en la formación de los grupos (Heise y Winzen, 2004).

Dentro del análisis cualitativo NIRS se pueden distinguir principalmente tres aproximaciones (Kramer et al., 2004). La primera de ellas hace referencia al análisis discriminante, en el que varios algoritmos son utilizados para determinar si una muestra pertenece a un grupo de muestras conocidas a través de comparaciones espectrales. En segundo lugar, se habla de métodos de reconocimiento de pautas, usados para determinar el grado de similitud entre el espectro de una muestra desconocida y una biblioteca espectral. Finalmente, la tercera de las estrategias se refiere a la interpretación espectral mediante asignación de bandas características.

A su vez, todos los métodos de clasificación pueden ser agrupados en dos categorías: supervisados y no supervisados, dependiendo de si es conocida o no a priori, respectivamente, la asignación de clases del colectivo de aprendizaje (Lavine, 2000; Naes et al., 2002; Heise y Winzen, 2004).

Los métodos no supervisados no requieren ningún conocimiento previo de los objetos para realizar su agrupamiento o clasificación, sino que ellos mismos definen las clases. El objetivo de este tipo de técnicas es identificar tendencias dentro de los colectivos de aprendizaje y construir subgrupos o clases en base a ellas (Naes et al., 2002).

Dentro de este tipo de procedimientos no supervisados, el más común es el análisis de “cluster” o análisis de conglomerados, que es una técnica de clasificación multivariante, cuya finalidad es definir las pautas naturales de agrupamiento dentro de colectivos, de forma que los perfiles de las muestras englobadas dentro de un mismo grupo sean muy similares entre sí (cohesión interna del grupo) y los de las muestras de grupos diferentes sean distintos (aislamiento externo del grupo). Otros métodos de reconocimiento de pautas no supervisados son las redes neuronales de Kohonen, los métodos de análisis factorial, el método MST (“Minimal Spanning Tree”) e, incluso,

también es considerado como tal el análisis en componentes principales (Lavine, 2000; Otto, 2007).

Por su parte, en los métodos supervisados sí se dispone de información (tanto de datos espectrales como de la variable categórica) acerca de los grupos o categorías existentes en el colectivo de muestras. La clasificación se basa en el aprendizaje previo del sistema, utilizando colectivos de calibración o entrenamiento en los que las clases y la pertenencia de las distintas muestras a ellas ya se encuentran definidas (Vandeginste et al., 1998).

Existe un amplio abanico de procedimientos quimiométricos para realizar el análisis cualitativo supervisado. En principio, entre estos métodos se puede hacer una primera distinción entre los orientados a la discriminación y aquellos dirigidos al modelado de clases. La principal diferencia entre ambos tipos radica en que los métodos de análisis discriminante dividen el espacio en tantas regiones como clases se hayan definido en el colectivo de aprendizaje y clasifican toda muestra desconocida dentro de alguna de estas clases, mientras que las técnicas de modelado permiten clasificar las muestras en una clase, en varias (cuando sus espacios se solapan) o no clasificarla, al establecer límites entre cada clase y el resto del universo (Vandeginste et al., 1998).

Entre los métodos discriminantes más aplicados en el ámbito de la Espectroscopía NIR se encuentran el análisis discriminante lineal (ADL), análisis discriminante cuadrático (ADC), análisis discriminante de Fisher o análisis discriminante canónico, análisis KNN (K-nearest neighbour) y el análisis discriminante basado en regresión PLS (Partial Least Squares). Por otro lado, los métodos basados en el modelado de clases son más usualmente el SIMCA (Soft Independent Modelling of Class Analogy) y las redes neuronales artificiales (Vandeginste et al., 1998; Naes et al., 2002; Hopke, 2003).

El análisis discriminante mediante regresión PLS es una de las aproximaciones cualitativas más ampliamente utilizadas para tal fin en aplicaciones NIRS a productos agroalimentarios. Es por ello por lo que, a continuación, se revisará de forma más exhaustiva este procedimiento.

Los principios y procedimientos usados para realizar un análisis discriminante mediante regresión con datos NIRS son esencialmente idénticos a los usados para el análisis cuantitativo. La principal diferencia entre ambos es que las variables en este caso son discretas (pertenencia o no pertenencia a un grupo) y no continuas (concentración de un analito, por ejemplo), como ocurre en el análisis cuantitativo (Naes et al., 2002; Heise y Winzen, 2004; Kramer et al., 2004).

En síntesis, el análisis discriminante mediante PLS utiliza un colectivo de entrenamiento para el desarrollo de un modelo de predicción o calibración cualitativa que pueda aplicarse posteriormente a la clasificación de nuevas muestras desconocidas. En este tipo de aproximación, las variables Y (clases definidas) utilizadas no son variables continuas, sino que son variables categóricas artificiales o ficticias (“dummy”), creadas asignando el valor 0 a la muestra perteneciente a la categoría A y el valor 1 a la muestra perteneciente a la categoría B (Naes et al., 2002; Heise y Winzen, 2004; Kramer et al., 2004). Según indican Naes et al. (2002), la elección de los valores 0/1 para las variables ficticias es arbitraria, pudiendo ser considerados asimismo otros pares de valores como -1/1, 1/2, 0/100.

Cuando existen dos clases a discriminar se aplica normalmente el algoritmo PLS1, ya que existe una única variable independiente que toma para cada muestra del colectivo de aprendizaje un valor de 0 ó 1. El criterio para la clasificación de muestras desconocidas en una u otra categoría dependerá de que el valor predicho se aproxime más a 0 ó a 1, respectivamente. Si existen más de dos clases a discriminar, sólo se podría usar PLS1 si se fuesen dividiendo las clases en grupos de dos de forma estratificada. Otra aproximación sería el uso del algoritmo de regresión multivariante PLS2 (Naes et al., 2002). Cuando se aplica PLS2 la significación de las variables ficticias cambia ligeramente. En esta aproximación, la variable independiente se convierte en un vector de clases, de forma que cada muestra tenga un valor ed 1 en la clase a la que pertenece y un valor de 0 para el resto de clases (Vandeginste et al., 1998; Naes et al., 2002; Heise y Winzem, 2004).

Los criterios para la clasificación de muestras desconocidas, cuando se aplica el análisis discriminante mediante regresión PLS2, son diversos. Naes et al. (2002) y Kramer et al. (2004) indican que las muestras desconocidas deben ser asignadas al

grupo en el que presenten un mayor valor predicho de la variable discriminatoria; mientras que otros autores señalan que el valor medio de las variables discriminatorias puede usarse como límite discriminatorio (Downey, 1994; McElhinney et al., 1999). Otra aproximación similar descrita por Murray et al. (2001) sería considerar lo que se denomina factor de incertidumbre para calcular el límite de discriminación. De esta forma se establece una mínima diferencia por la cual si el valor dado a una muestra en su clase y el valor que se le da en la/s otra/s clase/s es inferior al valor de la mínima diferencia, la muestra será clasificada de forma incierta.

El tamaño de los colectivos que componen cada clase es otro de los aspectos clave que afectan a los resultados de discriminación obtenidos. Downey (2000) señala que el análisis discriminante mediante regresión PLS funciona mejor cuando las categorías establecidas presentan estructuras, dispersión y covarianzas similares; en caso contrario, el autor apunta que es mejor utilizar otras aproximaciones cualitativas para la clasificación. Por su parte, Naes et al. (2002) indican que cuando las clases existentes están desbalanceadas en cuanto a número de muestras, el límite de separación entre clases estará desplazado, de forma que el modelo clasificará más muestras en el grupo mejor representado.

1.5. APLICACIONES DE LA TECNOLOGÍA NIRS AL CONTROL DE CALIDAD Y TRAZABILIDAD DE FRUTAS Y HORTALIZAS

La tecnología NIRS ha sido ampliamente utilizada para el análisis, control de calidad y trazabilidad de numerosos productos agroalimentarios. Los primeros trabajos se desarrollaron a finales de los años sesenta para determinar humedad, proteína y grasa en: granos y semillas (Norris y Hart, 1965), carne (Ben-Gera y Norris, 1968b) y soja (Ben-Gera y Norris, 1968a).

Mientras que, tradicionalmente, la tecnología NIRS ha sido utilizada para la predicción de parámetros de composición química en distintos alimentos, también puede ser utilizada para la determinación de parámetros más complejos como textura o características sensoriales (Cozzolino et al., 2005), e incluso para la detección de fraudes y/o autenticación de productos, como la diferenciación entre aceites de oliva de distintos orígenes (Downey et al., 2003).

Diferentes trabajos de revisión (Roberts et al., 2004; Ozaki et al., 2007; Wang y Paliwal, 2007; Huang et al., 2008; Woodcock et al., 2008) recogen multitud de aplicaciones NIRS desarrolladas sobre distintos productos agroalimentarios para la predicción de parámetros de calidad interna, discriminación entre variedades y/o especies, defectos internos, etc. Así por ejemplo, Woodcock et al. (2008) recogen los últimos desarrollos en la aplicación de la tecnología NIR en la industria agroalimentaria. Para ello, revisan el trabajo desarrollado por distintos autores en los últimos diez años sobre seis grandes grupos de alimentos: i) productos lácteos (leche y queso); ii) bebidas no alcohólicas (zumos de frutas y té); iii) granos de cereales y harina; iv) vino; v) carne, y vi) frutas y hortalizas. Los autores concluyen diciendo que la tecnología NIRS puede ser considerada como una herramienta analítica eficaz, capaz de garantizar unos niveles elevados de calidad y seguridad, en los alimentos y bebidas disponibles en el mercado.

No obstante, el análisis NIRS de frutas y hortalizas presenta una serie de limitaciones entre las que se pueden destacar las siguientes (Kays et al., 2000):

- Alto contenido de humedad, lo que dificulta rescatar información espectral relevante de otros atributos de interés.
- El desarrollo científico e instrumental NIRS ha estado basado, tradicionalmente, en productos secos y molidos.
- Existen variaciones importantes a nivel de piezas individuales (gradientes de azúcar, variedades, etc.).
- Dadas las variaciones en tamaño y forma de frutas y hortalizas, es necesario la utilización de equipos de geometría óptica variable, que se adapten a dichas variaciones.
- Son productos perecederos, lo que dificulta la posibilidad de simultanear análisis de referencia y análisis NIRS.
- No existe tradición en la determinación analítica de la calidad de frutas y hortalizas, debido a la práctica inexistencia de pago por calidad en dichos productos.

Asimismo, es importante destacar que la puesta a punto de aplicaciones NIRS para la predicción de parámetros de composición química y/o la identificación de

variedades, etc. en frutas y hortalizas frescas, es un problema complejo que conlleva un diseño experimental cuidadoso para la creación de librerías espectrales de muestras “auténticas”, que reflejen estados de madurez diferentes, la influencia de factores agronómicos, fisiológicos, la evolución en almacenamiento, etc. (Garrido et al., 2003). Además, según sea el objetivo de la investigación y según sea el producto, se deberá formular un planteamiento distinto; siendo necesaria la optimización de todo el procedimiento de forma específica para cada producto (Sánchez y Pérez-Marín, 2011).

A pesar de ello, la ventaja que presenta la región del infrarrojo cercano respecto a otras regiones del infrarrojo, esto es, poseer una mayor relación señal/ruido, permite utilizar mayores pasos ópticos (Peiris et al., 1998) de forma que la radiación penetra en el interior del producto haciendo posible la evaluación y determinación de parámetros internos de calidad. Esto unido a las características de alta velocidad de respuesta, técnica no destructiva y con posibilidad de ser incorporada en la línea de procesado, la convierten en una tecnología idónea a implementar en el sector de frutas y hortalizas.

Además, a diferencia de los análisis por vía húmeda, y dado su carácter multiatributo, permite estudiar simultáneamente diversos indicadores específicos de un producto, ya sean parámetros de calidad interna (Delwiche et al., 2008; Flores et al., 2009; Paz et al., 2009; Antonucci et al., 2011; Gracia y León, 2011) u otros más específicos como fecha de recolección (Yang et al., 2011), presencia de residuos químicos (Sánchez et al., 2010), variedad (Pérez-Marín et al., 2010; Luo et al., 2011), identificación del origen geográfico (Galtier et al., 2007), evolución de la calidad en campo y poscosecha (Pérez-Marín et al., 2011; Sánchez et al., 2011; Yang et al., 2011), como muestran los artículos citados, así como los distintos trabajos de revisión publicados (Slaughter y Abbott, 2004; Nicolai et al., 2007; Saranwong y Kawano, 2007; Lin y Ying, 2009; Sánchez y Pérez-Marín, 2011).

Sin embargo no se han encontrado referencias acerca del empleo de la tecnología NIRS para la predicción del color interno de melón, siendo este parámetro de calidad muy importante para la determinación del momento de cosecha óptimo.

El análisis de la información disponible pone de manifiesto que el sector de la industria del melón, al igual que en el resto de frutas y hortalizas, demanda

metodologías de control de calidad no destructivo, capaces de determinar parámetros tradicionales así como todos aquellos que proporcionen información que garantice la calidad y la seguridad de sus productos.

Las características de la tecnología NIRS, así como las conclusiones recogidas en los diferentes trabajos de revisión anteriormente mencionados, hacen que ésta sea considerada una técnica muy apropiada para satisfacer dicha demanda.

Dada la escasez de trabajos previos en el análisis NIRS de melones se plantea la necesidad de estudiar y profundizar en la viabilidad del uso de esta tecnología para el control de parámetros de calidad de dicho producto.

Por todas estas razones, se planteó el trabajo de investigación con los objetivos que se recogen en el apartado correspondiente.

1.5.1. Profundidad de penetración de la luz en alimentos

La penetración de la radiación NIR está directamente relacionada con la textura de la muestra. Algunos autores han demostrado como la intensidad de la luz detectada en fruta desciende exponencialmente con la profundidad de la muestra (Birth, 1978; Chen, 1980; Greensill, 2000; Lammertyn, 2000) y, es menor, a mayor rango de longitud de onda. Además, es importante que la radiación NIR penetre los tejidos de manera suficiente para poder establecer parámetros de calidad relacionados con la composición interna de los productos a evaluar (Lammertyn, 2000).

Desde 1980, se han llevado a cabo numerosos estudios de penetración de la luz para distintos productos con distintos instrumentos NIRS y a distintas longitudes de onda (Tabla 1).

Tabla 1. Profundidad de penetración de la luz en distintas frutas y hortalizas.

Producto	Instrumento	Longitud de onda (nm)	Profundidad (mm)	Autores
Manzana “Jonagold”	Red de diodos	500-800 700-900 900-1900	5,5 4 2-3	Lammertyn et al. (2000)
Patata	Hand-held AOTF- NIR	1000-2300	1	López et al. (2013)
Piña	Monocromador	760-1300	20	Guthrie y Walsh, (1999)

Capítulo 2

Capítulo 2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de presente Trabajo Fin de Máster es analizar la viabilidad de la Espectroscopía de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano (NIRS) para la determinación no destructiva de parámetros de calidad interna en melón destinados a determinar el momento óptimo de su recolección del melón.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los objetivos específicos son los que se indican a continuación:

1. Optimización del análisis del análisis de melón intacto empleando instrumentos NIR.
2. Evaluación de distintos algoritmos de regresión (MPLS y LOCAL) para la predicción de parámetros del color interno (a^* , b^* , C^* y h^*) en melones Galia y Cantaloupe.

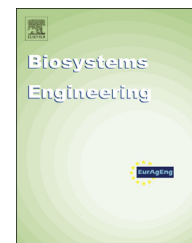
Capítulo 3

Capítulo 3. RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. FIRST STEPS TO PREDICTING PULP COLOUR IN WHOLEMELONS USING NEAR-INFRARED REFLECTANCE SPECTROSCOPY. Biosystems Engineering (2014) 123, 12-18

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/issn/15375110

Research Paper

First steps to predicting pulp colour in whole melons using near-infrared reflectance spectroscopy



María-Teresa Sánchez^{a,*}, Irina Torres^a, María-José De la Haba^a, Dolores Pérez-Marín^{b,*}

^aDepartment of Bromatology and Food Technology, University of Córdoba, Campus of Rabanales, 14071 Córdoba, Spain

^bDepartment of Animal Production, University of Córdoba, Campus of Rabanales, 14071 Córdoba, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 February 2014

Received in revised form

16 April 2014

Accepted 28 April 2014

Published online

Keywords:

Near-infrared spectroscopy

Melon

Internal colour

MPLS regression

Local algorithm

Near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) technology was used for the non-destructive measurement of melon-pulp colour (a^* , b^* , C^* and h^*), one of the main indicators of ripeness and quality. A total of 432 Cantaloupe and Galia melons were used in the construction of calibration models, testing various spectral signal pretreatments and both linear and non-linear regression algorithms. The coefficient of determination (r^2) and the standard error of cross-validation (SECV) obtained for parameters a^* (0.96, 2.16), b^* (0.85, 3.25), C^* (0.82, 3.76) and h^* (0.96, 3.64) in intact fruit confirmed the *a priori* viability of NIRS technology with modified partial least squares (MPLS) regression for measuring melon ripeness and quality. Moreover, the application of a local algorithm improved the ability of models to predict all the internal-colour quality parameters studied. These results suggest that NIRS technology is a promising tool for monitoring ripening in melons and thus for establishing the optimal harvesting time.

© 2014 IAgrE. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Harvesting melons at their ideal stage is especially critical to their storage life and eating quality. Although sweetness is the key attribute affecting eating-quality, other properties such as aroma, flesh colour and texture—depending on the fruit concerned—are also indispensable indicators of overall quality (Vallone et al., 2013).

The quality of muskmelons (*Cucumis melo*) at harvest is traditionally estimated on the basis of a number of subjective

external features, chief among which are background colour, net development, and stem abscission (Cantwell & Kasmire, 2002; Portela & Cantwell, 1998; Simandjuntak, Barrett, & Wrolstad, 1996).

Cantaloupes may be harvested when the fruit begins to separate from the stem, when the external colour beneath the netting begins to change from green to yellow-green (because the skin colour typically changes from grey to dull green when immature, becomes deep uniform green at maturity, and then light yellow at full ripeness), and when the net is well

* Corresponding author. Tel.: +34 957 212576; fax: +34 957 212000.

** Corresponding author.

E-mail addresses: teresa.sanchez@uco.es (María-T. Sánchez), dcperez@uco.es (D. Pérez-Marín).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2014.04.010>

1537-5110/© 2014 IAgrE. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

developed with a waxy covering (Cantwell, 1996). To ensure excellent eating quality, it is critical to harvest melons at a sufficiently advanced stage when the sugars have already accumulated in the fruit, since postharvest changes in sugar concentration are small (Lester & Shellie, 1992; Pratt, Goeschl, & Martin, 1977). Similarly, although skin colour may change after harvest, pulp colour changes very little, so that harvesting at the appropriate stage of maturity is crucial to good internal visual quality (Cantwell, 1996).

Honeydew melons are harvested by maturity, which is very difficult to judge since the abscission zone, a valuable harvest criterion for Cantaloupes, does not form until the fruit is overripe (Pratt et al., 1977). Maturity classes are grouped predominantly by changes in 'ground colour' from greenish to cream with yellow accents. Cantwell (1996) noted that Honeydew melons may be considered mature but unripe when the external colour is white with a greenish aspect, the peel is slightly fuzzy, there is no aroma, when the melon splits when cut, and when the pulp is crisp. They may be classed as mature and ripening when the external colour is white with traces of green, the peel is not fuzzy but slightly waxy, the aroma changes from slight to noticeable, the melon splits when cut and the flesh is crisp. The characteristics of ripe Honeydews are as follows: ground colour is creamy white with yellow accents, peel is clearly waxy, the characteristic aroma is noticeable and the blossom-end yields slightly to pressure. Pratt et al. (1977) report that ripening in Honeydew melons is associated with increased respiration and ethylene production rates, aroma development and softening.

The Galia melon is a hybrid originating from a Cantaloupe-Honeydew cross, it is larger than a Cantaloupe, and with deep green flesh. Ripeness is measured not by softness at the stem but rather by colour and fragrance (Escribano & Lazaro, 2012).

Growers and consumers generally estimate melon quality in terms of aroma, softness to the touch and surface colour (Lester, 2006). However, while these are important for establishing product quality and optimal harvesting time, there are other key criteria which cannot be assessed externally, and require non-destructive methods in order to avoid damage to the fruit. Pulp colour is one such criterion, as Cantwell (1996) noted, autumn and winter grown Cantaloupe melons may be ripe on the inside but have a green peel colour. Cantwell and Portela (1998) highlighted the link between pulp colour and surface defects such as sunburned areas and large ground spots (poorly netted areas where melons touch the ground), reporting that average pulp chroma (orange colour) values were highest in good-quality pieces, intermediate in ground-spot pieces, and lowest in pieces from sunburned areas.

Growers and the industry would therefore clearly benefit from fast, precise and, above all, non-destructive techniques for predicting pulp colour. Near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) technology not only appears to potentially meet these requirements, but also offers a number of other advantages which could make it ideal for meeting current demands in terms of control and traceability: low cost per sample analysed; little or no need for sample preparation; the ability to analyse a wide range of products and parameters; a high degree of reproducibility and repeatability. NIRS can also be built into in-line processes, and – since no reagents are required – it produces no waste.

NIR spectroscopy has been used successfully to predict colour in animal products such as fresh breast muscle (Abeni & Bergoglio, 2001), deboned chicken breast (Liu, Lyon, Windham, Lyon, & Savage, 2004), and beef (Andrés et al., 2008; Cecchinato, De Marchi, Penasa, Albera, & Bittante, 2011; Prieto, Andrés, Giráldez, Mantecón, & Lavín, 2008; Prieto et al., 2009), as well as for external colour in mandarins and oranges (Sánchez, De la Haba, & Pérez-Marín, 2013; Sánchez, De la Haba, Serrano, & Pérez-Marín, 2012).

Although the prediction of internal colour is a key factor in establishing optimal harvesting time in melon, no published research appears yet to have addressed this criterion, since the majority of studies have focused on the determination of SSC (Flores et al., 2008; Guthrie, Liebenberg, & Walsh, 2006; Long & Walsh, 2006).

The overall aim of this study was to evaluate the ability of NIR technology to predict melon-pulp colour (a^* , b^* , C^* and h^*), a quality parameter strongly influencing consumer acceptance or rejection of the product.

2. Material and methods

2.1. Fruit samples

A total of 432 melons – 220 Cantaloupe (*Cucumis melo* L. var. *reticulatus* Naud., Vulcano cultivar) and 212 Galia (*Cucumis melo* L. var. *reticulatus* Naud., Siglo, Deneb, Esmeralda and Solarking cultivars) – were harvested in glasshouses belonging to the Provincial Fruit and Vegetable Harvesters' and Exporters' Association in Almeria, Spain.

On arrival at the laboratory, fruit was promptly placed in cold storage, at 5 °C and 95% relative humidity. Prior to each measurement, fruit samples were left in order to allow the near-surface temperature to stabilise at the laboratory temperature of 20 °C.

2.2. Reference data

Internal colour was analysed on the pulp surface using a Minolta Chroma Meter CR-400 (Minolta Co. Ltd., Osaka, Japan). Two readings were taken in the equatorial region of the fruit; readings were averaged for each sample. Colour was expressed as CIELAB (a^* , b^* , C^* , h^*) colour space, where a^* and b^* define red-greenness and blue-yellowness, respectively (CIE, 2004). Chroma (C^*) and hue angle (h^*) were calculated as $(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ and $\tan^{-1}(b^*/a^*)$, respectively. Illuminant C and 2° standard observer measurements were made in all cases.

2.3. NIR Analysis

NIRS analysis was performed using a Perten DA-7000, Flexi-Mode diode array spectrometer (Perten Instruments North America, Inc., Springfield IL, USA), operating between 400 and 1700 nm with a 5 nm scanning interval. The main technical specifications of the instrument are reported in Table 1.

Fruits were scanned using the instrument in the standard upright position. Samples were irradiated from below by the light source. The distance of measurement between the sample and the instrument was 120 mm, with a large, circular

Table 1 – Basic technical characteristics of the diode array spectrophotometer Perten DA-7000 VIS + NIR.

Properties	Diode array instrument
Detector type	Silicon and InGaAs Arrays each consist of 76-elements
Wavelength range (nm)	Dual array: 400–1700 nm
Dispersion element	One stationary reflective holographic grating
Spectral resolution (average)	Silicon array 7.5 nm; InGaAs Array 10 nm
Output resolution	5 nm by interpolation
Photometric noise	<30 micro-absorbance units
Spectral data rate	600 scans per second
Reference	Internal: continuous dual-beam correction; External: Spectralon® for base line
Chopper modulation frequency	30 reference/sample cycles per second
Operating environment	Temperature 10–35 °C; Humidity 35–80% non condensing; Max. altitude 2500 m
Dispersion	Post
Light source	Full spectrum. Tungsten-halogen bulb
Analysis mode	Reflectance

surface viewing area (diameter 127 mm). The horizontal distance between the light source and the detectors was 80 mm.

Each fruit was placed centrally upon the fruit holder, with the stem–stylar axis horizontal. Three separate spectral measurements were made, after rotating the sample through 120° each time. The three spectra were averaged to provide a mean spectrum for each intact fruit.

2.4. Spectral repeatability

All chemometric calculations were performed using WinISI software package version 1.50 (Infrasoft International, Port Matilda, PA, USA). Spectrum quality was evaluated using the root mean squared (RMS) statistic (Shenk & Westerhaus, 1995a, 1996). This statistic indicates the similarity between different spectra of a single sample, in this case between the three spectra collected per sample. An admissible limit for spectrum quality and repeatability was determined following the procedure described by Martínez, Garrido, De Pedro, & Sánchez (1998) to calculate the standard deviation (STD) limit from the RMS statistic and obtain an RMS cut-off value.

2.5. Population structuring and detection of spectral outliers prior to calibration

Principal component analysis (PCA) was performed on a set of $N = 432$ samples in order to decompose and compress the data matrix. After PCA, the centre of the spectral population was determined in order to detect outlier samples. The Mahalanobis distance (GH) was calculated between each sample and the centre; samples with a GH value greater than 3 were considered outliers (Shenk & Westerhaus, 1995a). As spectral pre-treatments, the standard normal variate (SNV) plus detrending (DT) (Barnes, Dhanoa, & Lister, 1989) procedure was used to remove the multiplicative interferences of scatter, and one derivative mathematical treatment was performed: window-wise filtering (1,5,5,1) where the first digit is the order

of the derivative, the second is the gap over which the derivative is calculated, the third is the number of data points in a running average or smoothing and the fourth is the second smoothing (ISI, 2000; Shenk & Westerhaus, 1995b).

2.6. Construction and validation of prediction models by modified partial least squares regression

Once spectral outliers (9 of the original 432 samples) had been removed, a set consisting of 423 samples of the two different melons (Cantaloupe and Galia) was used to construct calibration models. The set was divided into two: a calibration set containing about 75% of the samples (320 samples) and a test set containing the remaining 25% (103 samples) (Table 2). These samples were selected following the method proposed by Shenk and Westerhaus (1991) using the Centre algorithm included in the WinISI software to calculate the global Mahalanobis distance (GH). Samples were ordered based on the GH to the centre of the population, and three of every four were selected to form part of the calibration set.

Modified partial least squares (MPLS) regression (Shenk & Westerhaus, 1995a) was tested for the prediction of colour (a^* , b^* , C^* , h^*) in melons in the 535–1650 nm range. Signal noise at the beginning (400–535 nm) and end (1650–1700 nm) of the spectral range was eliminated. To prevent over-fitting, six cross-validation groups were used.

For each analytical parameter, various mathematical treatments were evaluated for scatter correction, including SNV and DT methods (Barnes et al., 1989). Furthermore, four derivative mathematical treatments were tested in the development of NIRS calibrations: 1,5,5,1; 2,5,5,1; 1,10,5,1 and 2,10,5,1 (Shenk & Westerhaus, 1995b).

The statistics used to select the best equations were: standard error of calibration (SEC), coefficient of determination of calibration (R^2), standard error of cross-validation (SECV), coefficient of determination for cross-validation (r^2), RPD or ratio of the standard deviation of the original data (SD) to SECV, and the coefficient of variation (CV) or ratio of the SECV to the mean value of the reference data for the calibration set. These latter two statistics enable SECV to be standardised, facilitating the comparison of the results obtained with sets of different means (Williams, 2001).

The best models obtained for the calibration set, as selected by statistical criteria, were subjected to evaluation using samples not involved in the calibration procedure. A test set composed of 103 samples, not used previously in the

Table 2 – Range, mean and standard deviation (SD) for the parameters studied in calibration (Calibration 320) and validation (Validation 103) sets.

Parameter	Set	Range	Mean	SD
a^*	Calibration	–19.56–18.91	1.99	11.55
	Validation	–14.56–17.17	2.32	11.62
b^*	Calibration	12.98–50.67	33.36	8.52
	Validation	13.53–47.19	33.77	8.89
C^*	Calibration	13.51–53.44	35.27	8.87
	Validation	13.99–49.78	35.68	9.24
h^*	Calibration	66.11–125.11	90.81	19.06
	Validation	69.07–114.87	90.37	19.08

model, was evaluated. Models were evaluated following the protocol outlined by Windham, Mertens, and Barton (1989).

2.7. Construction of prediction models using the local algorithm

The Local algorithm operates by searching for, and selecting, samples in large databases containing spectra similar to the sample being analysed. The selected samples are then used to compute a specific calibration equation, based on PLS regression, for predicting the constituents of an unknown sample (Shenk et al., 1997).

For each parameter, an optimisation design for the Local algorithm was set up by varying the number of calibration samples (k) from 40 to 100 in steps of 20 and the number of terms (l) from 10 to 14 in steps of 2. This yielded a factorial design of $4 \times 3 = 12$ runs. Finally, the number of PLS factors discarded was set to the first four.

As in MPLS calibrations, other factors needed to be optimised, including signal pretreatments (light scatter correction and derivatives) and the spectral region used. During Local algorithm development, the spectral region and signal pretreatments indicated in Section 2.6 of this paper were used.

The effect of the different settings on the performance of the Local algorithm was evaluated by comparing the standard error of prediction (SEP), the coefficient of regression for external validation (r^2), the bias, and the bias-corrected standard error of prediction SEP(c). Furthermore, the accuracy of prediction of Local algorithm was compared to the SEP, r^2 and bias of MPLS prediction.

3. Results and discussion

3.1. Spectral repeatability

Optimisation of spectrum quality and repeatability is crucial in order to develop robust and accurate models. Statistical methods such as a defined RMS cut-off limit can be useful for this purpose. The RMS cut-off was calculated as indicated in Section 2.4. The mean STD for the samples analysed was 62,497 $\mu\log(1/R)$, representing an RMS cut-off of 71,441 $\mu\log(1/R)$. Any sample whose triplicated screening scans yielded an RMS above this value was eliminated and repeated until values fell below that limit, thus ensuring a high degree of spectrum repeatability.

No reference to the calculated RMS cut-off value for intact melons has been found in the literature, although this statistic is essential to the generation of representative libraries.

The mean spectrum of the three replicates of each sample was used for further analysis.

3.2. Spectral features

Typical $\log(1/R)$ spectra for intact Cantaloupe and Galia melons, obtained on the Perten DA-7000 instrument, are shown in Fig. 1. The main absorption peaks coincided for both melon varieties at 680 nm, 970 nm, 1190–1210 nm and 1440 nm.

In the visible region of the spectrum, absorbance spectra measured on Cantaloupe and Galia melons were similar in

shape, with peaks occurring at positions corresponding to known chlorophyll absorption bands. Strong absorption by chlorophyll *a* was evident at 680 nm, with a shoulder at 630 nm due to absorption by chlorophyll *b* (McGlone, Jordan, & Martinsen, 2002; McGlone, Martinsen, Clark, & Jordan, 2005). In addition, red pigments (carotenoids and anthocyanins) have a typical absorption band in the 490–550 nm region of the visible spectrum (Strayer, 1995).

In the NIR region, aqueous hydroxyl functional groups were detected at 760, 840, 970 and 1440 nm, as is usually the case for fruit, and particularly for melons, which are 90% water (McGlone et al., 2005; Williams, 2001). Williams (2001) reports a sugar-related absorption band at around 1200 nm.

3.3. Calibration development

Cross-validation statistics for the best models obtained for the prediction of internal colour (a^* , b^* , C^* and h^*) in intact Cantaloupe and Galia melons using the MPLS algorithm are shown in Table 3.

For colour parameter a^* , the MPLS method yielded the best calibrations using D1 $\log(1/R)$. Vis-NIR spectroscopy models displayed remarkable predictive ability for this parameter ($r^2 = 0.96$, SECV = 2.16, RPD = 5.30); Shenk and Westerhaus (1996) suggest that an r^2 value greater than 0.9 indicates excellent quantitative information. The RPD value (5.30) demonstrated the robustness and power of the calibration models obtained for a^* .

Non-destructive prediction of a^* in melon pulp is highly valuable, since this parameter is linked to pulp carotene — particularly β -carotene — content (Reid, Lee, Pratt, & Chichester, 1970). During ripening, the pulp attains the maximum orange colour typical of the Cantaloupe melon; a^* is thus a good indicator of maturity in melons (Simandjuntak et al., 1996). Conversely, declining a^* values are associated with loss of the typical orange colour hue during storage (Beaulieu, 2005).

No reference has been found in the literature to the measurement of a^* in the pulp of intact melons using NIRS technology. However, Sánchez et al. (2012) used a diode-array instrument (Corona 45 VIS/NIR, spectral range: 380–1700 nm) and a hand-held MEMS device (Phazir 2400, spectral range: 1600–2400 nm) to measure external colour in intact oranges, reporting results poorer than those obtained

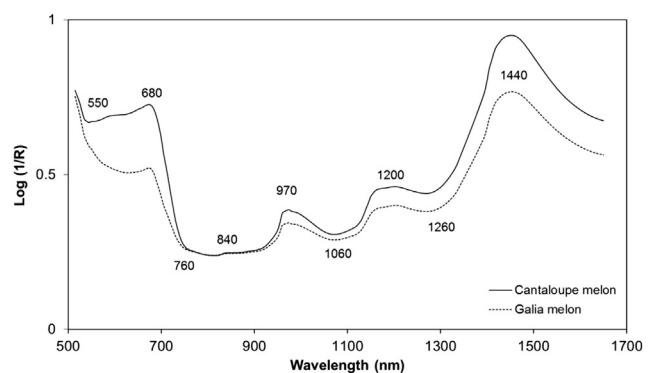


Fig. 1 – Typical $\log(1/R)$ spectra for Cantaloupe and Galia melons.

Table 3 – Calibration statistics for the best equations obtained for the prediction of internal pulp colour (a^* , b^* , C^* and h^*) in Cantaloupe and Galia melons using MPLS regression.

Parameter	Mathematical treatment	Mean	SD	Range	SEC	R^2	SECV	r^2	RPD	CV	SEL
a^*	1,5,5,1	2.19	11.44	−14.26–18.66	1.96	0.97	2.16	0.96	5.30	98.63	0.37
b^*	1,5,5,1	33.49	8.48	12.98–47.40	2.96	0.88	3.25	0.85	2.61	9.70	0.59
C^*	1,5,5,1	35.35	8.76	13.51–50.77	3.40	0.85	3.76	0.82	2.33	10.63	0.62
h^*	1,5,5,1	90.63	18.99	67.16–115.62	3.29	0.97	3.64	0.96	5.22	4.01	0.25

here (RPD = 1.92, CV = 3.78% for the Corona 45 VIS/NIR; RPD = 1.49, CV = 4.76% for the Phazir 2400).

Performance statistics inferior to those recorded here were also obtained by [Sánchez et al. \(2013\)](#) when using the MEMS spectrophotometer for the on-tree measurement of external colour in mandarins (RPD = 2.04, CV = 33.30%).

The calibration model in the literature displaying the greatest predictive capacity for the b^* colour parameter ($r^2 = 0.85$; SECV = 3.25; RPD = 2.61) was obtained using D1 log (1/R); quantification was good, according to the [Shenk and Westerhaus \(1996\)](#) classification.

There are no published reports on the measurement of b^* in intact melon using NIRS technology, only [Sánchez et al. \(2013\)](#) reported RPD value of 1.43 and CV value of 4.22% for the prediction of this parameter in intact mandarins using a MEMS instrument in the spectral range 1600–2400 nm. However, this parameter is linked to the behaviour of photosynthetic pigments such as chlorophyll and carotenoids during melon ripening, and may thus act as an indicator of ripeness and thus of optimal harvesting time ([Martínez-Madrid, Martínez, Pretel, Serrano, & Romojaro, 1999](#)); non-destructive measurement of b^* is therefore of considerable value.

As [Table 3](#) shows, good predictive ability ($r^2 = 0.82$, SECV = 3.76, RPD = 2.33) was recorded for the measurement of C^* ([Shenk & Westerhaus, 1996](#)).

Values for C^* , like those of a^* and b^* , increase significantly during ripening, due to higher carotenoid levels, and thus also provide a useful indicator of fruit ripeness ([Sánchez et al., 2013](#)).

The predictive capacity of the best model for the h^* colour parameter may be considered excellent ($r^2 = 0.96$, SECV = 3.64, RPD = 5.22) in terms of the recommendations made by [Shenk and Westerhaus \(1996\)](#).

Hue angle increases with maturity in melons, indicating a change from light to darker orange in Cantaloupe and a decline in greenness in Galia ([Simandjuntak et al., 1996](#)).

Although NIRS technology appears not to have been used hitherto for measuring C^* and h^* in melons, [Sánchez et al. \(2013\)](#) used NIRS to measure these colour parameters in on-

tree mandarins during ripening, obtaining models whose predictive capacity was inferior to that recorded here both for C^* (RPD = 1.68, CV = 7.38%) and for h^* (RPD = 1.31, CV = 9.03%).

3.4. Comparison of internal colour prediction in melons using the local algorithm versus modified partial least squares regression

The Local algorithm was also used to predict internal quality-related parameters, and results for prediction of the 103-sample external validation set were compared with those obtained using MPLS regression.

SEP, SEP (c), bias and r^2 values obtained with the best mathematical treatment for each parameter in the 12 runs (3 values for l and 4 for k) are shown in [Table 4](#). The table also shows the combination of k and l yielding the lowest SEP for each parameter ($k = 60$ and $l = 10$ for a^* ; $k = 40$ and $l = 14$ for b^* ; $k = 40$ and $l = 12$ for C^* , $k = 40$ and $l = 10$ for h^*).

For predicting the external validation set, the Local algorithm used only 40 samples to predict b^* , C^* and h^* , and 60 samples for a^* ; rather than using all 320 samples in the calibration set (as was the case for MPLS regression), only those samples whose spectra were considered representative of the calibration set were used.

The results obtained using the Local algorithm were better than those achieved with MPLS regression ([Table 4](#)), although both strategies yielded values for the coefficient of determination which were comfortably over the minimum of $r^2 \geq 0.60$ recommended by [Windham, Mertens, and Barton \(1989\)](#). For a^* prediction, the Local algorithm improved the coefficient of determination by 2% and reduced the prediction error by 25%. The coefficient of determination for b^* parameter was also improved by about 2% and the prediction error reduced by over 5%. For C^* and h^* , the accuracy and precision of the predictions obtained using the Local algorithm were greater than those obtained using MPLS regression ([Table 4](#)). Values for r^2 were improved by 2% and 3%, while prediction error was reduced by 4% and 38%, for C^* and h^* , respectively.

Table 4 – Validation statistics for the best models for predicting pulp colour in Cantaloupe and Galia melons using MPLS and Local algorithms.

Parameter	Regression method	Mathematic treatment	Factors	SEP	Bias	SEP (c)	r^2	Slope
a^*	MPLS	1,5,5,1	15	2.45	−0.25	2.45	0.96	1.00
	Local ($k = 60$)	1,5,5,1	10 (−4)	1.84	−0.01	1.85	0.98	1.02
b^*	MPLS	1,5,5,1	14	3.33	0.46	3.31	0.86	0.96
	Local ($k = 40$)	1,5,5,1	14 (−4)	3.12	−0.15	3.13	0.88	1.03
C^*	MPLS	1,5,5,1	14	3.64	0.30	3.65	0.84	0.96
	Local ($k = 40$)	1,5,5,1	12 (−4)	3.45	−0.14	3.47	0.86	1.03
h^*	MPLS	1,5,5,1	14	3.74	0.30	3.74	0.96	0.97
	Local ($k = 40$)	1,5,5,1	10 (−4)	2.31	0.30	2.30	0.99	1.01

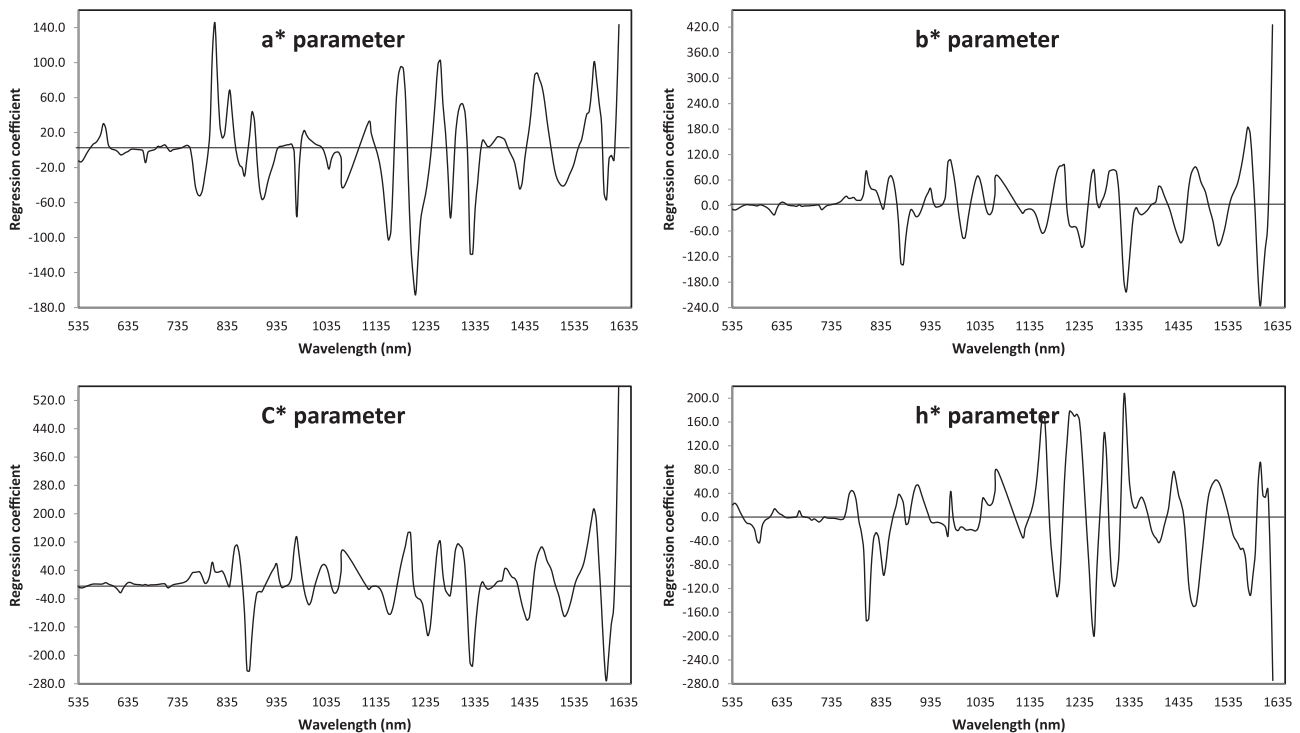


Fig. 2 – Regression coefficients for pulp colour related parameters of Cantaloupe and Galia melons.

Use of the Local algorithm thus yielded a slight improvement in r^2 values for all parameters, as well as minimising the prediction error for NIRS models constructed to predict internal-colour parameters in melons. However, it is important to consider that in the case of Local algorithm the best outcome of several predictions was compared to the single prediction of MPLS.

3.5. Effective wavelengths for predicting colour-related parameters

The regression coefficients corresponding to the best models obtained for predicting maximum levels of colour parameters are shown in Fig. 2. These plots show the areas across the spectral range where variance has influenced computing of the model to a greater or lesser extent, and the direction of that influence (positive or negative).

For predicting a^* , representation of the regression coefficients used in constructing the calibration equation using MPLS regression shows that the areas of the spectrum exerting greatest weight on model fitting were 620 nm and 670 nm in the visible region, and the 950 nm, 1225 nm, 1335 nm and 1460 nm areas relating to the absorption of sugars and water (Fig. 2). The same areas exerted greatest weight for parameters b^* , C^* and h^* (Fig. 2). Thus, these wavelengths are likely to be the most sensitive for colour-related parameters in intact melons.

4. Conclusions

NIRS technology, using a diode array spectrometer, proved to be suitable for assessing internal colour-related parameters in the pulp of intact melons, allowing ripeness to be evaluated

not only in terms of external visual appearance but also in terms of internal colour. This could lead to major changes in harvesting techniques for melons, by providing farmers with a precise and accurate indication of the fruit's internal quality, thus enabling selective harvesting. It must be highlighted that the results obtained here should be considered the first step in the fine-tuning of NIRS for monitoring the ripening process in melons. Over the coming years, recalibrations may be required in order to enhance the robustness of the models obtained.

Acknowledgements

This research was funded by the Andalusian Regional Government under the Research Excellence Program 2005 (Project No. 3713 'Safety and Traceability in the Food Chain using NIRS'). The authors thank Ms Katherine Flores-Rojas for her technical assistance.

REFERENCES

- Abeni, F., & Bergoglio, G. (2001). Characterization of different strains of broiler chicken by carcass measurements, chemical and physical parameters and NIRS on breast muscle. *Meat Science*, 57, 133–137.
- Andrés, A., Silva, A., Soares-Pereira, A. L., Martins, C., Bruno-Soares, A. M., & Murray, I. (2008). The use of visible and near infrared reflectance spectroscopy to predict beef *M. longissimus thoracis et lumborum* quality attributes. *Meat Science*, 78, 217–224.

- Barnes, R. J., Dhanoa, M. S., & Lister, S. J. (1989). Standard Normal variate transformation and de-trending of near infrared diffuse reflectance spectra. *Applied Spectroscopy*, 43, 772–777.
- Beaulieu, J. C. (2005). Within-season volatile and quality differences in stored fresh-cut Cantaloupe cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8679–8687.
- Cantwell, M. (1996). Case study: quality assurance for melons. *Perishables Handling Newsletter Issue*, 85, 10–12.
- Cantwell, M., & Portela, S. (1998). The importance of raw material quality for fresh-cut products: the impact of melon defect as an example. *Perishables Handling Quarterly Issue*, 96, 2–3.
- Cantwell, M., & Kasmire, R. E. (2002). Postharvest handling systems: fruit vegetables. In A. Kader (Ed.), *Postharvest technology of horticultural crops* (pp. 407–421). Oakland, California: University of California, Division of Agriculture and Natural Resources.
- Cecchinato, A., De Marchi, M., Penasa, M., Albera, A., & Bittante, G. (2011). Near-infrared reflectance spectroscopy predictions as indicator traits in breeding programs for enhanced beef quality. *American Society of Animal Science*, 89, 2687–2695.
- CIE. (2004). *Colorimetry* (3rd ed.). Vienna: Commission Internationale De L'Eclairage.
- Escribano, S., & Lazaro, A. (2012). Sensorial characteristics of Spanish traditional melon genotypes: has the flavour of melon changed in the last century? *European Food Research and Technology*, 234, 581–592.
- Flores, K., Sánchez, M. T., Pérez-Marín, D. C., López, M. D., Guerrero, J. E., & Garrido, A. (2008). Prediction of total soluble solid content in intact and cut melons and watermelons using NIR spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 16, 91–98.
- Guthrie, A., Liebenberg, C. J., & Walsh, K. B. (2006). NIR model development and robustness in prediction of melon fruit total soluble solids. *Australian Journal of Agricultural Research*, 57, 411–418.
- ISI. (2000). *The complete software solution using a single screen for routine analysis, robust calibrations and networking. Manual*. FOSS NIRSystems/Tecator. Silver Spring, MD: Infrasoft International.
- Lester, G. (2006). Consumer preference quality attributes of melon fruits. *Acta Horticulture*, 712, 175–182.
- Lester, G., & Shellie, K. C. (1992). Postharvest sensory and physicochemical attributes of Honeydew melon fruits. *HortScience*, 27, 1012–1014.
- Liu, Y., Lyon, B. G., Windham, W. R., Lyon, C. E., & Savage, E. M. (2004). Prediction of physical, colour and sensory characteristics of broiler breasts by Visible/Near Infrared Reflectance Spectroscopy. *Poultry Science*, 83, 1467–1474.
- Long, R., & Walsh, K. (2006). Limitations to the measurement of intact melon total soluble solids using near infrared spectroscopy. *Australian Journal of Agricultural Research*, 57, 403–410.
- Martínez, M. L., Garrido, A., De Pedro, E. J., & Sánchez, L. (1998). Effect of sample heterogeneity on NIR meat analysis: the use of the RMS statistic. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 6, 313–320.
- Martínez-Madrid, M. C., Martínez, G., Pretel, M. T., Serrano, M., & Romojaro, F. (1999). Role of ethylene and abscisic acid in physicochemical modifications during melon ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 5285–5290.
- McGlone, V. A., Jordan, R. B., & Martinsen, P. J. (2002). Vis/NIR estimation at harvest of pre and post-storage quality indices for Royal Gala apple. *Postharvest Biology and Technology*, 25, 135–144.
- McGlone, V. A., Martinsen, P. J., Clark, C. J., & Jordan, R. B. (2005). On-line detection of Brownheart in Braeburn apples using near infrared transmission measurements. *Postharvest Biology and Technology*, 37, 142–144.
- Portela, S. I., & Cantwell, M. I. (1998). Quality changes of minimally processed Honeydew melons stored in air or controlled atmosphere. *Postharvest Biology and Technology*, 14, 351–357.
- Pratt, H. K., Goeschl, J. D., & Martin, F. W. (1977). Fruit growth and development, ripening, and the role of ethylene in the 'Honeydew' muskmelon. *Journal American Society Horticultural Science*, 102, 203–210.
- Prieto, N., Andrés, S., Giráldez, F. J., Mantecón, A. R., & Lavín, P. (2008). Ability of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to estimate physical parameters of adult steers (oxen) and young cattle meat samples. *Meat Science*, 79, 692–699.
- Prieto, N., Ross, D. W., Navajas, E. A., Nute, G. R., Richardson, R. I., Hyslop, J. J., et al. (2009). On-line application of visible and near infrared reflectance spectroscopy to predict chemical–physical and sensory characteristics of beef quality. *Meat Science*, 83, 96–103.
- Reid, M. S., Lee, T. H., Pratt, H. K., & Chichester, C. O. (1970). Chlorophyll and carotenoid changes in developing muskmelons. *Journal American Society Horticultural Science*, 95, 814–815.
- Sánchez, M. T., De la Haba, M. J., & Pérez-Marín, D. (2013). Internal and external quality assessment of mandarins on-tree and at harvest using a portable NIR spectrophotometer. *Computers and Electronics in Agriculture*, 92, 66–74.
- Sánchez, M. T., De la Haba, M. J., Serrano, I., & Pérez-Marín, D. (2012). Application of NIRS for nondestructive measurement of quality parameters in intact oranges during on-tree ripening and at harvest. *Food Analytical Methods*, 6, 826–837.
- Shenk, J. S., & Westerhaus, M. O. (1991). Population structuring of near infrared spectra and modified partial least squares regression. *Crop Science*, 31, 1548–1555.
- Shenk, J. S., & Westerhaus, M. O. (1995a). *Analysis of agriculture and food products by near infrared reflectance spectroscopy*. Silver Spring, MD: NIRSystems, Inc. Monograph.
- Shenk, J. S., & Westerhaus, M. O. (1995b). *Routine operation, calibration, development and network system management*. Silver Spring, MD: NIRSystem, Inc. Manual.
- Shenk, J. S., Westerhaus, M. O., & Berzaghi, P. (1997). Investigation of a LOCAL calibration procedure for near infrared instruments. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 5, 223–232.
- Shenk, J. S., & Westerhaus, M. O. (1996). Calibration the ISI way. In A. M. C. Davies, & P. C. Williams (Eds.), *Near infrared spectroscopy: The future waves* (pp. 198–202). Chichester: NIR Publications.
- Simandjuntak, V., Barrett, D. M., & Wrolstad, R. E. (1996). Cultivar and maturity effects on muskmelon (*Cucumis melo*) color, texture, and cell wall polysaccharide composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 71, 282–290.
- Strayer, L. (1995). *Biochemistry* (4th ed.). New York: W.H. Freeman and Company/Worth Publishers.
- Vallone, S., Sivertsen, H., Anthon, G. E., Barrett, D. M., Mitcham, E. J., Ebeler, S. E., et al. (2013). An integrated approach for flavour quality evaluation in muskmelon (*Cucumis melo* L. *reticulatus* group) during ripening. *Food Chemistry*, 139, 171–183.
- Williams, P. C. (2001). Implementation of near-infrared technology. In P. C. Williams, & K. H. Norris (Eds.), *Near-infrared technology in the agricultural and food industries* (pp. 145–169). St. Paul, Minnesota: AACCC, Inc.
- Windham, W. R., Mertens, D. R., & Barton, F. E., II (1989). Protocol for NIRS calibration: sample selection and equation development and validation. In G. C. Martens, J. S. Shenk, & F. E. Barton, II (Eds.), *Agriculture handbook: Vol. 643. Near infrared spectroscopy (NIRS): Analysis of forage quality* (pp. 96–103). Washington, DC: US Government Printing Office.

Capítulo 4

Capítulo 4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en los diferentes ensayos que constituyen este Trabajo de Investigación, permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. La aplicación de la tecnología NIRS, junto con el uso de diferentes estrategias quimiométricas de regresión, permite la predicción de parámetros de calidad interna en melón.
2. La adecuada exactitud obtenida en la validación de los modelos NIRS desarrollados mediante el uso del algoritmo LOCAL, para la predicción de parámetros de color interno, hacen que la tecnología NIRS sea considerada como una herramienta apropiada para la predicción en rutina del color del melones analizados en forma intacta.
3. Se confirma la viabilidad de la tecnología NIRS para la caracterización en campo y en cuestión de segundos de melones analizados en forma intacta. Las expectativas de uso e incorporación de esta tecnología al sector son muy prometedoras, si bien es necesario el estudio y adaptación de los diseños ópticos y de los algoritmos de tratamiento de la señal más adecuados para la implementación real de la tecnología en medidas “*on-site*” en campo y “*on-line*” en líneas de procesado.

Capítulo 5

Capítulo 5. BIBLIOGRAFÍA

- Anderssen R.S., Osborne B.G. y Wesley I.J. 2003. The application of localization to near infrared calibration and prediction through partial least squares regression. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 11, 39-48.
- Antonucci F., Pallottino F., Paglia G., Palma A., D'Aquino S. y Mensatty, P. 2011. Non-destructive estimation of mandarin maturity status through portable VIS-NIR spectrophotometer. *Food Bioprocess Technology* 4, 809-813.
- Azodanlou, R., Darbellay, C., Luisier, J.L., Villettaz, J.C., Amado, R., 2003. Quality assessment of strawberries (*Fragaria species*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 715–721.
- Barnes R.J., Dhanoa M.S. y Lister S.J. 1989. Standard Normal Variate transformation and De-trending of near infrared diffuse reflectance spectra. *Applied Spectroscopy* 43, 772-777.
- Barton II, F.E. 1989. *Understanding NIRS: Spectra*. En: Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) Analysis of Forage Quality. Marten G.C., Shenk J.S. y Barton II F.E. (Eds.). USDA-ARS Agriculture Handbook No. 643, pp 30-31.
- Barton II, F.E. 2002. *Theory and principles of near infrared spectroscopy*. En: Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 10th International Conference on Near-Infrared Spectroscopy. Davies A.M.C. y Cho R.K. (Eds.). NIR Publications, Chichester, UK. 1-6.
- Ben-Gera I. y Norris K.H. 1968a. Determination of moisture content in soybeans by direct spectrophotometry. *Agricultural Research* 18, 125-132.
- Ben-Gera I. y Norris K.H. 1968b. Direct spectrophotometric determination of fat and moisture in meat products. *Journal of Food Science* 33, 64-67.
- Birth, G. S. 1978. The light scattering properties of foods. *Journal of Food Science* 43, 916-925.
- Bokobza L. 2004. *Origin of near-infrared absorption bands*. En: Near-Infrared Spectroscopy. Principles, Instruments, Applications. Siesler H.W., Ozaki Y., Kawata S. y Heise H.M. (Eds.). Wiley-VCH, Weinheim, Alemania. pp. 11-42.

- Brimmer P.J., De Thomas F.A. y Hall J.W. 2001. *Method Development and Implementation of Near-Infrared Spectroscopy in Industrial Manufacturing Processes*. En: *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*, 2nd edition. P.C. Williams y K. Norris (Eds.). American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul, Minnesota, USA. pp. 199-214.
- Brimmer P.J. y Hall J.W. 2001. *Method of Development and Implementation of Near-Infrared Spectroscopy in Industrial Manufacturing Support Laboratories*. En: *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*, 2nd edition. P.C. Williams y K. Norris (Eds.). American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul, Minnesota, USA. pp. 187-198.
- Burns D. A. y Ciurczak E.W. 2007. *Handbook of Near-Infrared Analysis*. Marcel Dekker, Inc. New York, USA.
- Chen, P. y Nattuvetty, V.R. 1980. Light transmittance through a region of an intact fruit. *Transactions of the ASAE* 23, 0519-0522.
- Coates J. y Ramani M. 2006. Making NIR your essential instrument. *Laboratory equipment* 43, 50-52.
- Cozzolino D., Smyth H.E., Lattey K.A., Cynkar W., Janik L., Damberg R.G., Francis I.L., Gishen M. 2005. Relationship between sensory analysis and near infrared spectroscopy in Australian Riesling and Chardonnay wine. *Analytica Chimica Acta* 539(1-2), 341-348.
- Davies T. 1999. NIR instrumentation companies: the story so far. *NIR news*, 10 (6): 14-15.
- Day D.R., Butler M.A., Smith M.C., McAllister A., Deutsch E.R., Zafiriou K. Senturia S.D. 2005. Diffractive-MEMS implementation of a hadamard near-infrared spectrometer. TRANSDUCERS'05. The 13th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems. Seúl, Corea. pp 1246-1249.
- Delwiche S.R., Mekwatanakarn W., Wang C.Y. 2008. Soluble solids and simple sugars measurement in intact mango using near infrared spectroscopy. *HorTechnology* 18, 410-416.

- Downey G., McIntyre P., Davies A.N. 2003. Geographic classification of extra virgin olive oils from the eastern Mediterranean by chemometric analysis of visible and near-infrared spectroscopic data. *Applied Spectroscopy*, 57(2) 158-163.
- Downey G. 2000. Discriminant PLS-questions and answer from a list server. *NIR News* 11(1), 9-12.
- Downey G. 1996. Authentication of food and food ingredients by near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 4, 47-61.
- Downey G. 1994. Review. Qualitative analysis in near-infrared region. *Analyst* 119, 2367-2375.
- Duckworth J. 2004. *Mathematical Data Preprocessing*. En: Near Infrared Spectroscopy in Agriculture. C.A. Roberts, J. Workman Jr. and J. B. Reeves III (Eds.). South Segoe Road, Madison, WI 53711-1086 USA. p. 115.
- Fearn T. y Davies A.M.C. 2003. Locally-biased regression. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 11, 467-478.
- Flores K., Sánchez M.T., Pérez-Marín D., Guerrero J.E. y Garrido-Varo A. 2009. Feasibility in NIRS instruments for predicting internal quality in intact tomato. *Journal of Food Engineering* 91(2), 311-318.
- Galtier O., Dupuy N., Le Dréau Y., Ollivier D., Pinatel C., Kister J. y Artaud J. 2007. Geographic origins and compositions of virgin olive oils determinate by chemometric analysis of NIR spectra. *Analytica Chimica Acta* 595, 136-144.
- Garrido Varo A, Pérez Marín D.C., Guerrero Ginel J.E. y Gómez Cabrera A. 2003. Avances en la utilización de la tecnología NIRS. Aplicaciones en producción animal. XIX Curso de especialización FEDNA. Madrid, 23 y 24 de Octubre. 26 pp.
- Garrido, A., García-Olmo, J. y De Pedro, E. J. 2000. Espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS). Una metodología para implementar en sistemas de aseguramiento de la calidad y trazabilidad de productos derivados del cerdo Ibérico. *Sólo cerdo Ibérico* 4, 93-102.
- Garrido A., Gómez A., Guerrero J.E. y Fernández V. 1996. NIRS: una tecnología de apoyo para un servicio integral en alimentación animal. XII Curso de especialización FEDNA. Madrid. Noviembre 1996.

- Gracia A. y León L. 2011. Non-destructive assessment of olive fruit ripening by portable near infrared spectroscopy. *Grasas y Aceites* 62, 268-274.
- Greensill, C. V. y Walsh., K. 2000. A remote acceptance probe and illumination configuration for spectral assessment of internal attributes of intact fruit. *Measurement Science and Technology* 11, 1674.
- Greensill C.V. y Walsh K. 2002. Calibration transfer between miniature photodiode array-based spectrometers in the near infrared assessment of mandarin soluble solids content. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 7, 27-35.
- Guthrie, J. y Walsh, K. 1999. Influence of environmental and instrumental variables on the non-invasive prediction of Brix in pineapple using near infrared spectroscopy. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 39, 73-80.
- Heise H.M. y Winzen R. 2004. *Fundamental Chemometrics Methods*. En: Near-Infrared Spectroscopy. Principles, Instruments, Applications. Siesler, H.W., Ozaki, Y., Kawata, S. y Heise, H.M. (Eds.). Wiley-VCH. Weinheim, Germany. pp. 125-161.
- Hopke P.K. 2003. The evolution of chemometrics. *Analytica Chimica Acta* 500, 365-377.
- Hruschka W.R. 2001. *Data analysis: wavelength selection methods*. En: Near-Infrared technology in the agricultural and food industries. 2nd Edition. Williams, P. y Norris, K. (Eds.). American Association of Cereals Chemists, Inc. St. Paul, Minnesota. USA, pp. 39-58.
- Huang H., Yu H., Xu H. y Ying Y. 2008. Near infrared spectroscopy for on/in-line monitoring of quality in foods and beverages: A review. *Journal of Food Engineering* 87, 303-313.
- Kawano S. 2004. *Sampling and sample presentation*. En: Near-Infrared Spectroscopy. Principles, Instruments, Applications. Siesler, H.W., Ozaki, Y., Kawata, S. y Heise, H.M. (Eds.). Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 99. 115-124.
- Kays S.J., Dull G.G., Leffler R.G. 2000. Challenges and opportunities in the use of near infrared for the analysis of intact high moisture plant products. En: Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 9th International Conference. Davies, A.M.C., Giangiacomo R. (Eds.). NIR Publications, Chichester, UK. pp. 841-848.

- Kramer R., Workman J.Jr. y Reeves III. J.B. 2004. *Qualitative Analysis*. En: Near-Infrared Spectroscopy in Agriculture. Roberts, C.A., Workman, J. y Reeves III, J.B. (Eds.). ASA, CSSA y SSSA, Inc., Madison, Wisconsin, USA, pp. 175-206.
- Lammertyn, J.; De Baerdemaeker, J; Nicolai, B. 2000. Light penetration properties of NIR radiation in fruit with respect to non-destructive quality assessment. *Measurement Science and Technology* 18, 121-132.
- Lavine B.K. 2000. *Clustering and Classification of Analytical Data*. En: Encyclopedia of Analytical Chemistry. Robert A. Meyers (Ed.). John Wiley & Sons Ltd, Chichester. pp. 1-21.
- Lin H. y Ying H. 2009. Theory and application of near infrared spectroscopy in assessment of fruit quality: a review. *Sensory & Instrumentation Food Quality* 3, 130-141.
- López, A.; Arazuri, S.; Mangado, J.; Jarén, C. 2013. Determination of NIR penetration in potato. VII Congreso Ibérico de Agroingeniería y Ciencias Hortícolas, Madrid.
- Luo W., Huan S., Fu H., Wen G., Cheng H., Zhou J., Wu H., Shen G. y Yu R. 2011. Preliminary study on the application of near infrared spectroscopy and pattern recognition methods to classify different types of apple samples. *Food Chemistry* 128, 555-561.
- McElhinney J., Downey G. y Fearn T. 1999. Chemometric processing of visible and near infrared reflectance spectra for species identification in selected raw homogenised meats. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 7, 145-154.
- Mark H. y Workman J. 1991. *Statistics in Spectroscopy*. Academic Press, Inc. USA.
- Martens H. y Martens M. 2001. *Multivariate Analysis of Quality. An introduction*. John Wiley and Sons, Ltd, Chichester, England.
- Martens H. y Naes T. 1989. *Multivariate Calibration*. John Wiley & Sons, Chichester.
- Miller C.E. 2001. *Chemical principles of near-infrared technology*. En: Near Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries. 2nd Edition. Williams, P.C. y Norris, K. (Eds.). American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul, Minnesota, USA, pp. 19-38.

- Murray I., Aucott L.S. y Pike H.I. 2001. Use of discriminant analysis on visible and near infrared reflectance spectra to detect adulteration of fishmeal with meat and bone meal. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 9, 297-311.
- Naes T., Isaksson T., Fearn T. y Davies A. 2002. A user-friendly guide to Multivariate Calibration and Classification. NIR Publications, Chichester, UK.
- Nagata M., Tallada J.G., Kobayashi T., Cui Y., Gejima Y. 2004. Prediction maturity quality parameters of strawberries using hyperspectral imaging. *ASAE/CSAE annual international meeting*, Ottawa, Ontario, Canada. Paper No. 043033.
- Nicolai B.M., Beullens K., Bobelyn E., Peirs A., Saeys W., Theron K.I. y Lammertyn. 2007. Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review. *Postharvest Biology and Technology* 46, 99-118.
- Nishizawa T., Mori Y., Fukushima S., Natsuga M., Maruyama Y. 2009. Non-destructive analysis of soluble sugar components in strawberry fruits using near-infrared spectroscopy. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* 56, 229-235.
- Norris K.H., Barnes R.F., Moore J.E. y Shenk J.S. 1976. Predicting forage quality by Near Infrared Reflectance Spectroscopy. *Journal of Animal Science* 43, 889-897.
- Norris K.H. y Hart J.R. 1965. Direct spectrophotometric determination of moisture content of grain and seeds. En: *Proceedings of the 1963 International Symposium of Humidity and Moisture*. Vol. 4. Reinhold Publication. New York. pp. 19-25.
- Oliveri P., Di Egidio V., Woodcock T. y Downey G. 2011. Application of class-modelling techniques to near infrared data for food authentication purposes. *Food Chemistry* 125, 1450-1456.
- Ortiz M.C. y Sarabia L.A. 2000. Quimiometría y cualimetría. Módulo I: Reconocimiento de pautas con datos químicos. Universidad de Burgos. Dpto. de Química y Dpto. de Matemáticas y Computación.
- Osborne B.G., Fearn T. y Hindle P. 1993. *Practical NIR Spectroscopy with Applications in Food and Beverage Analysis*. Longman Scientific and Technical. London, UK.
- Otto M. 2007. *Chemometrics. Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry*. 2nd edition. Wiley-VCH.

- Ozaki Y., McClure W. y Christy A.A. 2007. Near-Infrared Spectroscopy in Food Science and Technology. Ozaki Y., McClure W. y Christy A.A. (Eds). Wiley-Interscience. New Jersey.
- Paz P., Sánchez M.T., Pérez-Marín D., Guerrero J.E. y Garrido-Varo A. 2009. Instantaneous quantitative and qualitative assessment of pear quality using near infrared spectroscopy. *Computers and Electronics in Agriculture* 69(1), 24-32.
- Peiris K.H.S., Leffler R.G., Dull G.G. y Kays S.J. 1998. Non destructive determination of soluble solids content of peach by Near Infrared Spectroscopy. En: Sensors of Nondestructive Testing. Northeast Regional Agricultural Engineering Service (NRAES). Ithaca, New York, pp. 77-87.
- Pelayo, C., Ebeler, S.E., Kader, A.A., 2003. Postharvest life and flavor quality of three strawberry cultivars kept at 5 °C in air or air + 20 kPa CO₂. *Postharvest Biology and Technology* 27, 171-183.
- Pérez-Marín D., Sánchez M.T., Paz P., González-Dugo V., Soriano M.A. 2011. Postharvest shelf-life discrimination of nectarines produced under different irrigation strategies using NIR-spectroscopy. *LWT – Food Science and Technology* 44, 1405-1414.
- Pérez-Marín D., Paz P., Guerrero J.E., Garrido-Varo A., Sánchez M.T. 2010. Miniature handheld NIR sensor for the on-site non-destructive assessment of post-harvest quality and refrigerated storage behavior in plums. *Journal of Food Engineering* 99, 294-302.
- Pérez-Marín D., Garrido-Varo A., Guerrero J.E. 2007. Review: Non-linear regression methods in NIRS quantitative analysis. *Talanta* 72, 28-42.
- Roberts C.A., Workman J. y Reeves III J.B. 2004. Near-Infrared Spectroscopy in Agriculture. Roberts C.A., Workman J. y Reeves III J.B. (Eds.). ASA, CSSA y SSSA, Inc., Madison, Wisconsin, USA.
- Sánchez M.T. y Pérez-Marín D. 2011. Nondestructive Measurement of Fruit Quality by NIR Spectroscopy. En: Advances in Post-Harvest Treatments and Fruit Quality and Safety. Vázquez M. y Ramírez de León J.A. (Eds.). Nova Science Publishers, Inc. New York. pp. 101-163.

- Sánchez M.T., De la Haba M.J., Guerrero J.E., Garrido-Varo A., Pérez-Marín D.C. 2011. Testing of a local approach for the prediction of quality parameters in intact nectarines using a portable NIRS instrument. *Postharvest Biology and Technology* 60, 130-135.
- Sánchez M.T., Pérez-Marín D., Flores-Rojas K., Guerrero J.E., Garrido-Varo A. 2010. Measurement of Pesticide Residues in Peppers by Near Infra-Red Reflectance Spectroscopy. *Pest Management Science* 66 (6), 580-585.
- Saranwong S. y Kawano S. 2007. Applications to agricultural and marine products: Fruits and vegetables. En: *Near-Infrared Spectroscopy in Food Science and Technology*. Ozaki Y., McClure W.F., Christy A.A. (Eds.). John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, pp. 219-242.
- Saranwong S. y Kawano S. 2005. Rapid determination of fungicide contaminated on tomato surfaces using the DESIR-NIR: a system for ppm-order concentration. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 13, 169-175.
- Saranwong S., Sornsrivihai J. y Kawano S. 2004. Prediction of ripe-stage eating quality of mango fruit from its harvest quality measured nondestructively by near-infrared spectroscopy. *Postharvest Biology and Technology* 31, 137-145.
- Shao, Y., He, Y., 2008. Nondestructive measurement of acidity of strawberry using Vis/NIR spectroscopy. *International Journal of Food Properties* 11, 102–111.
- Shenk J.S., Westerhaus M.O. y Berzaghi P. 1997. Investigation of a LOCAL calibration procedure for near infrared instruments. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 5, 223-232.
- Shenk J.S. y Westerhaus M.O. 1996. *Calibration the ISI way*. En: *Near Infrared Spectroscopy: the future waves*. Davies A.M.C., Williams, P.C. (Eds.). NIR Publications, Chichester, West Sussex, UK. pp. 198-202.
- Shenk J.S. y Westerhaus M.O. 1995. *Analysis of Agriculture and Food Products by Near Infrared Reflectance Spectroscopy*. Monograph, NIRSystems.
- Shenk J.S., Workman J.J., Jr. y Westerhaus M. O. 2001. *Application of NIR Spectroscopy to Agricultural Products*. Handbook of Near Infrared Analysis. Second Edition. Burns D.A. y Ciurczak E.W. (Eds.). Practical Spectroscopy Series, Vol. 27. Marcel Dekker, USA.

- Siesler H.W. 2004. *Introduction*. En: Near-Infrared Spectroscopy. Principles, Instruments, Applications. Siesler, H.W., Ozaki, Y., Kawata, S. y Heise, H.M. (Eds.). Wiley-VCH., Weinheim, Germany. pp: 1-10.
- Sinnaeve G., Dardenne P. y Agneessens R. 1994. Global or local? A choice for NIR calibrations in analyses of forage quality. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 2, 163-175.
- Slaughter D. y Abbott J. 2004. *Analysis of Fruits and Vegetables*. En: Near-Infrared Spectroscopy in Agriculture. Roberts C.A., Workman J. y Reeves III J.B. (Eds.). ASA, CSSA y SSSA, Inc., Madison, Wisconsin, USA. pp: 377-398.
- Vandeginste B.G. M., Massart, D.L., Buydens, L.M.C, De Jong, S., Lewi, P.J. y Smeyers-Verbeke, J. 1998. Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B. Elsevier Science B.V: Amsterdam, The Netherlands. pp. 649-699.
- Wang W. y Paliwal J. 2007. Near-infrared spectroscopy and imaging in food quality and safety. *Sensing & Instrumentation for Food Quality* 1, 193-207.
- Westerhaus M.O., Workman J., Reeves III J.B. y Mark H. 2004. *Quantitative Analysis*. En: Near-Infrared Spectroscopy in Agriculture. Roberts, C.A., Workman, J. y Reeves III, J.B. (Eds.). ASA, CSSA y SSSA, Inc., Madison, Wisconsin, USA, pp. 133-174.
- Williams P.C. 2001. *Implementation of Near-Infrared Technology*. En: Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries, 2nd edition. P.C. Williams y K. Norris (Eds.). American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul, Minnesota, USA. pp. 145-169.
- Williams P.C. y Norris K. 2001. Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries, 2nd edition. American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul, Minnesota, USA.
- Woodcock T., Downey G., O'Donnell C.P. 2008. Review: Better quality food and beverages: the role of near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 16, 1-29.
- Workman J.Jr. 2004. *Near Infrared Spectrophotometers*. En: Near-Infrared Spectroscopy in Agriculture. Roberts C.A, Workman, J.Jr. y Reeves III, J.B. (Eds.). ASA, CSSA Y SSSA, Inc., Madison, Wisconsin, USA, pp. 11-32.

- Workman J.Jr. y Shenk J. 2004. *Understanding and using the near-infrared spectrum as an analytical method*. En: Near-Infrared Spectroscopy in Agriculture. Roberts C.A, Workman, J.Jr. y Reeves III, J.B. (Eds.). ASA, CSSA y SSSA, Inc., Madison, Wisconsin, USA, pp. 3-10.
- Workman J.Jr. y Burns D. 2001. *Comercial NIR Instrumentation*. En: Handbook of Near-Infrared Analysis. 2nd edition. Burns D.A. y Ciurczak, E.W. (Eds.). Marcel Dekker, Inc. New York, USA pp. 53-70.
- Workman J. Jr. 2001. *NIR Spectroscopy Calibration Basics*. En Handbook of Near-Infrared Analysis. 2nd edition. Burns D.A. y Ciurczak, E.W. (Eds.). Marcel Dekker, Inc. New York, USA pp. 91-128.
- Yang H., Kuang B., Mounem-Mouazen A. 2011. In situ determination of growing stages and harvest time of tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits using fiber-optic visible-near-infrared (Vis-NIR) spectroscopy. *Applied Spectroscopy* 65(8), 931-938.