



**Universidad**  
Zaragoza

## Trabajo Fin de Grado

ESTUDIO DE MADURACIÓN DE MANZANA  
MEDIANTE LA TÉCNICA NO DESTRUCTIVA DE  
IMÁGENES MULTIESPECTRALES DE RETRODIFUSIÓN  
DE LUZ LÁSER EN DISTINTAS LONGITUDES DE  
ONDA.

Autor

Lis del Arco Ferruz

Director

Ángel Ignacio Negueruela Suberviola

Facultad de Veterinaria / Universidad de Zaragoza  
2013

**Datos personales del alumno:**

**Apellidos:** del Arco Ferruz

**Nombre:** Lis

**D.N.I.:** 73090143-F

**Dirección:** C/Juan XXIII nº: 4, Torres de Berrellén, Zaragoza.

**Teléfono:** 618143423 / 976653199

**Correo:** lis\_3\_88@hotmail.com

## INDICE

1. RESUMEN .....	5
2. INTRODUCCION.....	7
2.1. Historia .....	7
2.2. Origen.....	7
2.3. Taxonomía y morfología.....	8
2.4. Propiedades nutritivas.....	9
2.5. Situación actual del cultivo.....	10
2.6. Calidad del fruto.....	11
2.6.1 Parámetros de calidad. ....	11
2.6.2 Interacción luz-materia. ....	12
2.6.3 Medidas de la luz tras la interacción con la materia.....	13
a. Reflexión.....	14
b. Absorción.....	14
2.6.4 Retrodifusión de la luz (light backscattering).....	14
2.7. Métodos estadísticos.....	15
2.7.1. Análisis de Componentes Principales (PCA).....	16
2.7.2. Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS).....	16
3. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS.....	17
4. METOLOGIA.....	20
4.1 Fruta.....	20
4.2 Adquisición y tratamiento de imágenes.....	20
4.3 Firmeza.....	22
4.4 Sólidos Solubles Totales. ....	22
4.5 Métodos estadísticos.....	23
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
5.1 Métodos destructivos. Firmeza y SST. ....	25
5.2 Imágenes de luz retrodifundida. ....	26
5.3 Análisis estadístico .....	31
5.3.1 Eliminación de muestras anómalas. Análisis PCA. ....	31
5.3.2 Análisis PLS.....	31
5.4 Discusión.....	35
6. CONCLUSIÓN.....	36

7. IDENTIFICACIÓN DE LAS APORTACIONES QUE, EN MATERIA DE APRENDIZAJE, HA SUPUESTO ESTE TRABAJO. ....	37
8. EVALUACIÓN DEL TRABAJO Y SUGERENCIAS DE MEJORA. ....	38
9. BIBLIOGRAFIA.....	39

## 1. RESUMEN

La evaluación de la calidad de la manzana "Smoothie Golden Delicious" se hace mediante índices de madurez, entre ellos firmeza y Sólidos Solubles Totales, los cuales requieren la destrucción del fruto. Por tanto la industria hortofrutícola no puede tener un control de todos los frutos, y el consumidor demanda sistemas efectivos de control y calidad. Por ello, el objetivo principal de este trabajo es establecer un modelo estadístico que relacione las medidas de firmeza y SST con los diámetros medios de Feret correspondientes a las imágenes de retrodifusión de la luz de algunos láseres en la manzana, obteniendo así un sistema no destructivo de clasificación por su calidad. La firmeza se midió mediante el método estándar Magness-Taylor y los SST con un refractómetro digital. Las imágenes de retrodifusión se analizaron con el Software Matrox 8.0 para obtener los diámetros medios de Feret de cada manzana. En dichas imágenes se comprueba cómo las manzanas dispersan la luz láser de distinta forma dependiendo de la fecha de recogida y la longitud de onda del láser utilizado para obtener la imagen. Se utilizó el método estadístico PLS con el que se obtuvo el modelo. En el modelo de calibración los valores de  $R^2_{CV}$  fueron de 0,93 y 0,87 para SST y firmeza respectivamente, y en el modelo de validación se obtuvieron valores de  $r^2$  0,86 y 0,74 para SST y firmeza respectivamente. De estos resultados se dedujo que se puede obtener una buena predicción de parámetros. Aunque sería necesario trabajar en sucesivas campañas para construir modelos de predicción más completos, porque desconocemos que este modelo sirva para otras campañas.

### ABSTRACT

The evaluation of the quality of the "Smoothie Golden Delicious" Apple is done by indices of maturity, including firmness and total soluble solids, which require the destruction of the fruit. Therefore fruit industry cannot take control of all the fruits, and consumers demand effective systems of control and quality. Therefore the main objective of this work is to establish a statistical model that relates the firmness and SST measures with the Feret average diameters corresponding to segmentation images of light backscattering from different lasers in the Apple, thus obtaining a non-destructive classification system for its quality. The firmness is measured using the Magness-Taylor standard method and the SST with a digital refractometer. Backscattering images were analyzed with the Matrox 8.0 Software to obtain the Feret average diameters of

segmentations for each apple. In these images it can be checked as apples scattered laser light differently depending on the date of collection and the wavelength of the laser used to obtain each image. PLS analytical method was used to obtain the statistical model. In the calibration model,  $R^2_{CV}$  values of 0.87 and 0.93 for SST and firmness respectively and, in the validation model,  $r^2$  values of 0.86 for SST and 0.74 for firmness were obtained. From these results, a good prediction of parameters can be deduced by using this non-destructive method. However, it would be necessary to work in successive campaigns to build best predictive models, because we do not know if this model will serve to other campaigns.

## **2. INTRODUCCION**

### **2.1. Historia**

La gran mayoría de estudios datan la antigüedad de la manzana en épocas prehistóricas, afirmando, incluso, que el cultivo del manzano se remonta al origen de toda civilización. Los restos más antiguos de manzana corresponden a la época más reciente de la Edad de Piedra, entre 8.000 y 2.500 años a.C., y ya aparecen formas cultivadas de manzana en el periodo de Hallstatt (1200-750 a.C.), correspondiente a la primera época de la Edad de Hierro. En el s.XII a.C. el manzano era plantado en los fértiles valles del río Nilo en tiempos del faraón Ramsés III.

La manzana ha sido un fruto simbólico a lo largo de la historia. La Biblia le impone un protagonismo negativo: el fruto prohibido que representa la tentación ante la que sucumbieron Adán y Eva, provocando la expulsión del ser humano del paraíso. Es una fruta que ha estado también presente en la mitología europea desde la antigüedad, siendo la mitología griega la que le otorgó un papel malévolo: la manzana de oro que Paris entrega a la diosa Afrodita pasó a la historia como la conocida “manzana de la discordia”, desatando la guerra de Troya.

Incluso, se relaciona la manzana con la Física cuando, según cuentan, Newton descansaba debajo de un manzano, y una manzana cae. En un súbito pensamiento, se dio cuenta de que la misma fuerza que hizo a la manzana caer, es la que mueve la luna alrededor de la tierra, y los planetas alrededor del sol: la gravedad. La explicación de estos fenómenos da lugar a la primera teoría seria sobre el movimiento, la cual expone en su obra “Principia”.

Pero, incluso sin conocer su composición química y sus propiedades nutricionales, la sabiduría popular siempre le ha atribuido virtudes saludables.

### **2.2. Origen**

El origen del manzano es incierto. Algunas fuentes dicen que existen vestigios en determinados yacimientos arqueológicos, datados en época Paleolítica y Neolítica. Otras referencian que se cree que procede del cruzamiento y selección de varias especies de manzano silvestre europeo y asiático. El *Malussieversii* (Ledeb.) Roem.,

una especie de manzano silvestre que crece de forma natural en las regiones montañosas de Oriente Medio, podría ser la especie de la que se habrían originado las primeras razas cultivadas de manzano. Las civilizaciones egipcia, griega y romana cultivaron manzanos. Los romanos extendieron su cultivo por la mayoría de sus colonias mediterráneas e inmortalizaron esta fruta en historias mitológicas y textos de gastronomía romana (*De re coquinaria* de Apicio en el siglo I d.C.). Una de las colonias fue España, donde, junto con los pueblos del norte de África, fueron los que introdujeron el manzano. La facilidad para su conservación hizo que la manzana fuera uno de los alimentos más utilizados en los grandes viajes por mar de los conquistadores españoles, quienes extendieron el cultivo de la manzana al Nuevo Mundo y, cien años después, desde Iberoamérica, el manzano emigró a América del Norte.

A partir del siglo XX, y especialmente después de la primera guerra mundial, aparecen las primeras plantaciones comerciales en España, principalmente en los valles de los ríos Jalón y Jiloca en la provincia de Zaragoza. Aunque será a partir de los años 50 y 60 cuando se produce la gran expansión de este cultivo, con importantes plantaciones en Cataluña y Aragón para fruta de mesa, y también en Asturias para sidra (Carrera, comunicación personal), aunque en esta región el cultivo de este fruto es muy anterior al del resto de España por la tradición de esta bebida en la zona.

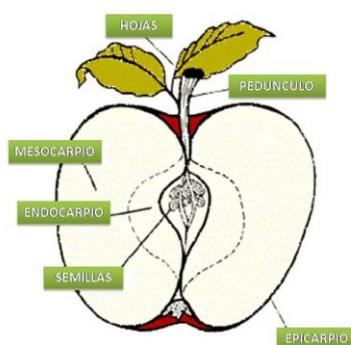
### **2.3. Taxonomía y morfología**

El manzano pertenece a la familia de las *Rosáceas*, subfamilia *Pomoideas*, y al género *Malus*. Este género comprende principalmente 25 especies de pequeños árboles y arbustos caducifolios, nativos de las zonas templadas del Hemisferio Norte. Las variedades de manzanos cultivadas para la comercialización pertenecen a la especie *Malus x domestica* Borkh.

Alcanza como máximo unos 10 m de altura y tiene una copa globosa. Las ramas se insertan en ángulo abierto sobre el tallo. Las flores son grandes de color rosa pálido e, incluso, a veces blancas.

El fruto es un pomo que contiene dos cavidades: la calcina, correspondiente al cáliz de la flor, y la peduncular, donde se inserta el peciolo que lo une al brote. El pedúnculo del fruto es de longitud variable, adherente y, a menudo, está insertado en

una depresión (Coutanceau, 1971). En el hemisferio norte su recolección comienza a mitad de verano y va hasta principios de otoño, dependiendo de la variedad. El fruto está compuesto por el epicarpio, el mesocarpio y el endocarpio. El epicarpio varía su color desde el verde hasta el rojo oscuro. El mesocarpio o pulpa, de color blanco, tiene consistencia y cualidades organolépticas muy variables, desde ácido hasta dulce. Y el endocarpio, formado por cinco cavidades cartilagosas que contienen 1 ó 2 semillas cada una.



**Figura 1: Partes que componen la manzana.**

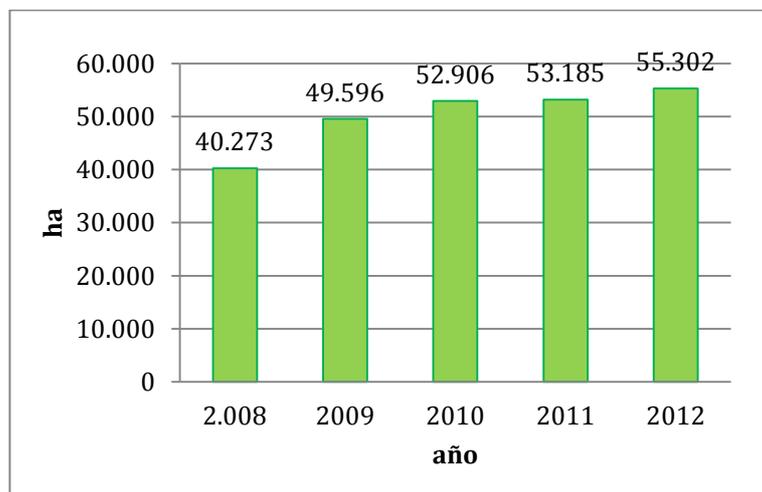
## **2.4. Propiedades nutritivas**

La manzana es la fruta más completa y enriquecedora en la dieta. Hasta un 85% de su composición es agua, por lo que resulta muy refrescante e hidratante. Los siguientes nutrientes más abundantes después del agua son los glúcidos, con un 14%, de los cuales el que se encuentra en mayor proporción es la fructosa, y, en menor proporción, la glucosa y la sacarosa, de rápida asimilación por el organismo. Es rica en fibra, por lo que mejora el tránsito intestinal y entre su contenido mineral sobresale el potasio. El potasio es un mineral necesario para la transmisión y generación del impulso nervioso y para la actividad muscular normal, interviene en el equilibrio de agua dentro y fuera de la célula. La manzana es una fuente discreta de vitamina E, o tocoferol, que posee acción antioxidante e interviene en la estabilidad de las células sanguíneas, y aporta una escasa cantidad de vitamina C y A (Carrera, 1999).

Debido a los componentes químicos se le atribuyen a la manzana extraordinarias propiedades dietéticas. Entre estos elementos, están los flavonoides y la quercitina, con propiedades antioxidantes.

## 2.5. Situación actual del cultivo.

En España la superficie que ocupa la producción integrada se ve aumentada en los últimos 10 años hasta ocupar 803.480 ha en 2012, de los cuales 55.302 ha corresponden a la producción de árboles frutales (Figura 2).



**Figura 2: Evolución de la producción integrada de frutales (2008-2012). MAGRAMA 2012.**

De esta superficie cultivada con árboles frutales sólo en una parte se realiza la producción de manzana, ocupando 5.003 ha en el año 2012. Aragón ocupa el segundo lugar en superficie cultivada con manzanos si estas hectáreas se distribuyen por Comunidades Autónomas productoras (Tabla 1).

**Tabla 1: Superficie de producción integrada de manzano por CCAA (2012). MAGRAMA 2012.**

	ARAGÓN	C.LEON	CATALUÑA	RIOJA	NAVARRA	TOTAL
<b>Manzano</b>	1.502ha	442ha	2.908ha	105ha	47ha	5.003ha

En toda la superficie existente en España de cultivo de manzano se producen miles de toneladas de manzana al año. Esta cantidad de manzana es variable según el año, Figura3. Se puede observar que no hay tendencia ascendente ni descendente, pero sí que en 2012 se obtuvo la producción más baja, con 464,7 miles de toneladas, de los últimos años.

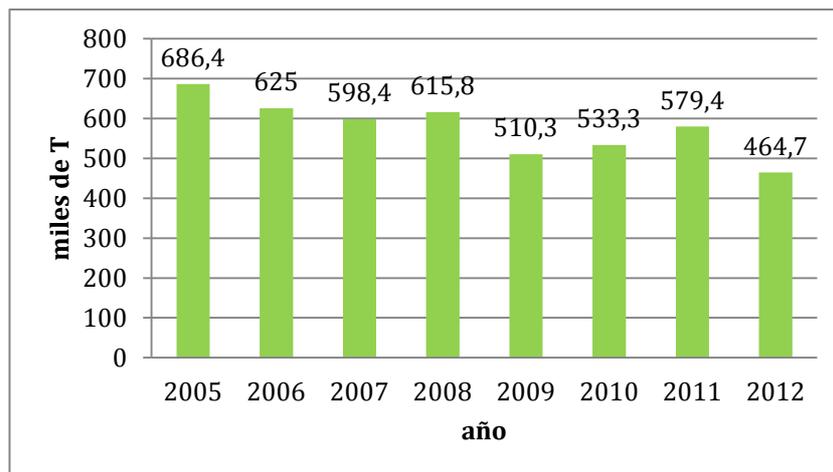


Figura 3: Producción de manzana en España (2008-2012). MAGRAMA 2012.

## 2.6. Calidad del fruto.

El concepto de calidad ha ido evolucionando a lo largo del tiempo. Al principio la percepción de la calidad era diferente según el interés particular de cada uno de los agentes que intervenían en el proceso de producción (productor, consumidor, comerciante). Sin embargo, cada vez hay más acuerdo entre los sectores implicados, ya que todos ellos tienden a acercar sus criterios hacia los que impone el consumidor, en los que el estado de madurez de la fruta juega un factor importante (Vallejo, 1990).

Debido a la importancia de obtener frutos con características de madurez óptimas, tanto para el consumo como para su conservación, de forma que lleguen con las mejores condiciones organolépticas posibles al usuario final, es interesante conocer los índices de madurez más adecuados para determinar el momento óptimo de su recolección.

### 2.6.1. Parámetros de calidad.

La evaluación de la calidad de las manzanas se hace de forma tradicional por medios de control de una serie de parámetros, algunos de los cuales implican la destrucción del fruto. En manzana se observa el color de la piel, la firmeza de la pulpa, el contenido de Sólidos Solubles Totales (SST), el contenido de almidón, el etileno y la fecha en el calendario prevista para la recolección. Algunos de estos análisis requieren equipos específicos, por lo que no se pueden realizar en campo. Hay una serie de parámetros que pueden usarse en campo, como calibre o peso, color y forma que no

requieren destrucción del fruto, y firmeza y SST con penetrómetro y refractómetro respectivamente, los cuales destruyen el fruto, siendo estos los que determinan la clasificación del fruto en cada una de las categorías.

En la industria agroalimentaria es importante la existencia de una cadena de clasificación del fruto en función de su calidad, lo que precisa unos criterios de calidad de los frutos que se puedan utilizar en la propia cadena, sin destruir los frutos. Los parámetros tradicionales, como sólidos solubles o firmeza, no tienen la posibilidad de medirse en cadena, ya que estos métodos implican la destrucción de un porcentaje de los frutos.

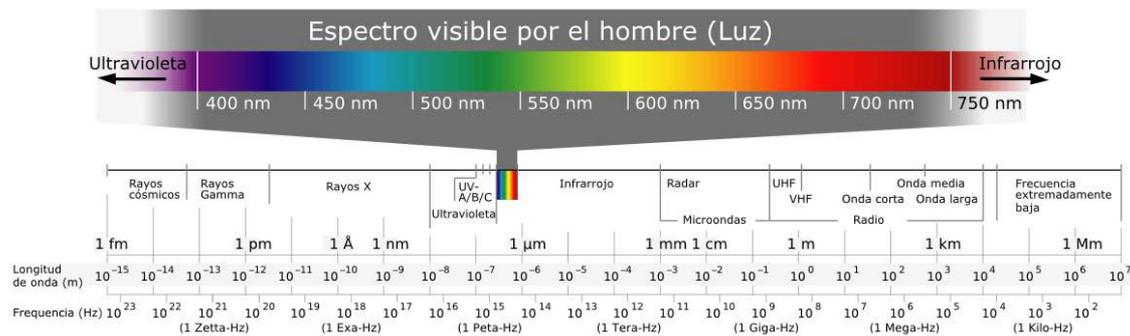
Las investigaciones más recientes van encaminadas a encontrar nuevas técnicas no destructivas para que las pérdidas sean las mínimas en el proceso de evaluación de calidad. Es decir, se buscan métodos automatizados que sean capaces de evaluar la calidad y clasificar cada unidad de fruta según su categoría. Ya hay líneas en las que se clasifica el fruto por su color, haciendo que estos pasen por una cadena con un colorímetro que indica si la coloración es adecuada.

Entre estas técnicas no destructivas, está la técnica basada en obtener una imagen de la retrodifusión de luz láser en el fruto, y el posterior tratamiento digital de la imagen. Los datos obtenidos en el tratamiento digital se relacionan estadísticamente con los sólidos solubles y la firmeza, haciendo que los frutos se categoricen en función de éstos en las líneas de clasificación.

El láser (Light Amplifier by Stimulated Emission of Radiation) es un sistema de amplificación de la radiación electromagnética que produce un rayo de luz de alta intensidad, monocromático y coherente (que tiene la misma fase).

### **2.6.2. Interacción luz-materia.**

La luz solar contiene radiaciones incoherentes y de distintas frecuencias: ultravioletas, visibles al ojo humano e infrarrojas, existiendo un ligero máximo de emisión a 550nm (verde), Figura 4.



**Figura 4: Espectro de luz visible dentro del espectro electromagnético.**

Al incidir la luz desde el aire sobre un objeto, y debido a la diferencia de velocidad de propagación en ambos medios, una parte de la radiación se refleja en la superficie, otra parte entra en el objeto después de ser refractada, y, dentro del objeto, otra parte es dispersada hacia adelante y/o hacia atrás (retrodifundida), volviendo al primer medio. Además, existe otro tipo de interacción: la absorción de ciertas longitudes de onda por parte del objeto, que depende de la composición química del mismo. Incluso existe la posibilidad de reemisión de radiación en longitudes de onda superiores a la incidente, es lo que se conoce como fluorescencia. Según se trate de absorción atómica o molecular se produce en una banda del espectro u otra.

Los pigmentos son sustancias que absorben parte de la luz, por lo que son responsables de la coloración de un objeto debido a la presencia de bandas de absorción en el visible (380nm a 780nm), asociadas con transiciones electrónicas, que modifican la composición espectral de la radiación incidente. La absorción de energía en la zona del infrarrojo está asociada a los distintos modos de vibración-rotación de la molécula. En el infrarrojo cercano (780 a 2.400nm) hay niveles de absorción asociados con las frecuencias del agua y de sus estados de agregación.

### 2.6.3. Medidas de la luz tras la interacción con la materia.

Cuando la radiación incide en una muestra, la radiación incidente puede ser reflejada, absorbida o transmitida y cada uno de estos fenómenos depende de la composición química y parámetros físicos de la muestra (Nicolai, B.M. et al, 2007).

### **a. Reflexión.**

La reflexión es debida a tres fenómenos diferentes. La reflexión especular causa el brillo, mientras que la reflexión difusa externa es inducida por superficies rugosa. Ambos aportan solo información de la superficie de la muestra. La difusión de la luz (scattering) se produce como resultado de la refracción múltiple por cambio de fases en el interior del material. Hablaremos de ello en el apartado 2.6.4.

La reflexión se mide por el valor de  $R$ , reflectancia relativa, siendo, para cada longitud de onda:  $R(\lambda) = R_{\text{muestra}}(\lambda) / R_{\text{referencia}}(\lambda)$ .  $R$  de referencia se mide sobre un patrón blanco calibrado.

### **b. Absorción.**

Cuando la luz atraviesa un medio, se produce el fenómeno de absorción y sólo una parte de la radiación es transmitida al otro lado de la muestra. Para una longitud de onda determinada, se puede definir la transmitancia como:

$$\tau = \frac{I}{I_0}$$

Donde  $I_0$  es la intensidad de la energía incidente e  $I$  la intensidad de la radiación detectada después de pasar a través de la muestra. La absorbancia se define, en función de la transmitancia, como:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = -\log \tau$$

La absorción de la radiación sigue la ley de Beer-Lambert, que relaciona la absorbancia de la luz con las propiedades del material analizado. La ley de Beer-Lambert establece que:  $A = \epsilon d c$ , donde  $d$  es el espesor de la muestra,  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar y  $c$  la concentración molar del medio en estudio.

#### **2.6.4. Retrodifusión de la luz (light backscattering).**

Mientras que la absorción se debe a algunos constituyentes químicos de la fruta (como son los pigmentos: clorofila, carotenos y antocianos), la difusión está

influenciada por la densidad, composición, células y estructuras intracelulares del tejido, y en consecuencia puede ser útil para medir las características mecánicas del mismo.

La difusión se produce por múltiples refracciones por cambios de fases en el interior del material.

Los principales elementos de difusión en fruta y vegetales son las interfaces en las paredes de la células puesto que producen cambios abruptos en el índice de refracción (McGlone et al., 1997), pero las partículas en suspensión, como los gránulos de almidón, cloroplastos y mitocondrias pueden también inducir difusión por difracción en las superficies de la partículas donde el índice de reflexión es diferente al de los alrededores (Il'yasov and Krasnikov, 1991). La difusión depende del tamaño, de la forma y de la microestructura de las partículas. La difusión puede aparecer debido a heterogeneidades, como poros, aberturas, capilares que se distribuyen aleatoriamente en la muestra. Los procesos de difusión múltiple determinan ampliamente la intensidad de luz dispersada que es re-emitada al exterior (McGlone et al., 1997). El proceso de difusión afecta el nivel de intensidad del espectro reflejado más que la forma que está más relacionada con los proceso de absorción.

Muchos son los trabajos que han estudiado el fenómeno físico de la retrodifusión de la luz para predecir índices de calidad en fruta y hortaliza, como los de Qing et al (2007), Peng et al(2006), Tu et al (1995) en tomate y manzana usando un láser de diodo a 670nm, o McGlone et al (1997) determinando la firmeza en kiwi mediante un láser de 864 nm.

## **2.7. Métodos estadísticos.**

Una vez analizados los parámetros de firmeza y sólidos solubles por métodos físico-químicos, se necesita correlacionarlos con los valores tomados en retrodifusión de luz láser. Para ello se necesitan los métodos predictivos o de regresión. Estos estudian la construcción de modelos para explicar o representar la dependencia entre una variable respuesta o dependiente, Y, y la(s) variable(s) explicativa(s) o dependiente(s), X.

La representación de la relación entre dos o más variables a través de un modelo formal supone contar con una expresión lógico-matemática que, aparte de resumir cómo es esa relación, va a permitir realizar predicciones de los valores que tomará una de las

variables (variable de respuesta, dependiente, criterio o Y) a partir de los valores de la(s) otra(s) variable(s) (explicativa(s), independiente(s), predictiva(s) o X).

En la literatura estadística, se han planteado diferentes tipos de modelos predictivos que han dado respuesta a las características de las variables que pueden aparecer implicadas en un determinado modelo. El más conocido es el modelo de regresión lineal con variable de respuesta cuantitativa, o bien, otra opción, es el modelo de regresión logística con respuesta categórica. Dependiendo de la variable que se desee estimar se utiliza un modelo u otro.

Para realizar este trabajo, decidimos utilizar dos modelos de regresión lineal:

### **2.7.1. Análisis de Componentes Principales (PCA).**

El Análisis de Componentes Principales es un método introducido por Massy (1965) que aplica mínimos cuadrados sobre un conjunto de variables latentes llamadas componentes principales, obtenidas a partir de la matriz de correlación (varianza-covarianza).

### **2.7.2. Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS).**

La Regresión por mínimos cuadrados se introdujo hace casi treinta años y actualmente se utiliza en Quimiometría, donde se analizan datos que se caracterizan por muchas variables predictoras, con problemas de multicolinealidad, y pocas unidades experimentales en estudio (Geladi and Kowalski, 1986; Martens and Naes, 1989).

La regresión PLS consta de dos pasos fundamentales. Primero, transforma la matriz predictora, X (de orden  $n \times p$ ), con ayuda de vectores de respuesta Y (de orden  $n \times 1$ ) en una matriz de componentes o variables latentes no correlacionados,  $T = (T_1, \dots, T_p)$  de orden  $n \times p$ , llamados componentes PLS. Esto contrasta con el análisis de componentes principales, PCA, en el cual los componentes son obtenidos usando sólo la matriz predictoras X. Segundo, calcula el modelo de regresión estimado usando el vector de respuesta original y como predictoras, los componentes PLS.

### 3. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

La empresa hortofrutícola requiere sistemas efectivos de control y de calidad demandada por el consumidor. Tradicionalmente se han utilizado análisis físico-químicos que conllevan la destrucción del fruto y algunos análisis subjetivos como métodos no destructivos empleando escalas hedónicas.

La evaluación de la calidad de las manzanas se hace, de forma tradicional, mediante el control de una serie de parámetros que implican la destrucción del fruto. En manzana, los parámetros más utilizados para ello son la firmeza de la pulpa y el contenido de Sólidos Solubles Totales (SST).

La firmeza es uno de los parámetros que mejor se relaciona con la maduración de la fruta, ya que es una importante propiedad de muchos alimentos sólidos, como la manzana. La firmeza puede definirse como la resistencia a la fuerza de penetración que ofrece la pulpa de un fruto, fuerza que es necesaria para romper los tejidos del mismo (Mohsenin, 1986).

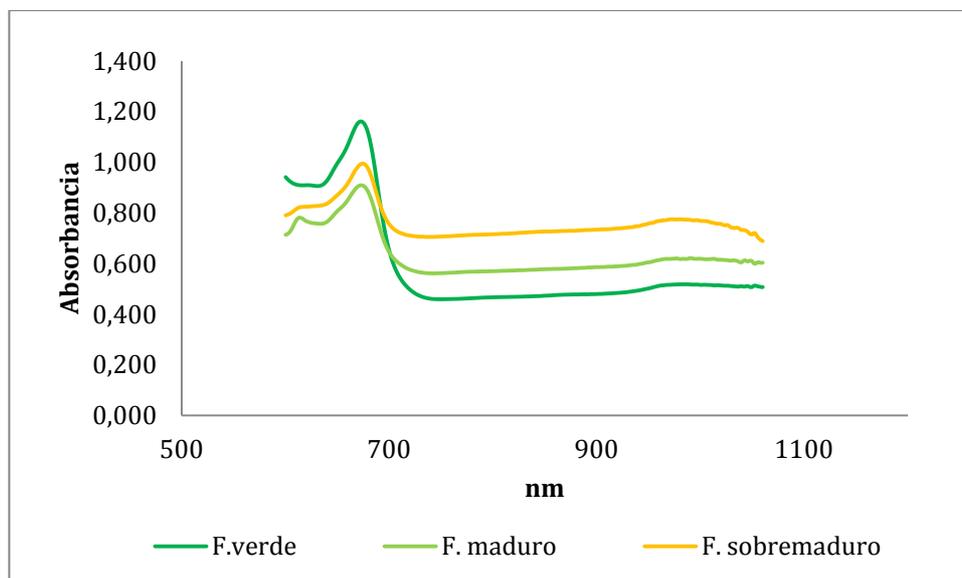
La cantidad de SST es otro parámetro que se utiliza para determinar la madurez del fruto, ya que conforme avanza la maduración los sólidos solubles aumentan. A lo largo del desarrollo de la pulpa, se depositan nutrientes en forma de almidón que se transforman en azúcares durante el proceso de maduración.

Una vez recolectada la fruta, su firmeza sufre un declive en su almacenamiento mientras que los SST se mantienen (Peng. Y, 2006).

En los últimos años se están estudiando técnicas no destructivas para medir la madurez del fruto y conocer el momento de su recolección. Tanto las medidas de firmeza como de SST son técnicas destructivas, como se ha dicho anteriormente, por lo que sólo se pueden aplicar a un porcentaje determinado de frutos. Por ello estas técnicas no pueden considerarse en la industria hortofrutícola como parámetro en la línea de clasificación.

Las técnicas más prácticas y satisfactorias para la evaluación no destructiva de la calidad de los productos agrícolas son las técnicas basadas en las propiedades ópticas de las frutas (Chen, 1996). Estas técnicas parecen prometedoras, pero su relación con el

método destructivo estándar no está bien establecido para la firmeza de la manzana (Shmulevichet al., 2003; Lu, 2004). Una de estas técnicas no destructivas, en las que se está trabajando, es el análisis de las imágenes capturada de la retrodifusión de luz de láseres con longitudes de onda en las zonas del espectro de Infrarrojo cercano (NIR) y del Visible. Las longitudes de onda del Visible son absorbidas por los diferentes pigmentos que componen la manzana como clorofila, carotenos y antocianos (Knee, 1972; Merzlyak, Gitelson, Chivkunova, y Rakitin, 1999; Zude-Sasse, Herold, y Geyer, 2000). Además muchos estudios consideran la banda de absorción de la clorofila, en el visible, y la del agua, en el NIR, como las más relacionadas con el estado de madurez y la firmeza (Peng and Lu, 2007, McGlone et al 1997). Por ello, en este trabajo se utilizó un láser con una longitud de onda de 980 nm, dentro de una de las bandas de absorción del agua, otro láser con una longitud de onda de 670 nm, la cual está dentro del espectro visible y relacionado con la capacidad de absorción de luz de la clorofila y otro de 785 nm entre las dos bandas de absorción. Figura 5.



**Figura 5:** Ejemplos de espectros de absorción Vis-NIR de manzanas en distintos estados de maduración, siendo el pico más alto el correspondiente a la clorofila.

En este tipo de trabajos, tras la adquisición de las imágenes de retrodifusión de la luz de los láseres en las manzanas, se procede a un análisis digital de estas imágenes y se cuantifican diferentes parámetros de las mismas. Estos parámetros varían en las diferentes publicaciones (Peng. Y, 2006; Qing. Z *et al*, 2007).

El objetivo que se pretende alcanzar con este trabajo es establecer un modelo estadístico que correlacione las medidas de firmeza y de contenido en Sólidos Solubles Totales (SST) con los diámetros medios de Feret correspondientes a las segmentaciones de las imágenes en función de distintos niveles de gris. Estos niveles de gris varían desde la zona central al exterior en función de la madurez del fruto.

De este modo, se podría obtener un sistema no destructivo de clasificación de la manzana por su calidad, basado en los parámetros tradicionales de clasificación en la industria: firmeza y SST.

## **4. METOLOGIA**

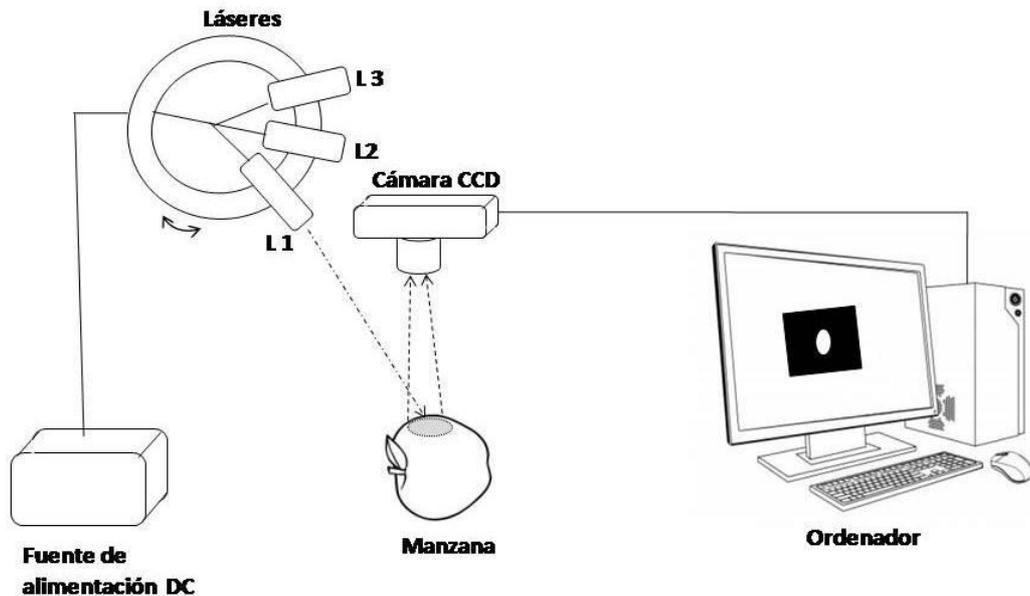
### **4.1 Fruta**

En este estudio hemos trabajado con la variedad de manzana ‘Smoothie Golden Delicious’, que es una mutación natural de “Golden Delicious”, descubierta en 1958 en EE.UU. Los frutos analizados se han obtenido de una plantación cultivada en una parcela experimental de Estación Experimental de Aula Dei (CSIC) en Zaragoza. La finca posee riego por goteo y sus árboles están formados en eje central. El marco de plantación es de 3 metros entre árboles y 5 metros entre filas. La recogida de los frutos y las medidas experimentales del ensayo fueron realizadas por personal perteneciente al CSIC durante la campaña de 2012, con una frecuencia de 15 días, desde Mayo hasta Octubre, recogiendo 25 frutos por fecha de muestreo, en un total de 9 fechas.

En todos los frutos se obtuvieron imágenes multiespectrales de la zona de impacto de las luces láser como método no destructivo a estudio. Además se analizaron los parámetros sólidos solubles y firmeza, mediante los tradicionales métodos destructivos.

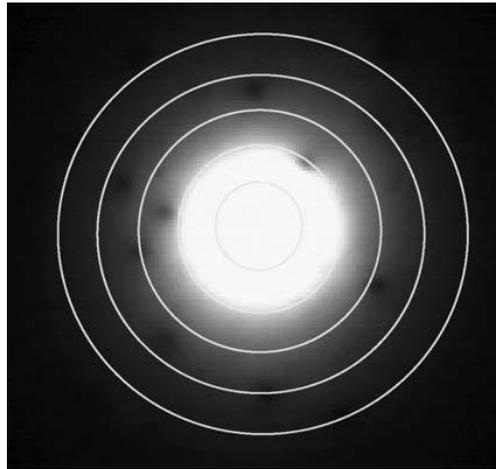
### **4.2 Adquisición y tratamiento de imágenes.**

La Figura 6 representa un esquema del dispositivo utilizado para la adquisición de imágenes. Las imágenes multiespectrales se obtuvieron mediante una cámara monocromática CCD (Charge Coupled Device: Dispositivo de Carga Acoplado), BASLER A310f (Germany) sensible al Vis-NIR (400 - 1000 nm). Las muestras se disponían en un dispositivo que permitía obtener un área de retrodifusión de hasta 25 mm de diámetro. El ángulo de incidencia del haz láser fue de 15° con la normal y la distancia de la cámara al fruto fue de 14 cm en la normal. El tamaño de las imágenes era de 782 x 582 píxeles. Las imágenes fueron tomadas en una habitación sin luz, a temperatura ambiente de 20°C.



**Figura 6:** Esquema del funcionamiento del equipo utilizado para la captura de imagen de la retrodifusión de la luz. Se utilizaron tres láseres con diferentes longitudes de onda: L1- 670 nm, L2- 785 nm, L3- 980 nm.

Como iluminación, se utilizaron tres láseres de diodo colimados (Power Technology), con longitudes de onda de 670, 785 y 980 nm y con 3 mW, 3 mW y 28.3 mW de potencia de salida, respectivamente. La alta potencia de salida del láser de 980 nm tiene como motivo compensar la pérdida de sensibilidad de la cámara en esta zona del espectro respecto a las otras longitudes de onda. Las tres longitudes de onda fueron seleccionadas en base a otros estudios (Peng et al, 2006; Qing et al, 2007). La retrodifusión de la luz proveniente de la superficie del fruto, fue registrada mediante imágenes monocromáticas. Cada una de las imágenes obtenidas fue analizada con el Software Matrox 8.0 para obtener el diámetro medio de Feret de cada segmentación de la imagen obtenida para los distintos niveles de gris, como se puede ver en la Figura 7. Dado que las figuras correspondientes a las segmentaciones no son circulares, se calcula el diámetro medio de Feret como la media de los distintos diámetros de Feret de la figura, que son los diámetros de las proyecciones de un objeto medidos a diferentes ángulos con la horizontal, en sentido anti horario entre 0° y 180°, realizando 36 medidas, una cada 5°. En este caso equivaldría al diámetro de la circunferencia con el mismo perímetro que la segmentación.



**Figura 7: Imagen capturada de la retrodifusión de luzláser, subdividida en segmentos con diferentes niveles de gris (los círculos son una aproximación).**

La escala de niveles de grises va de negro (0) a blanco (255). La segmentación de la imagen se ha realizado disminuyendo los niveles de gris cada 10 unidades desde el nivel 245 hasta el nivel 65. Se han considerado los valores entre 255 y 245 como zona de saturación y los valores por debajo de 65 como ruido.

#### **4.3 Firmeza.**

Mediante el método estándar de Magness-Taylor, se midió la firmeza como la máxima fuerza necesaria para perforar una manzana una profundidad de 10 mm, en un equipo TA.XT plus (Stable Micro Systems, Godlming, UK) controlado por PC. El texturómetro estaba equipado con una sonda de una fuerza máxima de 5 kgf, con una resolución de 0.0001 kgf y una precisión de 0.0025%. La medida se realizó en los puntos donde se habían obtenido las imágenes, en caras opuestas de la manzana, tras retirar la piel. La sonda tenía 11 mm de diámetro y su velocidad de avance fue de 2 mm/s.

#### **4.4 Sólidos Solubles Totales.**

El análisis de sólidos solubles totales se llevó a cabo mediante la utilización de un refractómetro digital PR-101 ATAGO CO. (Tokyo, Japón). Cada muestra se licua y se utilizan unas gotas para medir la media de los azúcares presentes en todo el fruto, en grados Brix, la medida se hizo por duplicado. El grado Brix representa el % (p/p) de sacarosa disuelta en agua.

#### 4.5 Métodos estadísticos.

La selección de muestras para la calibración y validación es uno de los pasos críticos para el desarrollo del modelo de calibración. Como paso previo a la obtención de los modelos de calibración se ha realizado un Análisis de Componentes Principales (PCA) para detectar muestras anómalas, es decir, muestras que no explicaría el modelo. Las muestras detectadas como anómalas no se incluyen en el grupo de muestras a estudio. Posteriormente, para la calibración y la validación, se realizó una subdivisión al azar, usando una proporción 2:1 respectivamente.

Para obtener el modelo, se utilizó el análisis PLS, que es un método de regresión muy utilizado para construir modelos de predicción de parámetros de referencia obtenidos mediante métodos convencionales destructivos, partiendo de un elevado número de variables con alta colinealidad, (Ubina, K.,2009). Este método permite correlacionar los parámetros de las imágenes de retrodifusión de luz láser proveniente de la manzana con los parámetros físico-químicos de la misma: firmeza y SST. Para desarrollar los modelos de calibración se utilizó el software TheUnscrambler X (CAMO).

Para evitar el sobreajuste en el desarrollo de los modelos de calibración, hemos usado la validación cruzada en la evaluación de los modelos. El mejor modelo de calibración se ha seleccionado usando los siguientes parámetros estadísticos: coeficiente de determinación para la validación cruzada ( $R^2_{CV}$ ) y error estándar de la validación cruzada (SEVC) (Williams, 2001). Además, para la validación del modelo, se han utilizado otros valores estadísticos como el coeficiente de variación (%CV), que se define como el porcentaje de la relación SECV y el valor medio de los datos de referencia del conjunto de calibración, y la desviación residual predictiva (RPD). Este valor interesa que sea mayor de 3 y se calculó como la relación entre SD y SECV (Williams, 2001). Estos dos últimos estadísticos permiten normalizar el SECV, facilitando la comparación de los resultados obtenidos con diferentes conjuntos de datos (Williams, 2001).

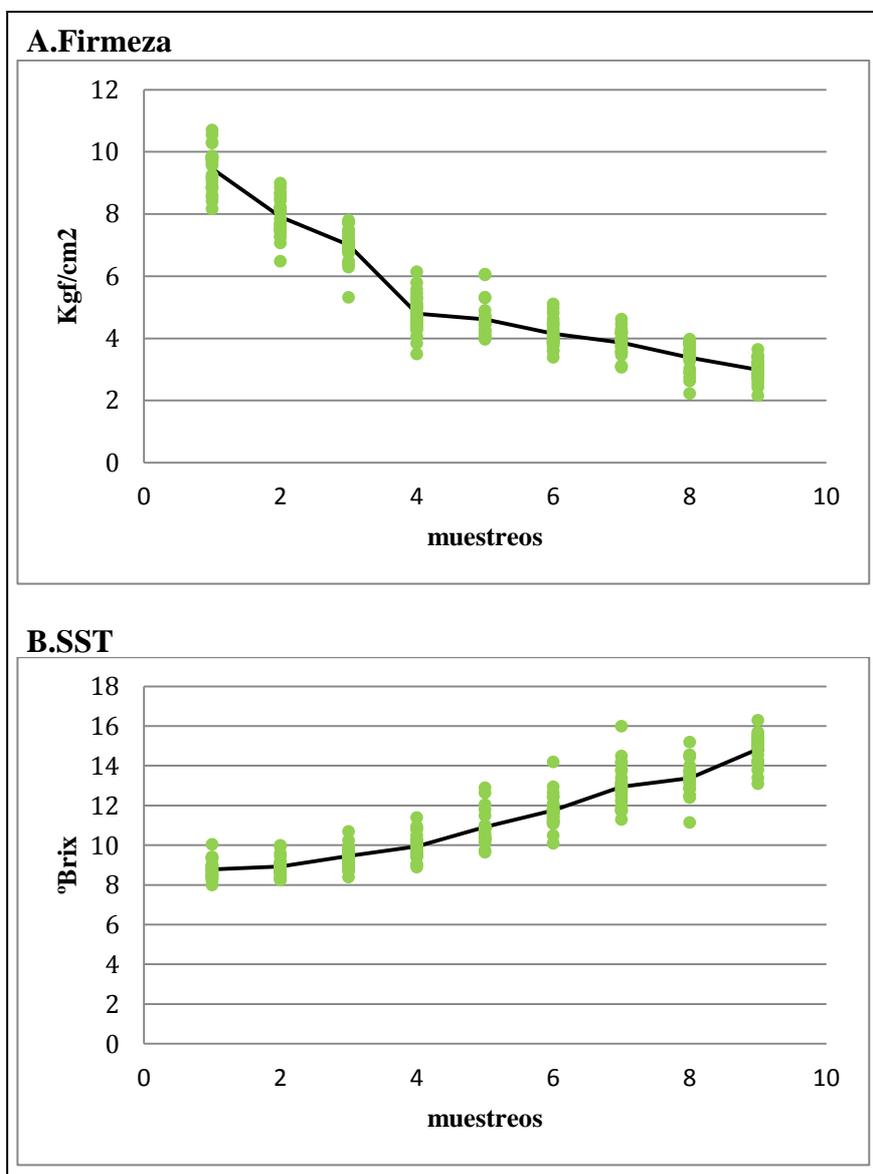
Los mejores modelos de predicción obtenidos fueron posteriormente sometidos a la validación externa. El efecto de los diferentes ajustes en el rendimiento del modelo se evaluó mediante la comparación del error cuadrático medio de predicción (RMSEP),

el coeficiente de validación externa ( $r^2$ ), el bias (diferencia entre el valor medido y el valor).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Métodos destructivos. Firmeza y SST.

La evolución de la firmeza y los SST conforme avanzan las fechas de muestreo se pueden ver en la Figuras 8.

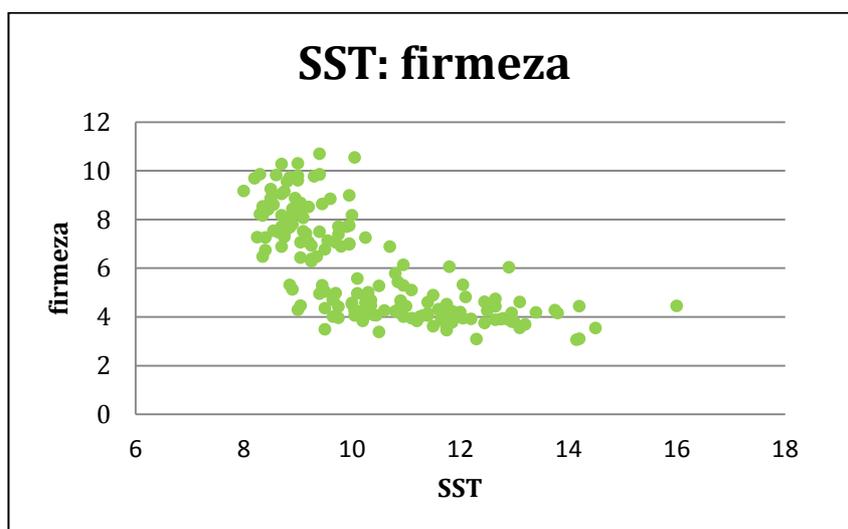


**Figura 8:** Evolución de los valores de la firmeza (A) y del contenido en SST (B) en cada manzana de los diferentes muestreos.

En estas figuras, se representan los valores individuales de los parámetros físico-químicos medidos en las manzanas de cada grupo de muestras correspondientes a las diferentes fechas de muestreo. De esta manera se confirmó tanto la disminución de la firmeza como el aumento de los SST conforme avanza el estado de maduración del

fruto, aunque, como puede verse, no lo hacen de forma lineal. La firmeza comienza en unos valores medios de  $9 \text{ kgf/cm}^2$  y termina con una media de  $3 \text{ kgf/cm}^2$ , disminuyendo tres veces su valor. En cambio, los valores de los SST no llegaron a duplicarse comenzando en un valor medio de  $8^\circ \text{ Brix}$  y terminando con  $15^\circ \text{ Brix}$ .

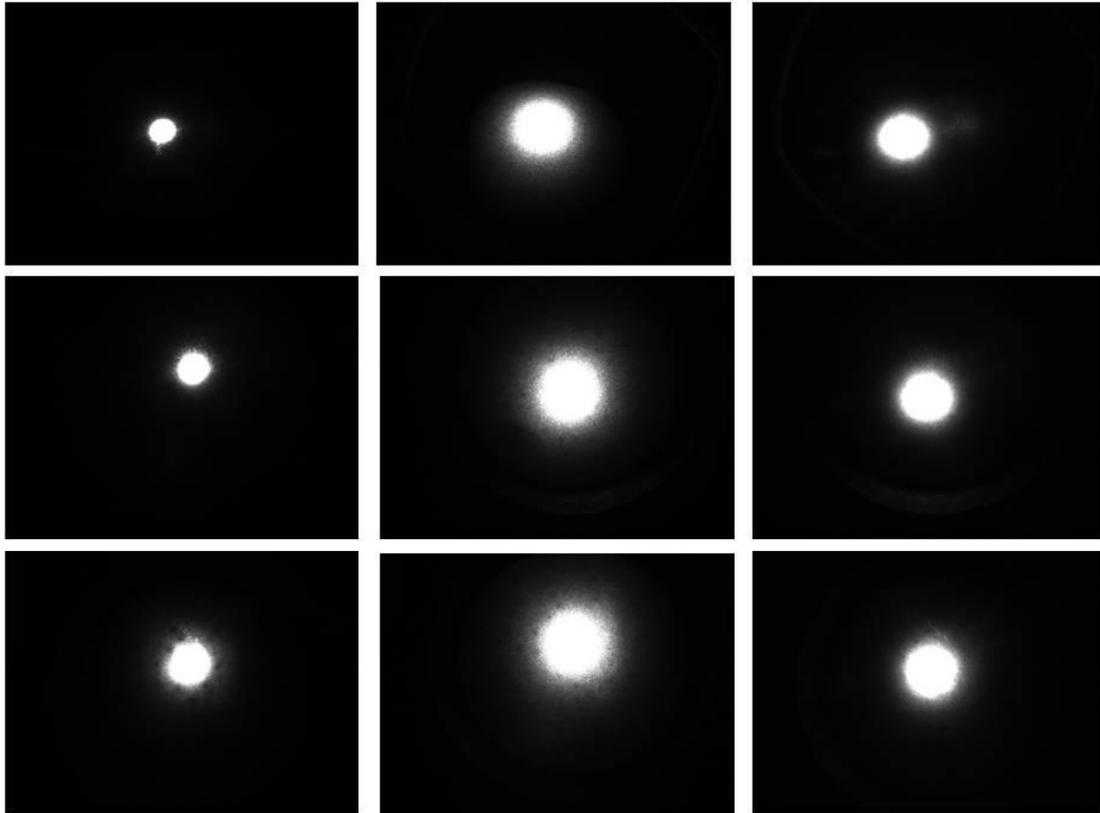
En la Figura 9 se presenta la relación, fruto a fruto, de los valores de firmeza frente a SST. Puede observarse que la evolución de ambas es prácticamente independiente una de la otra, y no puede establecerse un modelo de evolución.



**Figura 9: Representación de la firmeza frente a los SST en cada manzana de los diferentes muestreos.**

## 5.2 Imágenes de luz retrodifundida.

Para mostrar el comportamiento de luz retrodifundida, en la Figura 10 presentamos, como ejemplos, 9 fotografías tomadas en diferentes fechas de maduración, fruto verde, maduro y con sobremaduración, en las diferentes longitudes de onda estudiadas. Se puede observar cómo las manzanas dispersan la luz de distinta forma, dependiendo de la fecha de recogida: cuanto mayor es el estado de maduración mayor es el tamaño de la imagen de la dispersión de luz. Este fenómeno ocurre con los tres láseres por igual. A la vez se puede apreciar el diferente modo de dispersar la luz de cada uno de los láseres dentro del mismo estado de un fruto.



**Figura 10: Imágenes de luz retrodifundida de los 3 láseres utilizados (de derecha a izquierda 670, 785 y 980) en 3 frutos con diferente grado de madurez (de arriba abajo verde, maduro y sobremaduro). Puede observarse la diferente imagen de los láseres en cada fruto, así como la evolución de la imagen de cada láser con la maduración del fruto.**

Se comprueba que el láser que presenta un mayor campo de dispersión de la luz es el que corresponde a una longitud de onda de 785nm y el que menos la dispersa el láser de 670nm, lo que podría explicarse por la mayor absorción de esta longitud de onda por parte de la clorofila. Conforme avanza el estado de maduración aumenta claramente la dispersión de luz, modificándose los diámetros de Feret de las segmentaciones de los niveles de gris que aparecen en las imágenes. En las imágenes que presentan mayor dispersión de luz se pueden observar unas manchas circulares negras alrededor del punto central, que corresponden a las lenticelas de la piel de la manzana, tema que no estudiaremos en este trabajo, y cuyos valores hemos tenido que eliminar.

Sobre cada una de las imágenes correspondientes a cada fruta, se realizó una segmentación basada en los diferentes niveles de gris seleccionados, disminuyendo los niveles de gris de 10 en 10 unidades desde 245 hasta 65. Después, utilizando el

programa Matrox, se ha realizado un script para el cálculo automático de los diámetros medios de Feret correspondientes a cada segmentación, lo que nos ha permitido tener una distribución de estos valores para cada imagen en función de los niveles de gris, como puede verse en los ejemplos de la Figura 11 y 12.

En las Figuras 11 y 12 se confirma lo que se observa en las imágenes de la Figura 10. En las gráficas de la Figura 11 se ve que, al avanzar la fecha de muestreo, se dispersa más la luz, es decir, en un mismo nivel de gris el diámetro es mayor en las manzanas conforme avanza la campaña de recolección. Respecto a la Figura 12 se comprueba que la luz el láser correspondiente a una longitud de onda de 785 nm, es la que sufre mayor dispersión al incidir sobre la manzana, independientemente del momento de maduración en el que se encuentra y la que menos se dispersa es la que corresponde a la longitud de onda de 670 nm.

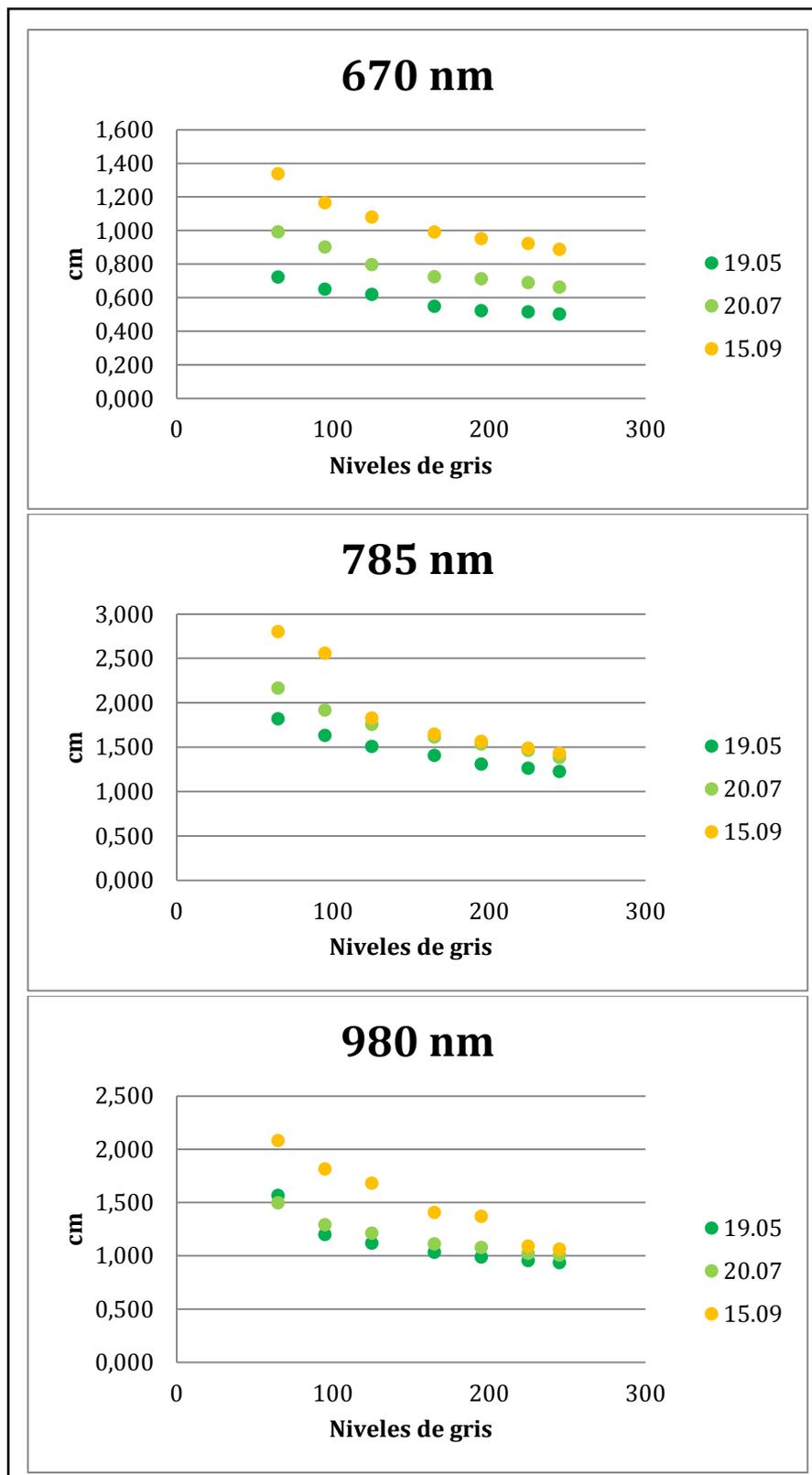


Figura 11: Evolución de los diámetros medios de Feret de las segmentaciones de los diferentes niveles de gris para cada láser, en los tres grados de madurez seleccionados.

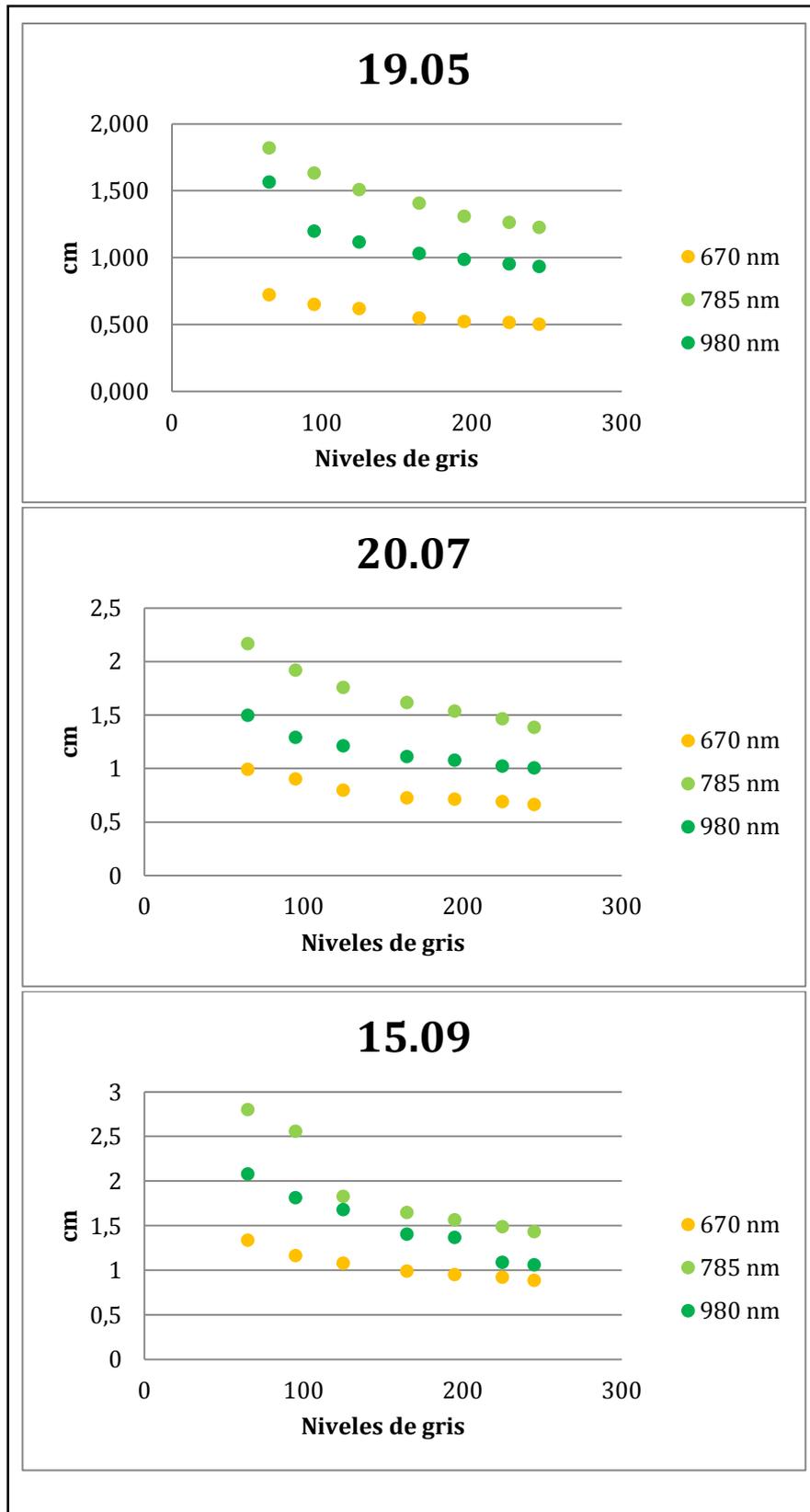


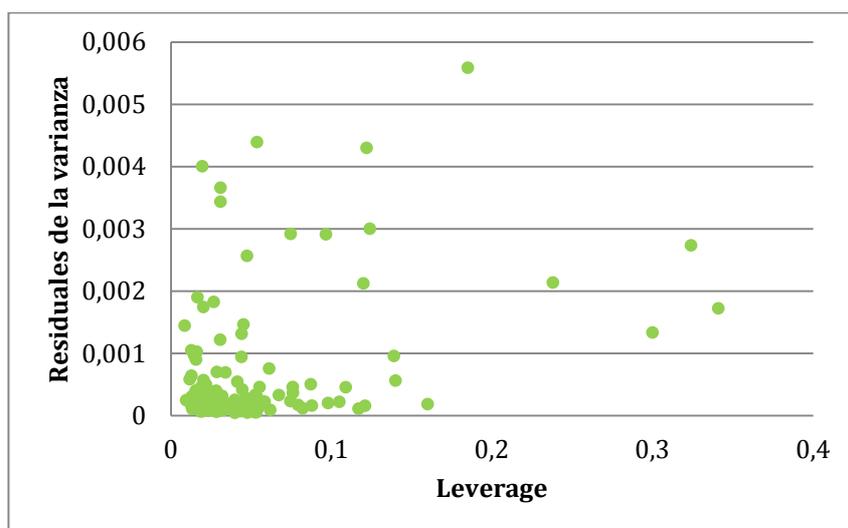
Figura 12: Evolución de los diámetros medios de Feret de las segmentaciones en los diferentes niveles de gris, en cada grado de madurez seleccionado, para los tres láseres.

### 5.3 Análisis estadístico.

Una vez conocidos los valores de cada uno de los métodos de análisis se procedió a analizarlos estadísticamente para poder relacionar firmeza y SST de los métodos destructivos con los diámetros medios de Feret de las imágenes de retrodifusión para los tres láseres empleados, del método no destructivo. La relación de cada uno de los métodos destructivos con el método no destructivo se hizo por separado, ya que entre firmeza y SST no se encontró la correlación entre ellos.

#### 5.3.1 Eliminación de muestras anómalas. Análisis PCA.

Lo primero fue realizar un análisis PCA para rechazar las manzanas anómalas. El programa considera anómalas aquellas muestras cuyos valores de “leverage” son superiores a 2,5. Se entiende por leverage la distancia entre el punto que representa la muestra y el centro del nuevo espacio creado por PCA. En este caso no considera anómalas ninguna muestra, como puede verse en la Figura 13.



**Figura 13: Representación de los valores residuales de la varianza frente a los de leverage de las muestras utilizadas para buscar muestras anómalas. Puede observarse que no hay ninguna.**

#### 5.3.2 Análisis PLS.

Una vez se conoció el número de muestras anómalas, se aplicó un análisis PLS, utilizando una matriz de 22 variables con un total de 208 muestras. Para establecer el modelo de calibración, se utilizaron 139 muestras, elegidas al azar entre todas las manzanas, mientras que para la validación se utilizaron las 69 restantes. En la Tabla 2 se

muestran los valores de media, desviación estándar (DS), rango de valores medios y coeficiente de variación (%CV) para los grupos de calibración y validación de los dos parámetros de estudio: Sólidos Solubles Totales y firmeza.

**Tabla 2: Valores estadísticos en los grupos de calibración y validación para los parámetros de SST y firmeza.**

	SST		Firmeza	
	Calibración	Validación	Calibración	Validación
<b>N</b>	139	69	139	69
<b>Media</b>	11.1	11.3	5.51	5
<b>DS</b>	2.2	2.2	2.28	1.78
<b>Rango</b>	8.2-16.3	8.2-15.5	2.16-10.55	2.74-9.18
<b>%CV</b>	19.4	19.1	41.46	35.59

Se puede comprobar, dentro de los grupos de valores de calibración y validación, que la selección realizada al azar presenta dos distribuciones estadísticas similares, ya que la diferencia entre los valores es mínima, observando cada parámetro por separado.

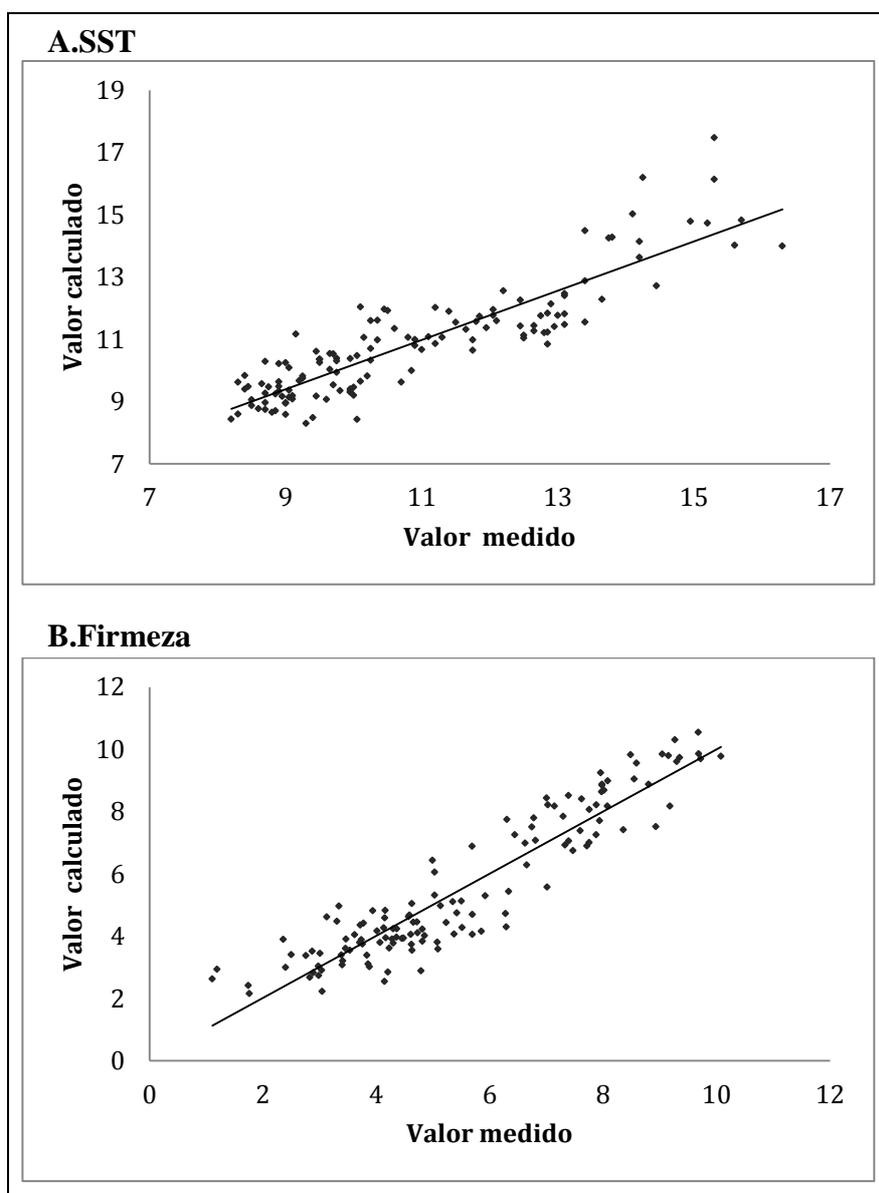
En la Tabla 3 aparecen los estadísticos de calibración para dichos índices. Para el contenido de sólidos solubles totales se obtuvo un valor de  $R^2_{CV}=0.93$  y para la firmeza de  $R^2_{CV}=0.87$  más altos que los obtenidos por otros autores usando metodología similar como Quing et al. (2007), con valores de  $R^2=0.76$  y  $0.80$  para sólidos solubles y firmeza respectivamente, y Lu (2003), con  $R^2=0.77$  para firmeza.

Para ambos modelos obtenidos, el número de componentes principales, PLS, fueron muy bajos (1 y 2 respectivamente) y los valores de RPD fueron elevados para ambos índices de madurez, siendo mayor para el caso de la firmeza, 2.65, estando muy próximos de los valores óptimos de RPD (3) para considerarse un modelo aceptable.

En la Figura 14 se representan los valores obtenidos con los modelos encontrados tanto para SST como para firmeza frente a los valores calculados experimentalmente, comprobando la alta correlación entre ellos.

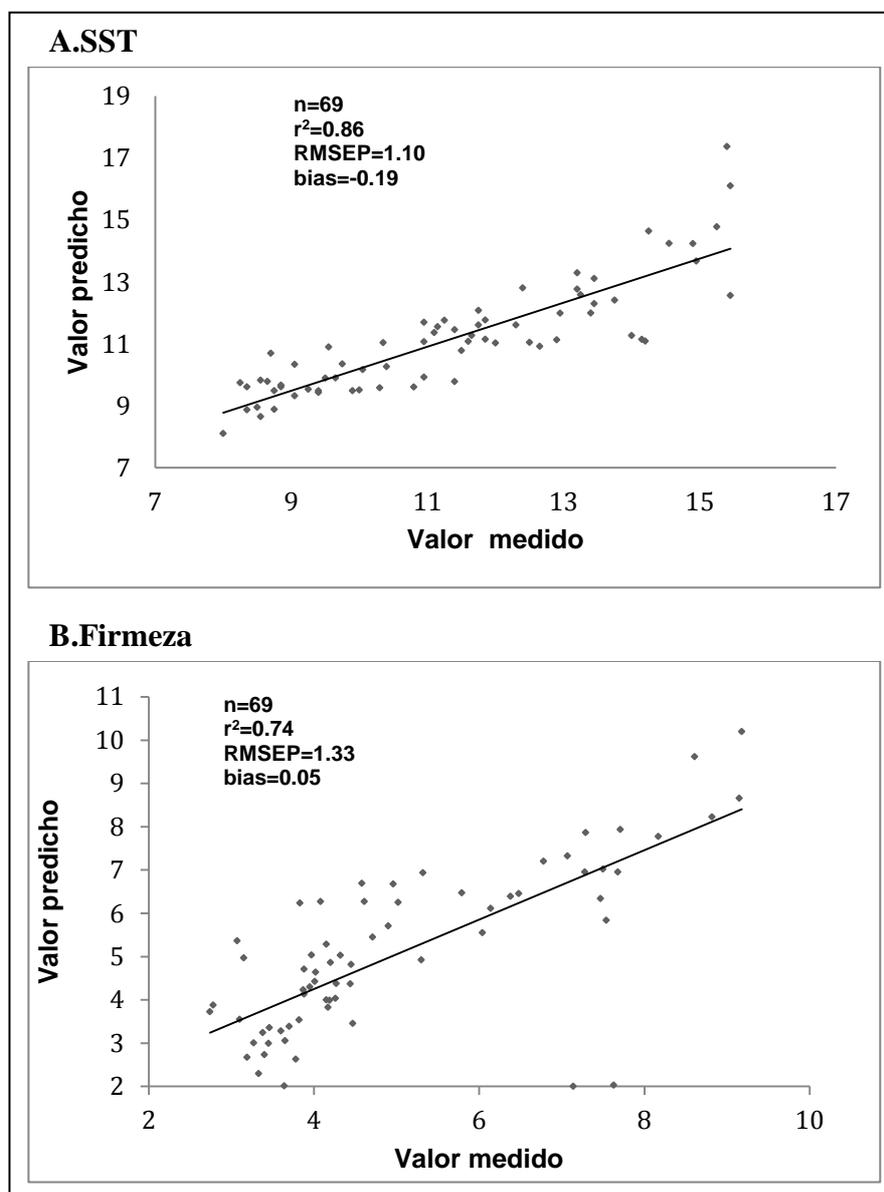
**Tabla 3: Estadísticos de cada modelo de calibración obtenido para cada uno de los índices de madurez estudiados. N: número de muestras, PLS: número de componentes principales, SECV: error estándar de validación cruzada,  $R^2_{cv}$ : coeficiente de determinación de validación cruzada, RPD: desviación residual predictiva.**

	<b>SST</b>	<b>Firmeza</b>
<b>N</b>	131	131
<b>PLS</b>	1	2
<b>SECV</b>	0.78	0.85
<b><math>R^2_{cv}</math></b>	0.93	0.87
<b>RPD</b>	2.17	2.65



**Figura 14: Representación de los valores calculados por el modelo para SST (A) y firmeza (B) frente a los valores medidos experimentalmente en los modelos de calibración.**

Una vez obtenido cada modelo de calibración se procedió a realizar una validación externa de los mismos. Estas se llevaron a cabo con las 69 muestras restantes (Tabla 2). En la Figura 15 se muestran las representaciones gráficas de los valores predichos frente a los medidos para ambos parámetros.



**Figura 15:** Representación de los valores calculados para SST (A) y firmeza (B) frente a los valores medidos experimentalmente, al aplicar los modelos al grupo de calibración.

En cada gráfica se presentan los estadísticos de validación. Se observa valores de coeficiente de regresión altos  $r^2=0.86$  para sólidos solubles y  $r^2=0.74$  para firmeza.

#### **5.4 Discusión.**

Con estos resultados se deduce que se puede obtener una buena predicción de los parámetros de calidad en manzana para esta campaña, en la que se ha obtenido una gran variabilidad de los parámetros a determinar, ya que el tiempo de muestreo ha sido muy amplio. Pero, es necesario trabajar con más campañas para obtener modelos de calibración más generales, que puedan ser aplicarlos en cualquier campaña posterior.

## 6. CONCLUSIÓN

En este trabajo se ha comprobado la posibilidad de aplicar las técnicas no destructivas de análisis de imágenes de retrodifusión de luz láser para predecir los parámetros de calidad firmeza y SST en manzana de la variedad '*Smoothee Golden Delicious*'.

No obstante, consideramos que es necesario seguir trabajando con más campañas para construir modelos de predicción más completos, ya que no tenemos la certeza de que este modelo sea aplicable a otras campañas. Estos modelos permitirían el control en líneas de las manzanas '*Smoothee Golden Delicious*'.

Futuros trabajos en este campo pueden conducir a la aplicabilidad de esta técnica a otras variedades de manzana con interés para su comercialización.

## CONCLUSION

The possibility to apply non-destructive techniques of analysis of images of backscattering of laser light to predict quality parameters firmness and SST in the variety 'Smoothee Golden Delicious' Apple is verified in this work.

However, we believe that it is necessary to continue working with more campaigns to build predictive models more complete, since we don't have the certainty that this model is applicable to other campaigns. These models would allow the control on line of the apples '*Smoothee Golden Delicious*'.

Future work in this field can lead to the applicability of this technique to other varieties of apples with interest for marketing.

## **7. IDENTIFICACIÓN DE LAS APORTACIONES QUE, EN MATERIA DE APRENDIZAJE, HA SUPUESTO ESTE TRABAJO.**

En el tiempo que me ha llevado realizar este trabajo he aprendido sobre técnicas de análisis de calidad de la fruta, ampliado mi conocimiento en las técnicas no destructivas basadas en las propiedades ópticas de la fruta, cómo es la retrodifusión de la luz.

Dado que estas técnicas no destructivas necesitan el análisis de la imagen capturada, por lo que también he utilizado Software Matrox 8.0, programa que desconocía y del que todavía me quedan muchas cosas por aprender en él.

Y ya como se describe en el apartado de material y métodos de este trabajo que es necesario relacionar los datos obtenidos de los parámetros físico-químicos medidos con los obtenidos en el análisis de imagen, he tenido que utilizar para ello el programa estadístico The Unscrambler X. Por tanto en materia de aprendizaje he aprendido a aplicar un método matemático con el que poder relacionar datos de forma estadística, técnica que está dentro de la Quimiometría.

## **8. EVALUACIÓN DEL TRABAJO Y SUGERENCIAS DE MEJORA.**

Durante el periodo de tiempo que he estado realizando este trabajo, he llevado a cabo tareas diferentes a lo que había realizado hasta ahora. Tanto durante mi formación en la universidad, en las prácticas que en cada asignatura se llevan a cabo, como prácticas y trabajo que he realizado con mi formación de Técnico Superior en Salud Ambiental.

Ya había realizado trabajos de investigación en mi estancia en prácticas externas en CNTA, pero en un campo diferente como son los bioprocesos, y sigue siendo una competencia que me gusta y me parece interesante.

Este trabajo es útil para mi formación, ya que con el he podido aprender, recordar y fijar conocimientos. Aunque me parece que el tiempo invertido para realizarlo es superior al que los 6 ECT le corresponden. Por ello sugeriría una asignatura de 12 ECT en la que pudiera elegirse entre realizar un Trabajo Fin de Grado o un Practicum, añadiendo una presentación ante un tribunal de este último.

Además mi tutor Ángel Ignacio Negueruela ha supervisado mi trabajo, Victoria Lafuenteme ha ayudado en la recogida de material y con el tratamiento estadístico y Concha Urzola en análisis digital de imagen. En todo momento me han explicado el fundamento del trabajo al igual que han estado siempre dispuestos a resolver cualquier duda que pudiera tener.

## 9. BIBLIOGRAFIA

- CAMO Software AS TheUnscrambler X.1. Oslo. Norway.
- Carrera, m. (1999). Variedades y calidad de las manzanas de Aragón. Ed. Apeph 1999. Zaragoza.pp. 70.
- Chen, P. 1996. Quality evaluation technology for agricultural products. In: Proc. Int.Conf. on Agric. Machinery Engineering. Seoul. Korea.
- Coutanceau, m. (1971). Fruticultura. Técnicas y economía de los cultivos de rosáceas leñosasproductoras de fruta. Oikos- Tau S.A. pp. 46- 47.
- Geladi P, Kowalski B, 1986. Partial least squares regression; a tutorial.AualChimActa 185, 1-17.
- Ilyásov,S.G., Krasnikov,V.V., 1991. Physical Principals of Infrared Irradiation of Foodstuffs.Hemisphere Publishin Corporation, New York, USA.
- Knee, M. (1972). Anthocyanin, carotenoid, and chlorophyll changes in the peel of Cox\_s Orange Pippin apples during ripening on and off the tree. Journal of Experimental Botany, 23, 184-196.
- Lu, R., 2003. Near-infrared multispectral scattering for assessing internal quality of apple fruit. SPIE Proc. 5271, 313–320.
- Lu, R., 2004. Multispectral imaging for predicting firmness and soluble solids content of apple fruit.Postharvest Biol. Technol. 31, 147–157.
- MAGRAMA. 2012. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. MAGRAMA, Madrid, España.
- Martens, H. and Naes, T. 1989.Multivariate calibration.John Wiley and Sons Inc., Chichester, UK.
- McGlone, V.A., Abe, H., Kawano, S., 1997. Kiwifruit firmness by near infrared light scattering. J. Near Infrared Spectrosc. 5, 83-89.
- Merzlyak, M. N., Gitelson, A. A., Chivkunova, O. B., &Rakitin, V. Y. (1999).Non destructive optical detection of pigment changes during leaf senescence and fruit ripening. PhysiologiaPlantarum, 106(1), 135-141.
- Mohsenin, N. N. 1986. Physical properties of plant and animal materials: structure, physical, characteristics and mechanical properties. New York: Gordon and Breach Science Publishers. 664 p.

- Nicolai, B.M. et al, 2007. Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review. *Postharvest Biology and Technology*. 46, 99-118.
- Peng, Y and Lu, R. 2006. Improving apple fruit firmness predictions by effective correction of multispectral scattering images. *Postharvest Biology and Technology* 41, 266–274.
- Qing. Z, Ji .B, Zude. M, 2007. Predicting soluble solid content and firmness in apple fruit by means of laser light backscattering image analysis *Journal of Food Engineering* 82 ,58–67.
- Shmulevich, I., Galili, N., Howarth, M.S., 2003. Non-destructive dynamic testing of apples for firmness evaluation. *Postharvest Biol. Technol.* 29, 287–299.
- Tu, K., De Busscher, R., De Baerdemaeker, J., Schrevens, E. 1995. Using laser beam as light source to study tomato and apple quality non-destructively. *Food Processing Automation IV Conference*, Chicago, IL, 3-5. November. Pp. 528-536.
- Ubina, K., 2009. “Determinación no destructiva de parámetros de calidad de frutas y hortalizas mediante espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano”. Tesis doctoral. Departamento de bromatología y tecnología de los alimentos. Universidad de Córdoba.
- Vallejo V., 1990. La calidad de los frutos. *Revista de fruticultura*. 5, 2.
- Williams, P.C., 2001. Implementation of near-infrared technology. In: Williams, P.C., Norris, K.H. (Eds.), *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*. AACC Inc., St. Paul, MN, pp. 145–171.
- Zude-Sasse, M., Herold, B., & Geyer, M. (2000). Comparative study on maturity prediction in *\_Elstar\_* and *\_Jonagold\_* apples. *Gartenbauwissenschaft*, 65(6), 260 -265.