

Treball final de grau

Estudi: Grau en Innovació i Seguretat Alimentària

Títol: Sensors d'espectroscòpia d'infraroig proper (NIR) per avaluar la frescor del peix i els cicles de congelació.

Document: Memòria treball experimental de recerca

Alumne: Clara Vergés i Basagaña

Tutor: Mar Giró Candanedo / Elena Fulladosa / Mònica Toldrà Alegret

Departament: Tecnologia alimentària / EQATA

Àrea: Tecnologia d'Aliments, IRTA Monells / Tecnologia dels aliments, UdG

Convocatòria (mes/any): Juny 2022

AGRAÏMENTS

Amb aquestes línies m'agradaria donar les gràcies a totes aquelles persones que han fet possible la realització d'aquest projecte i que, d'alguna manera o altra, m'han acompanyat al llarg d'aquesta experiència.

Primerament m'agradaria agrair a la Mar Giró i l'Elena Fulladosa, tutors d'aquest treball, que m'han donat l'oportunitat de realitzar aquest treball, desenvolupat en el marc d'un projecte de recerca (RTI2018-096883-R-C41) del Programa de Tecnologia Alimentària de l'Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), centre de Monells (Girona). Per a l'ajuda, esforç i paciència incondicional en tot moment, per a tots els consells que m'han donat i per les coses que he après al seu costat. Per haver-me ajudat a ser una persona més crítica, autònoma i segura.

Donar les gràcies al centre IRTA Monells per l'oportunitat de realitzar el treball en el seu centre d'investigació, i a tot el personal per ajudar-me sempre que ho he necessitat. Gràcies per rebre'm i acollir-me, per fer-me sentir una més dins el centre, gràcies per la paciència i sobretot, per les bones estones que m'han regalat.

A la Mònica Toldrà, per acceptar ser la meva tutora, per tota la seva ajuda, els consells que m'ha donat durant aquests mesos, pel seu suport i la infinita paciència que ha tingut sempre amb mi. Gràcies de tot cor per a tots aquests anys.

A la Marta i la Gemma, amb qui va començar tota aquesta aventura i que s'han convertit en el meu suport diari. Gràcies per compartir aquest camí, gràcies per tots els moments viscuts i gràcies per fer-me veure la llum en els dies on tot era negre.

A la meva família per acompanyar-me en tot el que faig i creure en mi, per donar-me tot el suport, comprensió i recolzament al llarg del viatge.

A totes i tots, moltes gràcies.

PARAULES CLAU

- Verat (*Scomber scombrus*)
- Tecnologies no destructives
- Infraroig proper
- Espectròmetre NIR
- Contingut d'humitat
- Congelació
- Frau

RESUM

El peix i els productes de la pesca són una font de nutrients essencials per a una dieta sana i equilibrada. En els darrers anys s'ha observat un augment del consum mundial de peix, gràcies a la conscienciació per a mantenir uns hàbits alimentaris més saludables. Un percentatge considerable d'aquest peix es consumeix fresc. El verat (*Scomber scombrus*), objecte d'aquest estudi, probablement sigui un dels peixos amb més interès nutricional de les costes del mediterrani, atesa la seva composició, especialment pel seu contingut en greix insaturat. Aquest pertany a la família dels escòmbrids (Fam. *Scombridae*). Es tracta d'una espècie pelàgica que es troba dins del grup de peixos blaus, a causa del seu alt contingut de greix al múscul.

L'alta demanda de peix fresc, ha provocat l'aparició de fraus alimentaris. Aquests estan relacionats amb allargar la vida útil del peix i endarrerir el deteriorament autolític i microbià, on s'utilitzen mètodes de conservació com la congelació, que impedeix el deteriorament del peix i, en conseqüència, permet allargar la seva vida útil i vendre'l amb una major qualitat. La base de la congelació és sotmetre l'aliment a una temperatura igual o inferior a -18°C per cristal·litzar la major part del contingut d'aigua del producte. Aquest procés de congelació permet mantenir gairebé totes les propietats nutricionals del peix, ja que pràcticament no afecta les proteïnes, vitamines o minerals, i inhibeix parcial o totalment els efectes perjudicials dels microorganismes i enzims deteriorants. El fet de congelar-lo durant un període de temps relativament curt per després poder-lo vendre com a producte fresc té les seves conseqüències. Si el procés de congelació no s'ha realitzat de forma correcta, pot causar una pèrdua del contingut d'aigua respecte el producte inicial, provocant pèrdues en les característiques sensorials i un frau envers als consumidors, si es declara la venda d'un producte fresc quan realment ha patit una congelació que ha pogut alterar la seva qualitat.

Les tecnologies no destructives de control són d'interès per les indústries alimentàries perquè permeten realitzar una anàlisi del producte d'una manera ràpida i en la mateixa línia de producció. L'espectroscòpia d'infraroig proper (NIRS) és una tecnologia utilitzada per les empreses del sector agroalimentari des de fa algunes dècades i és especialment interessant per la seva rapidesa i senzillesa en la mesura i per la capacitat d'implementar-se en línia. Recentment, han aparegut al mercat instruments miniaturitzats basats en aquesta tecnologia que, pel seu baix cost, són d'especial interès per a les indústries agroalimentàries. Aquests instruments obren un ampli ventall de possibilitats pel control de qualitat i de procés en productes alimentaris, tot i que és necessari desenvolupar calibratges específics per a cada cas.

Aquest treball ha estat desenvolupat en el marc d'un projecte de recerca del Programa de Tecnologia Alimentària de l'Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), centre de Monells (Girona). L'objectiu principal d'aquest treball ha estat analitzar la capacitat d'un espectròmetre de baix cost i d'un espectrofotòmetre d'alta resolució, basats en la tecnologia d'espectroscòpia d'infraroig proper (NIR), per a la discriminació entre mostres de verat (*Scomber scombrus*) fresc i descongelat (sotmeses a un o dos cicles de congelació-descongelació) i diferents mètodes de congelació. Per tal d'assolir aquest objectiu, el treball es va desenvolupar en diferents etapes. Inicialment, es varen adquirir els espectres en les mostres de peix fresc i, tot seguit, es varen congelar les mostres en diferents temperatures; arribant a temperatures a l'interior de -20°C i -80°C en cambra de congelació (lenta) i -20°C mitjançant un abatedor (congelació ràpida), i es va realitzar una adquisició dels espectres en verat congelat i descongelat. Finalment, les mostres es van congelar una altra vegada per realitzar una segona

tanda d'adquisició d'espectres en els dos estats. Paral·lelament, es va determinar el contingut d'humitat de les mostres de peix fresques i descongelades dels dos cicles de congelació.

Tot seguit, a partir dels espectres adquirits, es varen desenvolupar models de classificació del producte segons els mètodes de congelació utilitzats per a la conservació del producte; l'estat del peix en el moment de l'adquisició d'espectres; i les vegades que havia patit una congelació i, posteriorment, una descongelació.

Els resultats obtinguts han mostrat que durant els diferents cicles de congelació i descongelació hi ha una pèrdua d'humitat respecte a les mostres fresques. Aquesta pèrdua d'humitat està estretament relacionada amb la velocitat de congelació i el tipus de tractament que han patit les mostres, considerant que aquestes han tingut una congelació ràpida perden menor contingut d'aigua respecte a les que han sigut congelades en una cambra a una velocitat menor. Tanmateix, també s'ha observat que el moment de captura i els cicles de congelació i descongelació que s'hagin fet té influència en el contingut d'humitat, essent major la pèrdua d'aigua quan més cicles s'hagin realitzat.

Els sensors NIR utilitzats han permès classificar les mostres segons els cicles de congelació i descongelació, el mètode de congelació aplicat, i si el peix ha patit o no un tractament previ a la adquisició d'espectres. Amb les dues tecnologies NIR (SCiO i Bruker) es pot observar un pic a 970 nm, relacionat amb la vibració d'enllaços O-H de les molècules d'aigua. S'han observat diferències significatives entre els múltiples mètodes de congelació utilitzats, a partir dels diferents continguts d'aigua de les mostres. Tanmateix, els models de classificació després d'aplicar el pre-processat espectral, han permès detectar més fàcilment i, en conseqüència, classificar, les mostres que han estat sotmeses a dos cicles de congelació i descongelació, amb una precisió mitjana del model amb l'equip de Bruker en t=1 en congelades envers les descongelades de 84.3% i 66%. Seguit per un t=2 de 76% i 74.5%, unes dades molt similar a les del SCiO; en t=1 congelat 94.1% i 60.8%, i per a les mostres en t=2 de 98.0% i 72.5% respectivament. On t=1 correspon a les mostres que han estat congelades i descongelades una vegada, mentre que les t=2 han patit dos cicles de congelació i descongelació amb un tractament de congelació determinat. Quan es mesuren les mostres congelades la dispersió de la llum es veu afectada per l'estructura cristal·lina del gel. Aquest fet, associat al contingut d'aigua que contenen les mostres de peix, serà la que permetrà una classificació més encertada.

Seguidament, es va desenvolupar un model de classificació segons l'estat de la mostra, descongelada (amb prèvia congelació indiferent del mètode) o fresca, on la precisió mitjana del SCiO era del 97,5% mentre que la del Bruker era de 93,2%. Les mostres amb pitjor classificació corresponen a mostres fresques que han estat identificades com a descongelades, atribuït al diferent contingut d'aigua present en el teixit del peix després de les diferents congelacions, que produeixen canvis d'absorció al voltant de 980 nm, associats al contingut d'aigua. Finalment, també es va elaborar un model de classificació segons els cicles de congelació-descongelació. En aquest cas, destaca la diferència de precisió mitjana obtinguda amb els dos equips. La validació del model de classificació realitzat amb Bruker és del 62.7%, mentre que amb el SCiO és considerablement millor (95.0%). Aquesta diferència ve donada per la resolució de l'equip, però en ambdós casos permet una classificació vàlida.

A partir dels resultats d'aquest treball, es pot concloure que el contingut d'humitat de les mostres és un factor important a l'hora d'estudiar la capacitat dels sensors NIR per classificar les mostres. Cal tenir en compte que tant el moment de captura, com el tractament de congelació aplicat, com els cicles de congelació i descongelació i l'estat de la mostra influiran en el contingut

d'humitat de les mostres. Els models predictius desenvolupats per diferenciar les mostres de verat fresc del congelat i els múltiples mètodes de congelació aplicats, han sigut satisfactoris. Es pot diferenciar amb elevada precisió el peix en un estat fresc del que ha estat sotmès a tractaments de congelació, així com les vegades que s'ha descongelat i tornat a congelar el producte. Els models desenvolupats tenen capacitat per classificar el producte segons els cicles de congelació i descongelació en ambdós casos, però es destaquen els resultats obtinguts amb l'equip SCiO. Considerant aquest equip una eina útil i amb una aplicabilitat potencial pels organismes de control i pels consumidors, ja que permet el control del frau, en relació al contingut d'humitat del peix.

Aquest projecte té una vessant d'aplicabilitat important, ja que els instruments miniaturitzats basats en l'espectroscòpia NIR són d'especial interès per a els organismes de control i consumidors gràcies al seu baix cost. En aquest projecte, s'han desenvolupat models predictius específics pel verat (*Scomber scombrus*), però aquest sensor NIR de baix cost es pot utilitzar en altres productes alimentaris. Caldrà realitzar un procés de calibratge específic per a la matèria primera que es vulgui analitzar.

ÍNDEX

AGRAÏMENTS.....	1
PARAULES CLAU	3
RESUM.....	5
ÍNDEX.....	9
1. INTRODUCCIÓ.....	11
1.1. Productes de la pesca.....	11
1.2. El peix congelat	12
1.3. Espectroscòpia NIR-Visible	13
1.3.1. Teoria bàsica de l'espectroscòpia d'infraroig proper (NIR).....	13
1.3.2. Instrumentació	15
1.3.3. Mètode d'anàlisi amb NIR.....	15
1.3.4. Avantatges i inconvenients de l'espectroscòpia NIR	18
1.4. Aplicació de tecnologies d'espectroscòpia a la indústria alimentària	18
2. OBJECTIUS	21
3. MATERIAL I MÈTODES	23
3.1. Mostres i disseny experimental	23
3.2. Equips utilitzats i adquisició d'espectres amb espectròmetres visible-NIR	26
3.2.1. Espectròmetre NIR miniaturitzat de baix cost	26
3.2.2. Espectròmetre NIR d'alta resolució	28
3.3. Determinació de la humitat pel mètode gravimètric.....	28
3.4. Anàlisi estadística dels resultats.....	29
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ	31
4.1. Caracterització del contingut en humitat.....	31
4.2. Anàlisi qualitativa dels espectres	32
4.3. Models de classificació de les mostres de verat en funció del mètode de congelació utilitzat	36
4.4. Model classificació per producte fresc i descongelat de la mostra	41
4.5. Models de classificació de les mostres de verat en funció dels cicles de congelació- descongelació.....	43
5. APLICABILITAT	45
6. CONCLUSIONS	47
BIBLIOGRAFIA.....	49

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Productes de la pesca

El peix i els productes de la pesca representen una font de nutrients essencials per a una dieta saludable i equilibrada, ja que contenen un alt contingut en proteïnes, minerals i vitamines, així com un baix contingut en greixos (Zhou et al., 2019). També contenen àcids grassos poliinsaturats que gairebé no es troben en altres fonts d'aliments (Moriarty et al., 2020). Aquests nutrients tenen efectes positius sobre la salut humana, com ara ajudar a prevenir el desenvolupament de malalties del cor i reduir la mortalitat per malalties coronàries (Wang et al., 2020).

Tanmateix, un cop el peix ha sigut pescat i tret de l'aigua, es poden desenvolupar olors desagradables a causa de la degradació enzimàtica de determinats nutrients (especialment proteïnes, lípids i nucleòtids) i la degradació microbiana per part dels bacteris de la superfície. Així doncs, la qualitat del peix està directament relacionada amb l'oxidació dels lípids, la descomposició de proteïnes i el trifosfat d'adenosina (ATP), la reducció del pH i la producció d'olors característiques (Agyekum et al., 2020).

En l'actualitat, a causa del creixement continu de la demanda de peix pel consum individual i per a la recerca de la qualitat de vida, els requisits de qualitat del peix també són cada cop més alts. Indicadors com la frescor, el contingut de proteïnes, el color de la carn i la textura són importants per avaluar la qualitat del peix. Per tant, garantir la seguretat d'aquests recursos pesquers durant el transport, l'emmagatzematge i el processament s'ha convertit en un tema d'investigació cada cop més rellevant. Molts d'aquests problemes de deteriorament de la qualitat del peix es poden controlar mitjançant la conservació per congelació, que impedeix el deteriorament microbiològic i alenteix els processos bioquímics de degradació del peix i, en conseqüència, permet allargar la seva vida útil i vendre'l amb una major qualitat.

A la indústria alimentària existeixen diferents tecnologies per reduir la pèrdua de qualitat i allargar la vida útil dels aliments. Dins dels productes de la pesca, destaquen la congelació i l'elaboració de conserves. El fonament de la congelació és sotmetre els aliments a temperatures iguals o inferiors a -18°C per tal d'aconseguir congelar la major part de l'aigua que conté el producte, formant així cristalls de gel. Aquesta tecnologia permet mantenir pràcticament totes les propietats nutricionals, ja que no afecta ni a les proteïnes, ni a les vitamines, ni als minerals, però en contraposició inhibeix parcialment o totalment l'acció perjudicial dels microorganismes i enzims deteriorants (Ezquerria et al., 1986).

Per posar en context de la importància del peix congelat en el territori espanyol, a la Figura 1.1. es pot veure el consum dels diferents tipus de productes de la pesca en els darrers anys pels consumidors espanyols. El consum de peix congelat l'any 2020 va patir un gran increment respecte del 2019 a causa dels efectes de la SARS-CoV2 (Mercasa et al., 2021). Malgrat això, el consum per càpita, tant de peix fresc com de peix congelat, és inferior respecte del 2016. En contraposició, les conserves de peix han augmentat considerablement des de llavors. Tot i que el peix fresc o congelat no és el més comprat pels espanyols, sí que ho és pels catalans; consumint un total de 36.804 kg de peix i marisc processat i altres preparats de peix i marisc (on

s'inclourien les conserves), 22.371kg de peix i marisc congelat, i 73.559 kg de peix i marisc fresc o refrigerat, segons les dades publicades per l'Idescat (2020).

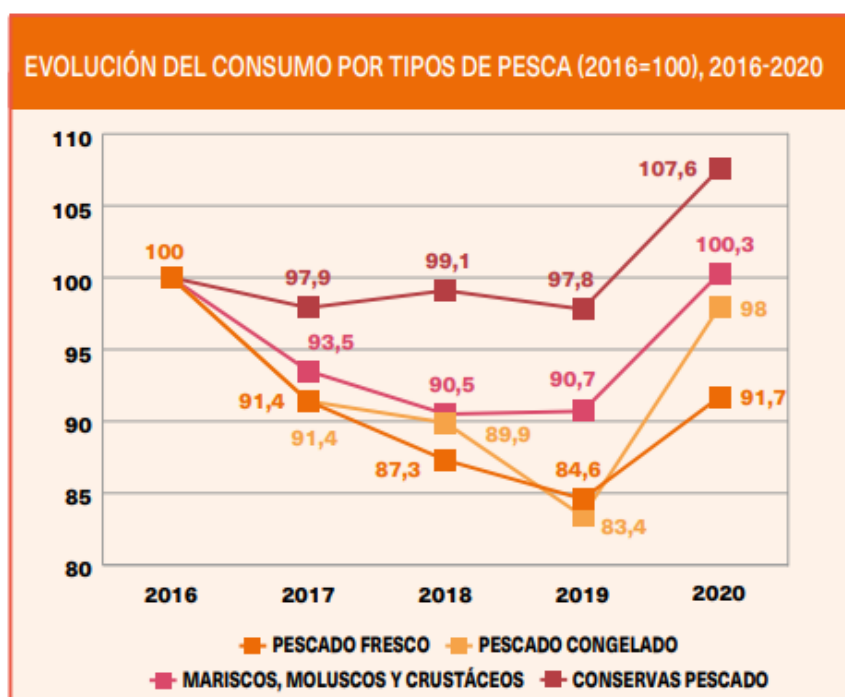


Figura 1.1. Evolució del consum per tipus de producte de la pesca a Espanya durant el període 2016-2020. Font: Mercasa et al., 2021.

1.2. El peix congelat

En la indústria pesquera, el terme "fresc" indica que el peix mai s'ha congelat, començant des de la seva captura fins a la seva comercialització. El peix fresc és un aliment extremadament perible, molt susceptible al deteriorament durant la manipulació en la pesca, el processament, el transport, l'envasament i l'emmagatzematge. La qualitat disminueix ràpidament després de la captura/pesca, requerint un tractament adequat instantani per tal de preservar les propietats nutricionals i organolèptiques, i evitar riscos de seguretat alimentària. La congelació és un mètode eficient per conservar les propietats i la qualitat del peix recent pescat.

La congelació és un mètode eficaç de conservar el peix durant llargs períodes d'emmagatzematge. Els peixos congelats i emmagatzemats fins a tres mesos en condicions ideals (baixa temperatura, igual o inferior als -18°C , no variable) no es poden distingir dels peixos frescos pel que fa al color, el gust i la textura (Cappeln et al., 1999; Nielsen i Jessen, 2007). Encara que és possible obtenir peixos congelats amb una alta qualitat nutricional, la qualitat del peix fresc es considera superior. Les preferències dels consumidors per al peix fresc es basen bàsicament en la caracterització sensorial, ja que durant la congelació, l'emmagatzematge del producte congelat i el procés de descongelació, es poden produir alteracions aparents en el sabor, l'olor, la consistència i el color de la carn (Jacumar et al., 2012).

No obstant això, alguns productors o distribuïdors d'aliments poden intentar vendre peixos congelats i posteriorment descongelats, declarant que són frescos, per augmentar els seus beneficis. Aquesta pràctica fraudulenta és bastant comuna en la comercialització de peixos. En els darrers anys, el sector de l'aqüicultura ha patit un augment dels controls en matèria de seguretat alimentària i, en conseqüència, les gestions de les empreses han hagut de ser més ràpides i eficients. Aquesta activitat fraudulenta representa una amenaça primària per a la producció i la comercialització d'aquests productes, així com pel consumidor final.

D'aquesta manera, és de gran interès per la indústria dels productes de la pesca i derivats que es desenvolupin metodologies de control de qualitat que permetin monitoritzar i avaluar els efectes de la congelació i descongelació en mostres de peix.

1.3. Espectroscòpia NIR-Visible

1.3.1. Teoria bàsica de l'espectroscòpia d'infraroig proper (NIR)

L'espectroscòpia és una tècnica analítica basada en l'estudi de la interacció entre la radiació electromagnètica i els àtoms i molècules de la matèria. Es defineix com l'estudi dels fenòmens d'absorció, emissió i dispersió de la radiació electromagnètica produïts per la interacció d'aquesta radiació amb la matèria.

NIRS és l'acrònim en anglès d'Espectroscòpia d'Infraroig Proper (*Near InfraRed Spectroscopy*). Fa referència a una tècnica analítica basada en l'absorció de radiació en la regió de l'infraroig proper, que forma part de l'espectre electromagnètic, en el rang de 700 nm a 2500 nm. La radiació electromagnètica és una forma d'energia associada al moviment de partícules carregades, que consisteix en la propagació de camps elèctrics i magnètics que oscil·len a velocitat constant en direccions mútuament perpendiculars. Com es mostra a la Figura 1.2, es classifica segons la seva longitud d'ona al llarg de l'espectre electromagnètic. L'espectre electromagnètic és el rang de freqüències de la radiació electromagnètica i les respectives longituds d'ona i energies fotòniques.

Previ al rang de l'infraroig, trobem el rang visible, entre 380 nm i 760 nm, on els valors extrems corresponen al violeta i vermell, el primer és més pròxim a la llum ultraviolada i, per tant, té una longitud d'ona més curta; en canvi, el segon, el vermell, és més pròxim al rang de NIR i, per tant, té una longitud d'ona més llarga i una freqüència energètica menor. Per l'altre banda dels infrarojos, trobem les microones, molt utilitzades en l'àmbit tecnològic.

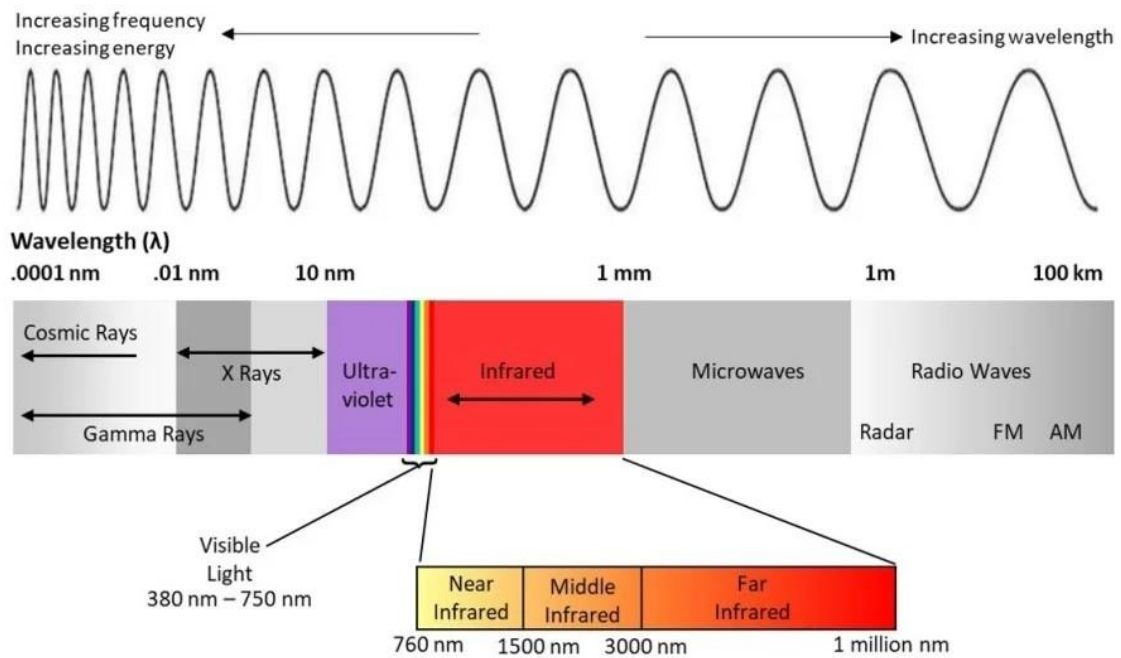


Figura 1.2. Espectre electromagnètic. Font: AZO optics.

Quan un feix de radiació òptica travessa una mostra, les molècules de la mostra absorbeixen selectivament la llum en bandes de freqüència específiques, de manera que els enllaços químics de les molècules vibren, donant lloc a l'espectroscòpia d'infraroig proper (NIRS). Aquesta radiació electromagnètica mostra informació fonamental de la banda vibratòria per als enllaços químics en molècules que contenen majoritàriament àtoms d'hidrogen, com ara grups N-H, O-H i C-H.

L'espectroscòpia NIR és un mètode de control econòmic i respectuós amb el medi ambient que no requereix la manipulació de les mostres (Nordey et al., 2017). S'ha utilitzat àmpliament en molts camps, com ara la medicina (Kim et al., 2020), la ciència forense (Coppey et al., 2020) i la bioquímica. L'anàlisi NIR inclou els passos següents: 1) Recollir els espectres NIR de mostres conegudes i caracteritzar les propietats de la mostra; 2) Establiment i validació del model; 3) Predicció de paràmetres objectiu per a mostres desconegudes. Cal tenir en compte que aquests models es construeixen mitjançant quimiometria. La quimiometria és l'aplicació dels principis de l'estadística, les matemàtiques i la informàtica en el processament de la informació química per obtenir l'estructura i la composició de la substància que es mesura.

Tot i això, avui dia encara hi ha algunes limitacions en l'anàlisi espectral del NIR. En primer lloc, hi ha algunes interferències de fons mentre es recullen els espectres, incloent-hi el soroll i les bandes superposades. A més, a causa de les bandes d'absorció febles, és difícil d'analitzar i pot portar a una mala lectura de les dades (Guo et al., 2016). Per aquestes raons, és necessari pre-processar l'espectre original.

1.3.2. Instrumentació

Pel que fa a la instrumentació, un espectròmetre consisteix en una font de radiació, un dispositiu de selecció de longitud d'ona, un detector fotoelèctric per a la mesura de la intensitat de la llum detectada i conversió en senyals elèctriques, i un sistema computacional per a l'adquisició i processament de les dades espectrals. També són molt comuns els instruments NIRS de transformada de Fourier que utilitzen un interferòmetre, especialment per a longituds d'ona per sobre de 1000 nm. Depenent de la mostra, l'espectre es pot mesurar en reflexió o transmissió.

La font de radiació ens permet generar el feix de llum necessari per irradiar la mostra objectiu, i el mètode més utilitzat avui dia són les bombetes de quars halogen o les bombetes incandescents comuns. Aquestes s'utilitzen més sovint com a fonts de banda ampla (320 nm-2500 nm) de radiació infraroja propera per a aplicacions analítiques. Altres fonts que també es poden utilitzar serien els díodes d'emissió de llum (LED).

Actualment al mercat hi ha diferents equips de NIR amb diferents característiques. Recentment, han aparegut instruments miniaturitzats NIR que pel seu baix cost obren un ampli ventall de possibilitats pel control de qualitat i del procés, entre d'altres. Alguns d'aquests seran els que s'utilitzaran en aquest treball i es descriuran posteriorment.

1.3.3. Mètode d'anàlisi amb NIR

Les bandes de NIR normalment se superposen i condueixen a un espectre amb pics amples, cosa que fa que l'espectre NIR d'una mostra sigui més difícil d'interpretar en comparació amb el seu espectre infraroig mitjà. No obstant això, dins d'aquests espectres NIR que són comparables en les característiques, hi ha una considerable informació sobre l'estructura molecular i física de la mostra, i aquesta informació es pot obtenir mitjançant mètodes de processament i avaluació de dades multivariades per analitzar la composició de la mostra.

Com s'ha explicat amb anterioritat, els grups N-H, O-H i C-H de les molècules del producte, així com d'altres més específics, son els responsables de generar una vibració i aportar informació fonamental. A la Figura 1.3 es pot apreciar com els diferents enllaços esmentats anteriorment interaccionen en diferents espectres NIR donant com a resultat una absorbància o una altra.

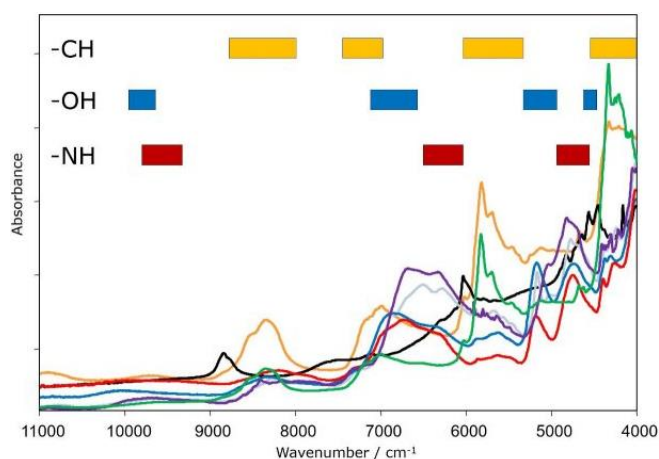


Figura 1.3. Diversos espectres NIR i regions de longitud d'ona de les principals absorcions moleculars Font: Bruker (2022).

L'objectiu dels espectròmetres NIR no és només mesurar el perfil espectral d'una mostra, sinó també determinar els seus components principals. Els espectres contenen informació rellevant sobre les propietats físiques i bioquímiques de la mostra. Tanmateix, a causa de la complexitat dels espectres, aquesta informació és difícil d'interpretar i requereix temps i dedicació per extreure correctament els resultats. S'estan desenvolupant eines estadístiques per l'anàlisi multivariant o quantitativa per avançar en el desenvolupament de l'espectroscòpia NIR (Genot et al., 2014). La quimiometria es defineix com un conjunt de mètodes gràfics, estadístics o simbòlics que permeten la comprensió i extracció d'informació química analítica per determinar la composició d'una mostra.

Es basa principalment en l'anàlisi de dades multivariants (multidimensionals o multicanal), que és fonamental per desenvolupar aplicacions quantitatives o qualitatives en espectroscòpia, ja que pot utilitzar matrius de dades de fins a 1000 variables (valors d'absorbància) per mostra. En un espectre NIR, sovint hi ha diferents regions associades amb el mateix enllaç o compost (Figura 1.3). Aquesta redundància d'informació pot ser un avantatge ja que permet treballar en diferents rangs espectrals, però alhora dificulta determinar quines longituds d'ona contenen la informació d'interès sense utilitzar eines quimiomètriques (Collell et al., 2012).

a. Pretractaments

Previ a l'obtenció dels models, els espectres acostumen a ser processats amb pretractaments matemàtics per eliminar o minimitzar el soroll de fons i augmentar el senyal relacionat amb la informació química d'interès. S'ha de buscar un equilibri, ja que a l'aplicar un pretractament majoritàriament s'eliminaran sorolls i altres senyals que no aportaran informació però pot ser que algunes d'aquestes siguin d'interès. Per això, s'ha de buscar l'equilibri entre perdre informació i eliminar les interferències. No hi ha un únic mètode, cal fer comprovacions i variacions dels pretractaments aplicats en les dades per veure quin s'adequa millor i quin donarà uns resultats més precisos. Sovint, s'usen mètodes que redueixin els efectes de dispersió de llum (Li et al., 2020). Els mètodes de pre-processat espectrals més utilitzats són:

- **Derivades:** De fet, són diferències finites, ja que no és possible aplicar derivades veritables perquè els espectres s'emmagatzemen numèricament com a seqüències de punts de dades en lloc de funcions contínues (condicions derivables). En la tècnica NIR habitualment s'utilitza la segona derivada, que permet distingir pics superposats i redueix les diferències en els tipus de linealitat. La primera derivada també té aquests efectes, però en menor mesura.
- **Mean Center:** Calcula la mitjana de cada columna i la resta amb l'objectiu de disminuir el soroll i millorar la relació senyal/soroll.
- **Multiplicative Scatter Correction (MSC):** Corregeix tant l'efecte additiu com el multiplicador. La base d'aquest enfocament és que la llum de la radiació dispersa depèn de la longitud d'ona, enlloc de la llum que és absorbida pel compost. D'aquesta manera, les dades de longitud d'ona es poden utilitzar per diferenciar entre l'absorció de llum i la radiació dispersa. Es calcula utilitzant tot el grup experimental.

- **Standard Normal Variate (SNV):** Es calcula per separat per a cada espectre, de manera que no depèn del grup inicial utilitzat en el càlcul. El resultat obtingut és un espectre transformat amb una mitjana zero i una desviació estàndard, corregit pel desplaçament espectral al llarg de l'eix vertical.
- **Detrending (DT):** S'utilitza com a complement del processament SNV, ja que no pot corregir la curvatura a la línia de base. Igual que la correcció SNV, es calcula individualment per a cada espectre. Elimina la curvatura inicial causada per les interaccions variables entre la humitat i els efectes de les partícules.

b. Calibratge

Un bon calibratge és l'èxit de la tecnologia NIR (Groenewald et al., 2017). Els softwares quimiomètrics han desenvolupat diferents mètodes de calibratge, els més utilitzats són la Regressió de components principals (PCR) i la Regressió per mínims quadrats parcials (PLS). La PLS es una de les tècniques més utilitzades per desenvolupar els models de calibratge. Aquest és un mètode de calibratge multivariant, utilitzat per correlacionar l'espectre NIR i el component d'interès (Collell et al., 2010).

En aquest treball, l'anàlisi estadística dels resultats es tracta a partir d'un mètode estàndard d'anàlisi discriminant de mínims quadrats parcials o PLS-DA (*Partial Least Squares Discriminant Analysis*), és a dir, un mètode per a la discriminació de dades multivariants, molt utilitzat en quimiometria. Aquest mètode permet una classificació directa multiclasse, on els resultats es presenten d'una manera senzilla projectant la matriu de respostes. El PLS-DA és un enfocament de regressió, on s'utilitza la matriu de característiques X com a predictor i la matriu Y, amb variables simulades, s'utilitza com a resposta. La matriu fictícia Y comprèn variables categòriques {0,1} que indiquen pertinença a classe. Ambdues matrius estan relacionades per la regressió PLS2. El model de regressió s'utilitza per al càlcul de les respostes previstes Y^{\wedge} , que després s'utilitzen per a la discriminació (Zontov et al., 2020).

c. Validació

Finalment, el darrer pas és determinar la validesa del model de calibratge. Aquest, igual que la resta, té molta importància ja que un model calibrat s'ha de validar per poder estudiar el seu poder predictiu. La validació es realitza en mostres analítiques que estan ben distribuïdes en l'interval químic i espectral i que no s'han utilitzat en el model de calibratge. Si no és possible dur a terme un calibratge independent, existeix un mètode de validació creuada que es pot utilitzar per realitzar una avaluació bàsica del model calibrat. Aquest és un mètode per excloure repetidament una o més mostres del procés de calibratge mitjançant el desenvolupament de submodels i l'avaluació del calibratge mitjançant mostres excloses. El mètode de validació creuada valida els submodels desenvolupats.

Els mètodes estadístics de validació més utilitzats en la tecnologia NIR són: (1) el coeficient de determinació (R^2), que proporciona una estimació de com de bé s'explica la variància entre els valors predits i els de referència en relació amb la variància total; (2) l'error estàndard de predicció (RMSEP o RMSECV en validació creuada), que proporciona informació sobre la precisió

del calibratge; i finalment, (3) l'estadístic RER (*Range Error Rate*), que és el quocient entre l'interval de composició de dades de referència i $RMSE_{CV}$. Segons la informació disponible (Celignis Limited et al., 2019), valors de RER > 4 indiquen que el model de calibratge es pot utilitzar per a la selecció de mostres; valors de RER > 10 indiquen que el model de calibratge es pot utilitzar de forma acceptable pel control de qualitat; i valors de RER > 15 indiquen que el calibratge és un bon mètode per a la quantificació (Giró et al., 2019).

1.3.4. Avantatges i inconvenients de l'espectroscòpia NIR

Com tota tecnologia, l'espectroscòpia NIR té avantatges i inconvenients que cal tenir en compte per a la seva utilització en la indústria alimentària.

El principal avantatge és que és una tecnologia no invasiva (en alguns casos), que permet dur a terme anàlisis sense contacte amb la mostra o bé a la superfície de la mateixa. També es considera no destructiva, ja que la regió NIR (780 – 2500 nm) treballa en nivells inferiors als necessaris per trencar els enllaços covalents de les mostres. Addicionalment, la mostra objectiu que es vol analitzar no requereix d'una preparació molt complexa o sofisticada, per tant, s'afegeix el fet de ser un mètode respectuós amb el producte i amb el medi ambient, a causa de no haver de necessitar reactius o analits per a les determinacions. Tot això fa que es pugui classificar com una tècnica analítica ràpida. Això farà que es pugui aplicar *on-line* en un entorn de producció. L'anàlisi permet que varis analits, ja siguin paràmetres fisicoquímics dels aliments i/o altres propietats, siguin determinats simultàniament, sempre que hagin estat prèviament calibrats de forma precisa.

No obstant, existeixen alguns inconvenients que poden dificultar la seva implementació. La tecnologia NIR requereix l'ús de tècniques de quimiometria per poder extreure la informació, així com el desenvolupament de models predictius robustos i precisos, que permetin analitzar de forma més senzilla els resultats. També es requereix disposar d'un nombre abundant de mostres per a poder analitzar totes les variacions del producte. Addicionalment, aquests equips requereixen un sistema de calibratge complex i llarg, així com un manteniment dels models.

1.4. Aplicació de tecnologies d'espectroscòpia a la indústria alimentària

En el context dels desenvolupaments tecnològics de la indústria agroalimentària, el desenvolupament i l'aplicació de l'espectroscòpia NIR és relativament nou. Aquesta tecnologia va ser desenvolupada amb l'objectiu de millorar i optimitzar la productivitat general de les indústries alimentàries arreu del món. Tal com exposen Mathiassen et al. (2011), l'evolució tecnològica a la indústria alimentària ha permès el desenvolupament de diverses aplicacions de l'espectroscòpia i d'anàlisi d'imatges basades en diferents zones de l'espectre electromagnètic.

Aquest tipus de tecnologies s'han utilitzat, per exemple, en la zona espectral de les microones o dels raigs-X (RX). L'espectrometria de microones (EM), basada en la determinació de les propietats dielèctriques de les mostres, s'ha utilitzat per determinar l'activitat d'aigua i el contingut de sal, aigua i greix en matrius alimentàries com ara el pernil curat (Bjarnadottir et al., 2015; Fulladosa et al., 2013; Rubio-Celorio et al., 2015; Rubio et al., 2013). En la zona dels RX

també s'han desenvolupat tecnologies que, a diferència de les altres, tenen la capacitat de penetrar totalment a l'interior del producte i, d'aquesta manera, permeten l'obtenció d'informació de les parts internes.

També s'ha demostrat el potencial de la tecnologia NIR en la indústria alimentària. Encara que s'han dut a terme molts estudis centrats en l'anàlisi de la qualitat dels aliments, també està augmentant l'ús i l'aplicació de la tecnologia NIR en l'avaluació i el control de la seguretat alimentària.

En el cas del peix i els productes de la pesca, la qualitat i seguretat alimentària són molt importants, ja que són productes molt peribles amb una vida útil curta. Després de la captura i mort del peix, es produeixen un seguit de canvis físics i químics post-mortem, incloent-hi la ruptura de les estructures cel·lulars i l'autòlisi enzimàtica endògena, a causa del creixement de microorganismes. Aquests processos endògens i microbians donen lloc al malbaratament del peix. Per tant, l'avaluació de la qualitat del peix és essencial per garantir i controlar la seguretat dels productes pesquers durant el transport, l'emmagatzematge i la transformació.

Els mètodes tradicionals per a l'avaluació de la qualitat del peix són subjectius, invasius i es realitzen en el moment de consum. Tanmateix, a partir de l'aparició de les tecnologies NIR, aquest problema ha minvat, fent que sigui una avaluació ràpida, no destructiva i que es pot utilitzar, per exemple, per a l'avaluació en temps real de la càrrega microbiològica present en peixos (Cheng et al., 2013).

La frescor del peix és una propietat a destacar que contribueix de manera important a la qualitat. La pèrdua de frescor ve donada per una combinació complexa de diversos processos microbiològics, químics i físics. Els organismes oficials de control dels aliments i els consumidors donen cada vegada més importància a la detecció de la frescor dels peixos. Diversos investigadors han explorat la viabilitat de l'ús de la tecnologia NIR per determinar la frescor dels peixos (Cozzolino et al., 2002; Cakli et al., 2006; Cakli et al., 2007; Uddin et al., 2007). Basant-se en aquests estudis, l'espectroscòpia es va aplicar per a l'avaluació de la frescor del bacallà congelat emmagatzemat en comparació amb la frescor determinada per tècniques d'anàlisi sensorial (Heia et al., 2003; Nilsen i Esaiassen, 2005). Posteriorment, Sivertsen et al. (2011) van utilitzar un sistema VIS/NIR, equipat amb una sonda d'interacció portàtil i un espectròmetre d'imatges, i van trobar que permetia discriminar entre el bacallà fresc i congelat i avaluar-ne la frescor d'aquest.

La congelació i l'emmagatzematge congelat han estat àmpliament utilitzats per la indústria pesquera per allargar la vida útil d'aquests aliments peribles. A causa del seu alt preu i perquè en la majoria dels casos és poc probable que els consumidors percebin visualment les diferències després de la descongelació, s'ha demostrat que el peix descongelat és vulnerable al frau i l'etiquetatge fraudulent que implica la substitució per productes congelats-descongelats. Per a una detecció del frau calen determinacions precises que són molt difícils degut a que les característiques físiques i químiques entre el peix fresc i un peix que ha patit una congelació prèvia, són molt semblants. Actualment, els informes oficials de control de frau es basen en avaluacions qualitatives subjectives (per exemple, consistència muscular, opacitat ocular, etc.) o bé necessiten equips de laboratori sofisticats, per exemple: anàlisis d'enzims, anàlisi de glòbuls vermells, etc. (Nilsen i Esaiassen et al., 2005, Nieto et al., 2022). Els mètodes físics per discriminar

entre peix descongelat i congelat-descongelat estan rebent una gran atenció pels seus avantatges (rapidesa, detecció in situ, portabilitat i alta precisió) i han estat els mètodes preferits per al desenvolupament d'anàlisis no destructives. Els equips NIR han mostrat eficàcia pel que fa a la diferenciació entre peix descongelat i congelat-descongelat. La radiació incident interacciona amb els teixits i retorna informació fisicoquímica de les mostres, en forma d'espectre, que permet classificar les mostres en funció de si han estat sotmeses a un tractament previ de congelació o no. Aquesta determinació també s'ha pogut realitzar amb altres tecnologies com l'anàlisi d'impedància bioelèctrica (BIA) i l'espectroscòpia de masses (MW) (Nieto et al., 2022).

Adicionalment, les tecnologies NIR també s'ha utilitzat per a altres usos com: mesurar l'aparició del *rigor mortis* de manera automatitzada en esturions sencers i en filets de truita (Oliveira et al., 2004; Stien et al., 2006), i per a l'estudi i optimització de processos, avaluant paràmetres com el color i la morfologia de teixits (Balaban et al., 2005; Marty-Mahé et al., 2004). També s'ha estudiat la seva aplicació en la classificació automàtica de filets de salmó en funció del color (Misimi et al., 2007; Quevedo et al., 2010) o el pes (Balaban et al., 2010).

L'objectiu principal del projecte RETOS CCLabel (*Systems of Characterization and Communication of the quality and nutritional composition of food for consumers and the food industry*) de l'Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA) de Monells, en el qual s'emmarca aquest treball, és desenvolupar i avaluar sistemes capaços de caracteritzar els aliments, a nivell de la composició nutricional i la qualitat per a la indústria i els consumidors, així com sistemes per comunicar eficaçment aquesta informació al consumidor final, a través de l'etiquetatge i els sistemes digitals, per estimular una nutrició personalitzada i una elecció alimentària més racional. En aquest projecte, per tal de poder desenvolupar sistemes de caracterització dels aliments, s'ha proposat avaluar els canvis que pateix el verat (*Scomber scombrus*), abans i després de la seva congelació, així com amb diferents sistemes de congelació. Aquests estudis es duen a terme amb diferents equips d'espectroscòpia d'infraroig proper, disponibles a l'IRTA de Monells.

2. OBJECTIUS

L'objectiu general d'aquest treball va ser avaluar la capacitat de diferents tecnologies no destructives, basades en l'espectroscòpia d'infraroig proper (NIRS), per a discriminar entre mostres de verat (*Scomber scombrus*) fresc i descongelat (sotmès a un o dos cicles de congelació-descongelació) i diferents mètodes de congelació.

Per tal d'assolir l'objectiu general d'aquest treball, s'han definit diversos objectius concrets:

- a) Utilitzar la tecnologia NIR per avaluar l'efecte de diferents mètodes de congelació (congelació lenta a -20°C / congelació a -80°C / congelació ràpida a $-20^{\circ}\text{C} < 45$ minuts) i de l'estacionalitat (període de captura) en el contingut d'humitat de mostres de verat congelat i descongelat.
- b) Avaluació de la capacitat d'un equip NIR d'alta resolució i un equip NIR *low cost* per determinar si el producte de la pesca és fresc o ha estat sotmès a un tractament de congelació.
- c) Avaluació de la capacitat de la tecnologia NIR per determinar si el peix ha estat sotmès a un o més cicles de congelació-descongelació, mesurant en producte congelat i descongelat.

3. MATERIAL I MÈTODES

3.1. Mostres i disseny experimental

Les mostres de verat (*Scomber scombrus*) es varen comprar en una peixateria de la zona de La Bisbal d'Empordà (Baix Empordà), procedents de la llotja de Palamós el mateix dia. Les mostres van ser recollides el mateix dia de captura i van ser transportades en condicions de refrigeració fins a les instal·lacions de l'IRTA-Monells.

Per tal d'obtenir models robustos, es varen realitzar dos lots experimentals d'adquisició d'espectres. Pel primer lot es varen utilitzar un total de 25 peixos capturats al mes d'octubre de 2021. Pel que fa al segon lot, es varen utilitzar un total de 25 peixos capturats al mes de febrer de 2022. A la Figura 3.1 es mostra un esquema del disseny experimental dut a terme en aquest treball, que es descriurà a continuació.

Les mostres van ser obertes i preparades; se'ls hi van extreure el cap, aleta caudal, escames, l'espina central i tota la part ventral, deixant-les netes, tal i com es mostra a la Figura 3.1 (A).

Seguidament, just abans de començar la primera adquisició d'espectres en el peix fresc, aquest es va tallar en quadrants com es mostra a la Figura 3.1 (B), i es va retallar la part ventral. Obtenint un total de 200 mostres corresponents a 50 peixos diferents. Cada tall es va destinar a una mesura. Els quatre talls de cada verat es van considerar iguals en composició i característiques del teixit muscular del peix.

Tal i com es pot veure a la figura 3.1.B, els 4 quadrants que corresponien al lot 1, van ser classificats i distribuïts per a diferents tractaments, tal com s'especifica a continuació:

- 1) Part final més pròxima a la cua de la part esquerra del peix, destinada a la presa de mostres NIR en producte fresc (mostra control).
- 2) Part central del llom de la part esquerra del peix, destinada a la congelació lenta a -20°C (congelador convencional d'emmagatzematge).
- 3) Part final més pròxima a la cua de la part dreta del peix, destinada a la presa de mostres congelades a -80°C (congelador industrial).
- 4) Part central del llom de la part dreta del peix, portat a congelació ràpida a -20°C en un abatedor de temperatura (SAGI, Campolungo, Itàlia).

En el cas del lot 2 es va utilitzar el mateix sistema de preparació dels quadrants, però les peces 2 i 4 dels filets eren les parts pròximes a la cua mentre que les número 1 i la 3 formaven part del llom central, considerant que totes les parts eren iguals.

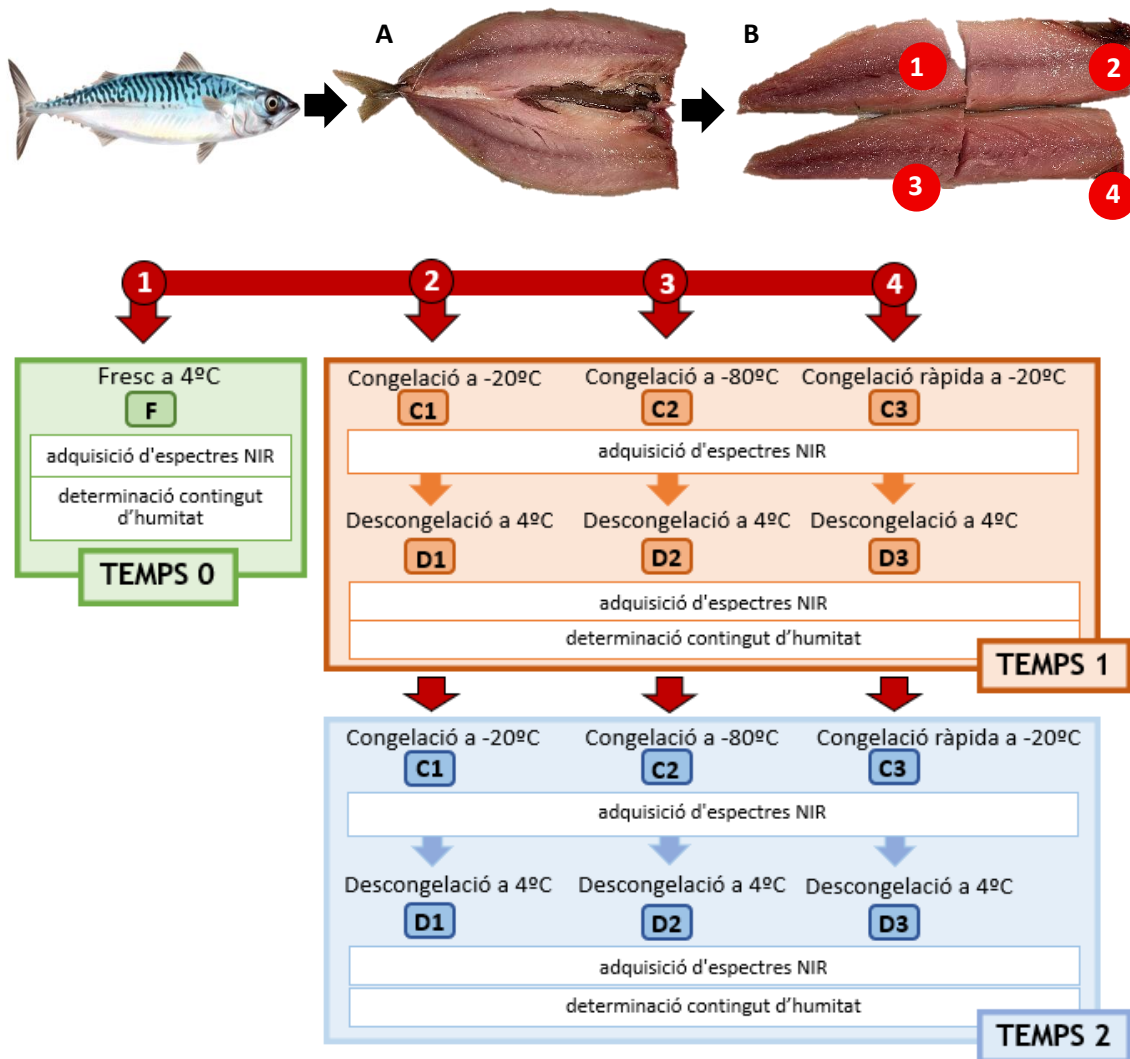


Figura 3.1. Esquema del disseny experimental utilitzat per l'adquisició d'espectres NIR pel desenvolupament de models predictius. Producte obtingut per a la realització del projecte, corresponents al lot 1. A. Mostres de verat obertes i netes. B: Mostres preparades i tallades en quadrants. Font: pròpia.

Per tal d'assolir els objectius plantejats es va fer una temporalització de l'estudi. Aquest havia de complir de forma metòdica els temps de mostreig, essent un total de cinc setmanes. A la primera setmana (t=0) es va fer l'anàlisi dels peixos frescos, acabats de recollits de la llotja i, posteriorment, es van congelar durant tres setmanes (t=1) en què es realitzà el segon mostreig; finalment, al cap de dos setmanes (t=2) es va tornar a realitzar el darrer mostreig. L'adquisició d'espectres es realitzava primerament en congelat, aquestes mostres es deixaven descongelar en una cambra de refrigeració durant 24 hores i, després, es feia una segona adquisició d'espectres en estat de descongelació. Un cop realitzades les dos adquisicions d'espectres, es tornava a congelar amb el tractament corresponent per a cada mostra.

Com que el procés era complex, calia establir una bona codificació de les mostres de verat durant tot l'estudi per tal de poder ser precisos, evitar errors i tenir uns resultats adequats. El total de mostres de peix analitzades (quadrants) varen ser 200, corresponents a dos lots diferents. Els diferents codis utilitzats pels diferents paràmetres dels experiments són els següents:

- Lots:
 - L1: Lot d'espectres agafats a l'estiu 2021
 - L2: Lot d'espectres agafats el febrer-març 2022
- Codi animal: P1, P2, P3, ..., P25.
- Codi de tractament de congelació:
 - C0: mostra control, mesures en fresc. Corresponent al filet 1.
 - C1: congelació a -20°C en una cambra de congelació. Corresponent al filet 2.
 - C2: congelació a -80°C en una cambra de congelació. Corresponent al filet 3.
 - C3: congelació ràpida a -20°C en un abatedor. Corresponent al filet 4.
- Temps de la mostra: tal i com ja s'ha explicat amb anterioritat, la adquisició d'espectres NIR es va dur a terme en tres intervals diferents per tal de que les mostres haguessin estat sotmeses a diferents cicles de congelació/descongelació.
 - t=0: preparació de les mostres, adquisició d'espectres de les mostres fresques (n=25), amb quatre rèpliques per cada mostra, processos de congelació dels filets. Anàlisi de la humitat en dos rèpliques de cada filet (n=75x2).
 - t=1: adquisició d'espectres de les mostres congelades (n=25) pels tres tractaments de congelació (n=75) en tres rèpliques per mostra, descongelació de les mostres en un cambra refrigerada a 4°C durant 24h i adquisició d'espectres en mostres descongelades (n=25), pels tres tractaments de congelació (n=75) i amb tres rèpliques per cada mostra. Anàlisi de l'humitat en dos rèpliques de cada filet (n=75x2).
 - t=2: adquisició d'espectres de les mostres congelades (n=25) pels tres tractaments de congelació (n=75) en tres rèpliques per mostra descongelació de les mostres en un cambra refrigerada a 4°C durant 24h i adquisició d'espectres en les mostres descongelades (n=25), pels tres tractaments de congelació (n=75) i amb tres rèpliques per mostra.
- Estat de la mostra en el moment de lectura:
 - F: Mostres fresques. Els verats acabats d'arribar de la llotja van ser netejats i preparats per a la primera adquisició d'espectres. Per aquesta mesura es va servir la part més pròxima al cap del llom dret per al lot 1 i la part més pròxima a la cua del llom dret en el cas del lot 2, sense haver estat sotmès a cap tractament anticipat en cap dels dos casos (mostres C0). Es va realitzar un control de temperatura per tal d'assegurar una homogeneïtat en la adquisició d'espectres, per tal d'aconseguir mantenir el peix fresc i amb les millors

condicions per a preservar la qualitat. La temperatura aproximada de les mostres era de 10°C. Tot seguit, es realitzava l'adquisició dels espectres.

- C: Mostres congelades. Les mostres en que no es van prendre mesures van ser envasades a un buit lleuger i portades a la cambra de congelació o a l'abatedor, depenent del tractament que correspongués. En aquestes s'hi van estar tres setmanes i, posteriorment, es van treure per fer les anàlisis. Abans de prendre les mesures amb els equips NIR corresponents, les mostres es van pesar i es va mesurar la temperatura. Les mostres es treien de les cambres de congelació de forma esglaonada per mantenir-les congelades a una temperatura més o menys pròxima al tractament que havien estat sotmeses; -20°C o -80°C, per no trencar la cadena de fred i així poder obtenir uns espectres més fiables i rigorosos segons el protocol establert.
- D: Mostres descongelades. Finalment, les mostres congelades que ja s'havien analitzat s'envasaven amb un buit lleuger i es guardaven a 4°C en una cambra de refrigeració durant 24 hores. Passat aquest temps, es retiraven de la cambra, es pesaven, es determinava la temperatura i s'analitzaven. La temperatura de les mostres havia d'estar compresa entre els 4 i 10°C. Per això, igual que amb les mostres congelades, les mostres es treien de la cambra de forma esglaonada per evitar fluctuacions de temperatura. Un cop analitzades les mostres, se'ls hi extreia 1-2 g per realitzar les determinacions d'humitat i, seguidament, es tornaven a envasar al buit lleuger i eren congelades amb el tractament corresponent.

Un exemple de la codificació realitzada durant l'estudi seria el següent: L2_P5_C3_t1_C. Aquest consistia en un espectre d'una mostra del lot 2 (L2), de l'animal 5 (P5), amb un tractament de congelació a -20°C amb rampa d'abatedor (C3), durant el període de setmana 3 (t=1) i l'estat del filet era congelat (C).

3.2. Equips utilitzats i adquisició d'espectres amb espectròmetres visible-NIR

Per a la determinació de la petjada espectral de les mostres analitzades, es van utilitzar dos equips d'espectroscòpia NIR diferents; un espectròmetre d'infraroig proper miniaturitzat de baix cost (SCiO 1.0) i un altre d'alta resolució (Bruker).

3.2.1. *Espectròmetre NIR miniaturitzat de baix cost*

El sensor SCiO 1.0 (Consumer Physics, Hod HaSharon, Israel) és un espectròmetre NIR de baix cost i de butxaca, és a dir miniaturitzat. Per tal d'adquirir un espectre, l'aparell irradia llum a partir del capçal òptic que conté la font d'il·luminació, i aquesta és parcialment reflectida i capturada pel sensor molecular col·locat al mateix capçal. Les condicions analítiques per al dispositiu SCiO portàtil van ser les següents: 740-1070 nm rang espectral, resolució de 10 cm^{-1} i un temps d'exploració típic de 2-5 s. L'adquisició i gestió dels espectres es va realitzar utilitzant

l'aplicació per a telèfons mòbils SCiO (The Lab: Dev Toolkit for SCiO), tal com es pot veure a la Figura 3.2.

Aquesta aplicació descarregada al dispositiu permet una gestió de dades SCiO, ja que es basa en un emmagatzematge al núvol; per tant, cada espectre recollit s'envia des del sensor al telèfon mòbil a través de Bluetooth, i després es puja i s'emmagatzema a la base de dades del núvol que posteriorment es poden editar i gestionar en línia, tal i com es mostra a la Figura 3.3. En el nostre cas es va utilitzar un telèfon Samsung Galaxy Core Prime, amb un sistema operatiu Android 5.1.1 per tal de poder controlar el sensor. El núvol emmagatzema i recopila els models i algorismes quimiomètrics que analitzen els espectres i els converteixen en dades per al desenvolupament de resultats.

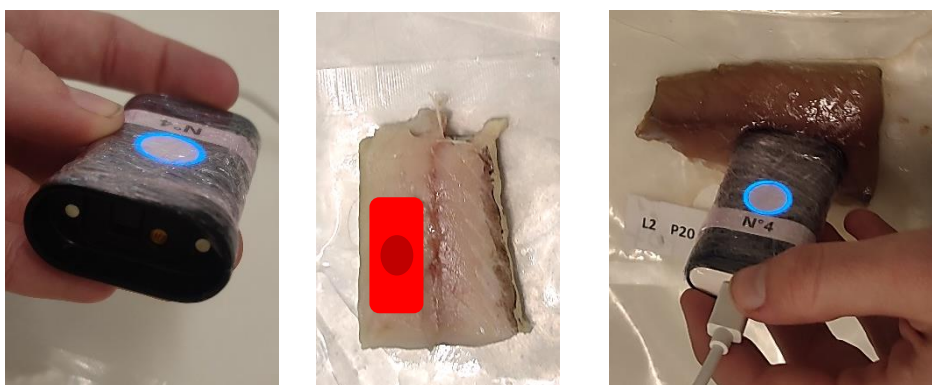
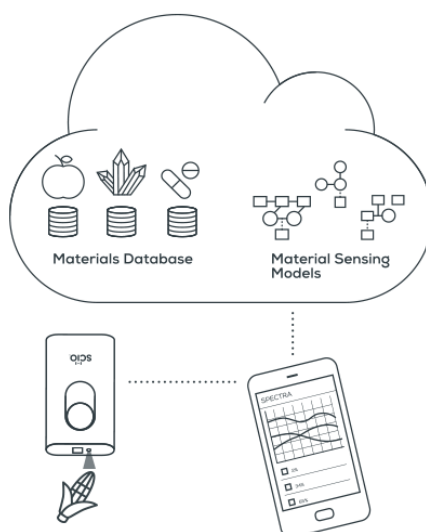


Figura 3.2. Equip NIR miniaturitzat de baix cost SCiO i àrea d'anàlisi per l'adquisició dels espectres en mostres de peix. Font: Pròpia.



*Figura 3.3. Funcionament de l'equip NIR SCiO. Font: Consumer Physics 2020
<https://www.consumerphysics.com/technology/>*

Els models quimiomètrics funcionen a partir d'un model linealment escalable, que permet proporcionar un temps de resposta ràpid a un nombre pràcticament infinit d'usuaris i dispositius. Es van realitzar tres rèpliques per cada mostra, intentant evitar les zones centrals i les de coloració més vermelloso.

3.2.2. Espectròmetre NIR d'alta resolució

L'espectròmetre Bruker Optics Matrix-F dúplex (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Alemanya) és un equip NIR d'alta resolució que treballa utilitzant la regió d'infraroig mitjà. L'equip es va utilitzar amb una sonda de contacte Q410/A Nema 4 (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Alemanya) de 10 mm de diàmetre i amb una àrea d'il·luminació de 60 mm de diàmetre (Figura 3.4). Els espectres van ser adquirits en l'interval de $12000-4000\text{ cm}^{-1}$ (833.3-2500 nm) amb el programa OPUS™ versió 6.0 (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Alemanya). Els espectres es van registrar realitzant 16 escanejats amb una resolució de longitud d'ona de 8 cm^{-1} s i cada mostra es va analitzar per triplicat. Com a resultat global, per cada mostra es van calcular els espectres mitjans.

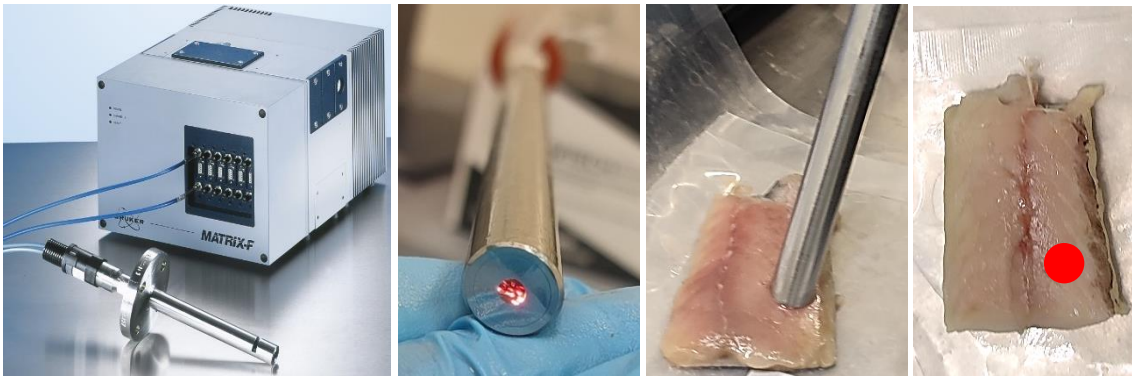


Figura 3.4. L'espectròmetre Bruker Optics Matrix-F dúplex. Sonda de l'equip NIR d'alta resolució (Bruker) i àrea d'anàlisi. Font: Bruker (<https://www.bruker.com>) i pròpia.

3.3. Determinació de la humitat pel mètode gravimètric

En les mostres de verat tant fresques com congelades que van ser utilitzades per a la creació de models predictius es va determinar el contingut en humitat, que es detalla a continuació.

El contingut d'humitat de les mostres de verat es va determinar per gravimetria, mitjançant la dessecació de la mostra en una estufa a $102 \pm 2^\circ\text{C}$ fins a pèrdua de pes constant (AOAC, 1990). La determinació de la humitat és una de les tècniques més utilitzades en la indústria alimentària. Aquesta determinació consisteix en un procés on es mesura el pes d'una quantitat de producte fresc; aquest pateix una dessecació i, posteriorment, es torna a mesurar el pes del producte, i a partir de la diferència de pes es calcula el contingut d'humitat. Per a la determinació es pesaven, amb una balança de precisió de quatre dígit (XS204 Delta Range®, Mettler Toledo S.A.E., Barcelona, Espanya), aproximadament entre 1-2 g de mostra, en gresols que s'havien assecat prèviament a l'estufa i havien estat refredats en un dessecador a temperatura ambient, d'aquest també s'anotava el pes previ (sense mostra). A continuació, es posaven a una estufa de dessecació amb circulació per aire forçat (Digitronic, J.P Selecta S.A.U, Barcelona) a $102 \pm 2^\circ\text{C}$ durant 24h per assecar la mostra fins a un pes constant. Totes les determinacions es feien per duplicat per a cada mostra.

3.4. Anàlisi estadística dels resultats

Els models predictius de classificació es varen desenvolupar mitjançant una anàlisi de classificació PLS-DA (*Partial Least Squares Discriminant Analysis*) utilitzant el software de Matlab® versió 7.7.0 (The Mathworks Inc., Natick, MA, EUA), tal i com s'ha descrit en l'apartat 1.2.3 (Mètode d'anàlisi amb NIR).

Previ a l'obtenció dels models, els espectres van ser processats amb pretractaments matemàtics per tal d'eliminar o minimitzar el soroll de fons i augmentar el senyal relacionat amb la informació química d'interès. Els pretractaments que es van utilitzar durant els assajos per el desenvolupament dels models s'han explicat anteriorment a l'apartat 1.2.4. Aquests pretractaments es van escollir perquè s'espera que les derivades eliminin l'efecte multiplicador dels espectres, mentre que SNV s'ha concebut per atenuar els artefactes donats per la dispersió.

Anteriorment, al carregar totes les dades calia separar-ne unes per a la calibració i les altres per a la validació. Això es va fer de forma automàtica amb el software de Matlab® a partir de l'algoritme *Kennard-Stone* (KS). Aquest selecciona un subconjunt de mostres del producte a analitzar que proporcionen una cobertura uniforme sobre el conjunt de dades i inclou mostres al límit del conjunt de dades. El mètode comença per trobar les dues mostres que estan més allunyades utilitzant la distància geomètrica. Per afegir una altra mostra al conjunt de selecció, de les mostres restants, l'algoritme selecciona aquella que té la distància de separació més gran de les mostres seleccionades. La distància de separació d'una mostra candidata del conjunt seleccionat és la distància del candidat a la mostra seleccionada més propera. A continuació, aquesta mostra més separada s'afegeix al conjunt de selecció i el procés es repeteix fins al nombre de mostres requerit, sent d'1/3 del total de les mostres per a calibració i 2/3 per a la validació. A la pràctica, això produeix una xarxa molt uniforme sobre el conjunt de dades. El mètode funciona de manera eficient perquè calcula la matriu de distàncies entre mostres només una vegada. Finalment, les dades seleccionades per al conjunt de calibració són pretractades i s'elabora el model, que serà validat pel 66% restant de les mostres recollides.

Per desenvolupar un model predictiu que permetés complir els objectius marcats en aquest projecte es van separar en diferents blocs d'anàlisi; segons l'estat (fresc, congelat i descongelat), segons el tractament de congelació al que s'havia sotmès la mostra, mesurant sobre peix fresc i sobre congelat (C1, C2 i C3), i segons les vegades que havia estat congelada i seguidament descongelada (t0, t1 i t2).

En els diferents models també es va calcular l'exactitud o precisió; que és una estimació de l'error del model i es calcula com la suma dels veritables positius (mostres classificades correctament) i dels veritables negatius (mostres classificades correctament) dividida pel nombre total de mostres.

També es van realitzar diverses anàlisis de la variància (ANOVA), utilitzant el programa estadístic XLSTAT (Addinosoft, Paris, France). Concretament, es va realitzar una ANOVA d'un factor, per estudiar l'efecte de l'estat, tractament i temps sobre el contingut en humitat final de les mostres de verat. El model va incloure tots els factors de tractament, estat i temps, però va excloure les mostres fresques control equivalents a C0 i t=0.

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1. Caracterització del contingut en humitat

A la Taula 4.1. es presenten el nombre de dades utilitzades (n), els valors mínims, màxims, mitjana i desviació estàndard (DE) del contingut d'humitat de les mostres de verat fresc per cada lot. Tal com es pot observar, el contingut d'humitat oscil·la entre el 68.34% i el 77.14%. S'observen diferències significatives ($p < 0.05$) entre els 2 lots (L1 i L2). Això s'atribueix a que, tot i que els dos lots corresponen a la mateixa espècie, els moments de captura són diferents, el lot 1 correspon a l'estiu 2021 mentre que les mostres del lot 2 eren de l'hivern 2022. El fet d'haver-se capturat en dos moments diferents fa que el peix no tingui les mateixes característiques composicionals, ja que majoritàriament tenen un major contingut de greix quan la temperatura de l'aigua del seu habitat és més baixa. Així doncs, és d'esperar que els peixos del lot 2 (capturats a l'hivern) tinguin major contingut de greix (Celik et al., 2008). La quantitat de greix està directament relacionada amb la humitat, fent que el rang de variació sigui, tal i com es veu reflectida a la Taula 4.1., major en les mostres del darrer lot (L2).

Taula 4.1. Percentatge d'humitat de les mostres de verat fresc en funció del lot mostrejat. Es mostren els valors de la mitjana \pm desviació estàndard.

	Lot	n	Mín-màx.	Mitjana \pm DE
Humitat (%)	L1	25	68.34 - 69.20	68.77 \pm 0.22 ^b
	L2	25	76.29 - 77.14	76.71 \pm 0.22 ^a

Les lletres diferents (^{abc}) indiquen diferències significatives ($p < 0.05$) pel lot de mostreig. Considerant L1 mostres preses del lot 1, i L2 mostres preses del lot 2.

Seguidament, a la Taula 4.2. es presenten el nombre de dades utilitzades (n), els valors mínims, màxims, mitjana i desviació estàndard (DE) del contingut d'aigua de les mostres depenent del mètode de congelació utilitzat. Tal com es pot observar, el percentatge d'humitat va del 70.22% al 75.96%. S'observen diferències significatives ($p < 0.05$) entre els diferents mètodes de congelació, destacant la diferència predominant del producte fresc (C0) amb el que ha estat emmagatzemat en una cambra de congelació a -20°C (C1), les primeres presenten un contingut d'humitat més elevat respecte les que han estat congelades a -20°C .

El fet de que les mostres hagin estat sotmeses a diferents tractaments, amb temperatures i condicions diferents, pot provocar que les mostres tinguin una humitat diferent. En aquest sentit, és possible que els tractaments amb una congelació més lenta presentin una formació de pocs cristalls de gel però més grossos, que provoquen un trencament cel·lular i muscular del peix, fent que la retenció d'aigua sigui menor un cop les mostres es descongelen. És per a això que, el tractament de congelació a -20°C a partir d'una rampa d'abatedor (congelació ràpida; temperatura de -20°C en un temps inferior a 45 minuts), la humitat és significativament ($p < 0.05$) més alta que la congelació lenta de -20°C , degut a la mida dels cristalls de gel. Per contra, les mostres congelades en cambra fins a -80°C (C2) no difereixen de les mostres fresques però malgrat la baixa temperatura a la que s'arriba, es produeix cert dany al teixit muscular del peix que provoca variacions en el contingut d'humitat, però menors que els altres tractaments.

Taula 4.2. Contingut d'aigua de les mostres de verat en funció del mètode de congelació aplicat a t=2. Es mostren els valors de la mitjana \pm desviació estàndard.

	Mètode congelació	n	Mín.-màx.	Mitjana \pm DE
Humitat (%)	C0	50	73.30 - 75.96	74.63 \pm 0.68 ^a
	C1	100	70.22 - 72.11	71.16 \pm 0.48 ^c
	C2	100	72.76 - 74.64	73.70 \pm 0.48 ^{ab}
	C3	100	71.49 - 73.37	72.43 \pm 0.48 ^{bc}

Les lletres diferents (^{abc}) indiquen diferències significatives ($p < 0.05$) per l'efecte del tractament. Considerant C0= producte fresc, C1=congelació a -20°C, C2=congelació a -20°C amb abatedor i C3=congelació a -80°C, de mostres tant del lot 1 (L1) i del lot 2 (L2).

Finalment, a la Taula 4.3 es mostra la humitat en funció dels cicles de congelació-descongelació als que les mostres han estat sotmeses. Es presenten el nombre de dades utilitzades (n), els valors mínims, màxims, mitjana i desviació estàndard (DE) del contingut d'humitat depenent del temps. Tal com es pot observar, els valors d'humitat oscil·len del 70.92% al 75.96%. S'observen diferències significatives ($p < 0.05$) per l'efecte del temps de mostreig entre t=2 i la resta. Les mostres no congelades i les congelades una vegada van mostrar percentatges d'humitat significativament més elevats (74.63 \pm 0.68 i 73.20 \pm 0.40, respectivament) que les mostres congelades-descongelades dues vegades (71.69 \pm 0.39), fet que indica un fenomen de pèrdua d'aigua durant el procés de congelació-descongelació. La primera congelació-descongelació no presenta diferències significatives respecte a les mostres fresques, però sí que és diferent de les que han estat sotmeses a un cicle de congelació-descongelació més.

Taula 4.3 Contingut d'aigua de les mostres de verat en funció del temps de mostreig. Es mostren els valors de la mitjana \pm desviació estàndard.

	Cicles de congelació-descongelació	n	Mín.-màx.	Mitjana \pm DE
Humitat (%)	t=0	50	73.30 - 75.96	74.63 \pm 0.68 ^a
	t=1	150	72.42 - 73.98	73.20 \pm 0.40 ^a
	t=2	150	70.92 - 72.46	71.69 \pm 0.39 ^b

Les lletres diferents (^{abc}) indiquen diferències significatives ($p < 0.05$) per l'efecte del temps de mostreig. Considerant t=0 temps de mostra inicial, t=1 passat tres setmanes des de la primera congelació i t=2 és el temps corresponent a la presa de mostres 2 (tres setmanes després de la congelació). Les mostres són corresponents tant als dos lots (L1 i L2).

4.2. Anàlisi qualitativa dels espectres

Abans de desenvolupar els models, es va fer una avaluació qualitativa dels espectres obtinguts de les mostres de verat sense cap pre-processat matemàtic de les dades. La Figura 4.1 mostra l'espectre mitjà, el màxim i el mínim dels espectres obtinguts amb els dos equips: SCiO (A) i Bruker (B) en el conjunt de les mostres de verat (fresques, congelades i descongelades). Com

que els intervals de longituds d'ona amb els que treballa cada equip són diferents, els espectres que s'obtenen també presenten diferències. Tot i això, s'observen característiques comunes en l'interval de 900 a 1020 nm, compartit en tots dos equips. Concretament, en els dos casos, s'observa un pic al voltant de 970 nm, que està relacionat amb la vibració d'enllaços O-H de les molècules d'aigua.

En els espectres obtinguts amb l'equip de baix cost (SCiO), s'observen per un costat, valors positius que semblen estar relacionades amb els enllaços O-H, que podrien donar informació del contingut en aigua al múscul del peix. La primera regió és la que engloba entre 970-1010 nm i, amb les mesures del SCiO, un dels pics importants es troba en aquest rang. Sannia et al. (2019) va relacionar la regió entre 960-980 nm amb el contingut d'humitat del teixit muscular del peix. En el nostre cas, coincideix amb les mostres de peix descongelat, però el rang espectral de les mostres congelades podria haver patit un desplaçament cap a la dreta (1030 nm), que pot ser degut diversos factors, un d'ells els electròlits presents, provocant canvis en les bandes d'absorció d'aigua en l'alçada, amplada i posició.

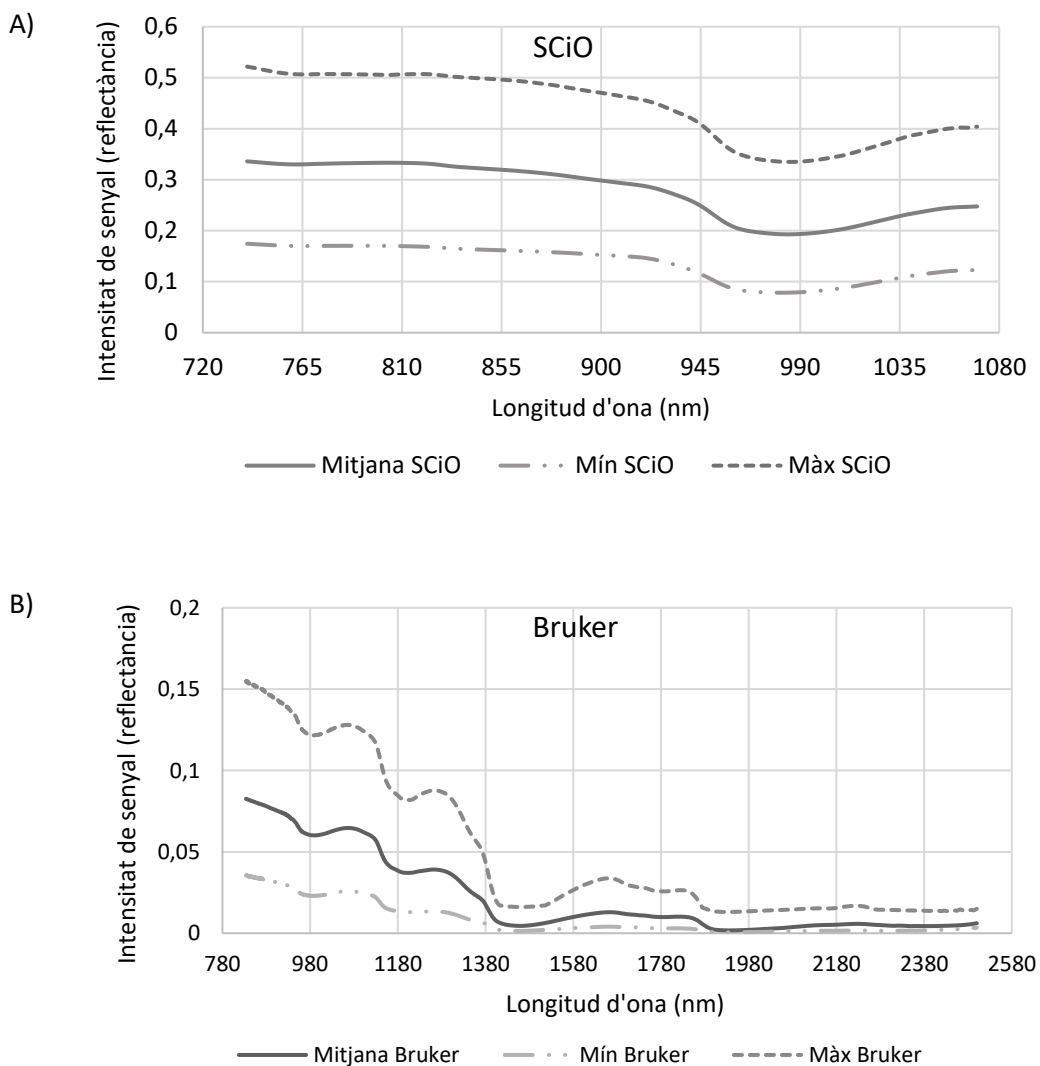


Figura 4.1. Espectre mitjà, màxim i mínim dels espectres obtinguts en les mostres de verat (fresc, congelat i descongelat) obtinguts amb els equips NIR utilitzats: A) SCiO, B) Bruker.

Per altra banda, en els cas dels els espectres obtinguts amb l'equip d'alta precisió (Bruker), destaquen dues bandes diferents, una primera entre 1400-1600 nm i una altra entre 1900-2100 nm. Aquesta primera banda, amb un pic mitjà a 1516 nm, està relacionada amb el rang de longitud d'ona entre 1400-1524 nm, associat amb l'augment de l'aigua lliure del producte. També s'han observat altres pics relacionats amb les molècules d'aigua, concretament, els pics que apareixen prop dels 1180, 1430 i 1930 nm, aquests es deuen a canvis vibracionals d'estirament i combinació d'estirament/deformació dels enllaços O-H, respectivament (Wilson et al., 2015).

A la Figura 4.2 es mostren els espectres obtinguts de les mostres de verat fresc i les mostres de verat descongelat, sotmeses a un o dos cicles de congelació-descongelació. Tal com es pot observar, els espectres tendeixen a agrupar-se en funció de si les mostres són fresques (t0) o han estat sotmeses a un o més cicles de congelació-descongelació (t1 i t2), i la mateixa tendència s'observa per SCiO i Bruker.

Diversos autors han relacionat la regió espectral d'entre 900 i 1400 nm amb els canvis vibracionals dels enllaços O-H i C-H (Reis et al., 2017). Aquest fenomen es pot atribuir essencialment a l'activitat de proteòlisi i a la relaxació de l'estructura lipídica durant la descongelació. A causa de la ruptura de la paret cel·lular i la desnaturalització de les proteïnes, l'alliberament d'exsudats pot afectar l'efecte de dispersió amb la mostra i la interacció amb l'aigua, pel que fa a la relació entre aigua lliure i lligada. En aquest cas es troba un pic superior en les mostres fresques respecte a les descongelades.

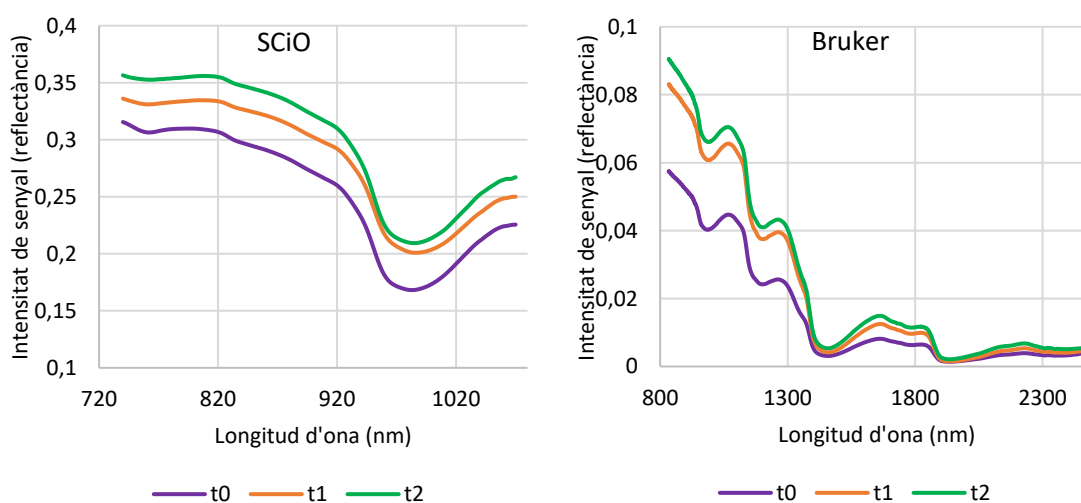


Figura 4.2. Espectres mitjans dels cicles de congelació del verat fresc, congelat i descongelat obtinguts amb els equips NIR SCiO i Bruker. Els valors de t=0 corresponen a l'adquisició d'espectres a la setmana 0, adquisició d'espectres de les mostres fresques. t=1 en la setmana 3; adquisició d'espectres de les mostres descongelades pels tres tractaments de congelació. Finalment, t=2: setmana 5.

A la Figura 4.3 s'observen els espectres obtinguts en les mostres de verat fresc i mostres de verat descongelat, després d'haver estat sotmeses a diferents mètodes de congelació. Es pot observar que els espectres de les mostres descongelades mostren similituds espectrals respecte les mostres fresques (C0). Pel que fa als espectres obtinguts amb el SCiO, podem destacar la proximitat dels diferents espectres de D1, D2 i D3, on en aquest cas, els espectres del verat

tractat a -80°C (D2) i a -20°C amb abatedor (D3) es sobreposen, deixant una ínfima diferència amb el producte congelat lentament a -20°C . Aquest comportament és diferent en els espectres del Bruker, on la superposició la trobem en les mostres congelades a -20°C , mentre que lleugerament desplaçat i amb menor reflectància trobem les de temperatura inferior (-80°C).

Amb les dues tecnologies (SCiO i Bruker) podem observar un pic a 970 nm, relacionat amb la vibració d'enllaços O-H de les molècules d'aigua, tal com s'ha explicat. Aquests resultats poden ser deguts al diferent contingut d'aigua de les mostres, ja que tal com s'ha descrit anteriorment, s'han observat diferències significatives entre els diferents mètodes de congelació utilitzats. Concretament, les mostres fresques (C0), presenten un contingut d'aigua superior respecte a la resta, fet que provoca que la reflectància a 970 nm sigui menor, en canvi, les mostres que han estat sotmeses a una congelació a -20°C (D1), presenten un contingut d'aigua menor, respecte a la resta, fet que provoca que la reflectància a 970 nm sigui major.

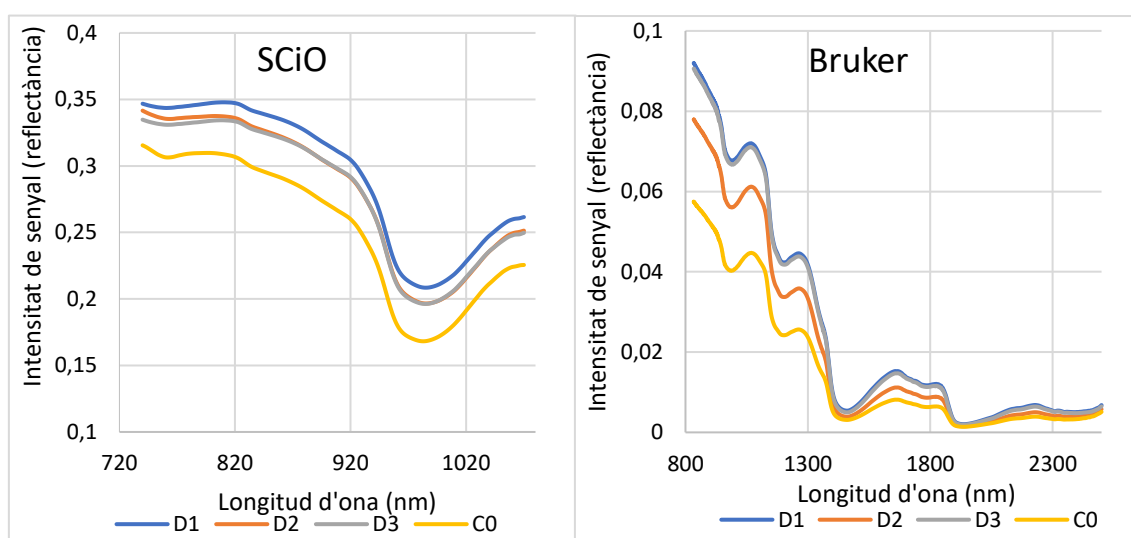


Figura 4.3. Espectres mitjans dels diferents mètodes de congelació del verat descongelat obtinguts per NIR amb els quepis SCiO i Bruker. Els valors de D1 corresponen a les mostres descongelades després d'haver estat congelades a -20°C , D2 ha estat sotmeses a una congelació ó a -80°C en una cambra de congelació i D3 tractament de congelació ràpida a -20°C a partir d'una rampa amb abatedor. Mentre que C0 correspon a les mostres fresques.

Finalment, a la Figura 4.4 s'observen els espectres obtinguts de les mostres de verat congelat sotmeses a diferents mètodes de congelació. Tal com podem observar, en les dues tecnologies (SCiO i Bruker) els espectres de les mostres que han estat congelades a -80°C (C2) i a -20°C amb abatedor (C3), mostren una reflectància major que les que han estat congelades a -20°C (C1). Aquests resultats poden ser deguts a canvis estructurals produïts per les diferents velocitats de congelació del peix segons el procediment de congelació utilitzat, que influencia la grandària i el nombre de cristalls de gel. En una congelació ràpida, es formen més cristalls de gel, de mida més petita i distribuïts de manera més uniforme, que en el cas d'una congelació a velocitat lenta, fet que provoca menys danys als teixits cel·lulars del peix, ja que els cristalls tenen menor força expansiva (Zhu et al., 2013). També cal destacar que en el cas dels espectres obtinguts amb l'equip SCiO, hi ha una desviació del pic de l'aigua a 1020 nm, això pot ser degut a canvis de coloració dels peixos produïts per l'emmagatzematge en congelació, provocant coloracions més focues en la superfície del teixit muscular.

En comparació a la Figura 4.3, destaca la diferència que hi ha en absorbància de l'adquisició d'espectres de verat congelat a -20°C en cambra de congelació. En el cas anterior la similitud entre els tres tractaments era molt més pròxima, mentre que en aquest cas s'observa més diferenciació amb C1 que no es visualitzava anteriorment. De fet, en el cas de les mostres descongelades, la que té una menor absorbància és la mostra congelada amb una cambra de congelació a -80°C (C2), mentre que les altres dues tenen valors d'absorbància molt semblants, comportament contrari a l'observat en la Figura 4.4.

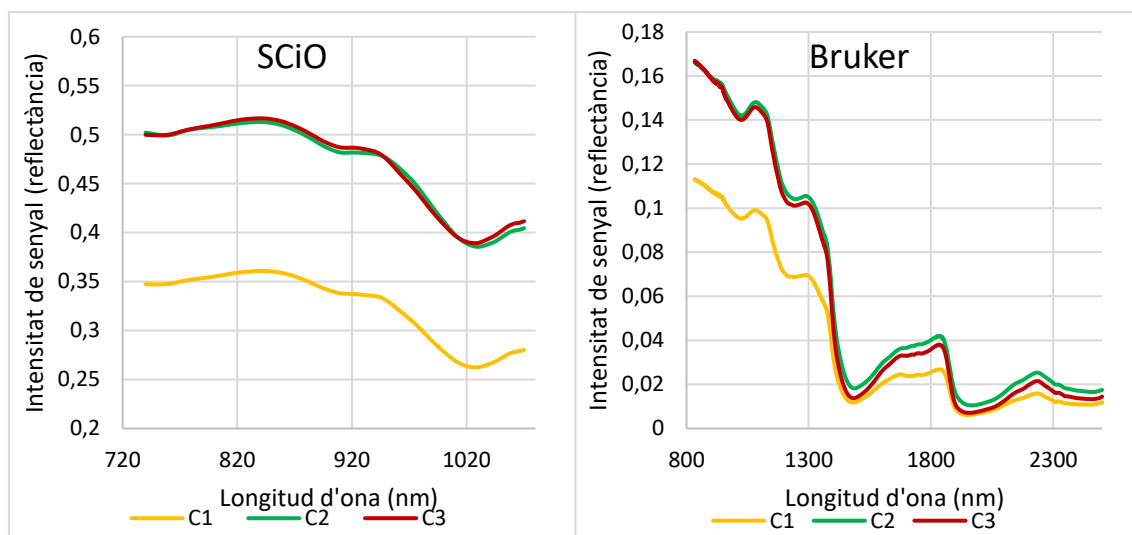


Figura 4.4. Espectres mitjans del verat congelat en funció dels diferents mètodes de congelació obtinguts per NIR amb els equips SCIo i Bruker. Els valors de C1 corresponen a la congelació a -20°C , C2 congelació a -80°C en una cambra de congelació i C3 tractament de congelació ràpida a -20°C a partir d'una rampa amb abatedor

4.3. Models de classificació de les mostres de verat en funció del mètode de congelació utilitzat

Després d'analitzar qualitativament els espectres adquirits, es va aplicar un mètode de pre-processat espectral per tal de reduir el soroll de fons i augmentar el senyal. Concretament, es va aplicar una primera derivada i *Mean Center*. En ambdós casos, aquest pre-processat permet distingir els pics sobreposats, reduir les diferències en els tipus de linealitat, disminuir el soroll, i millorar la relació senyal/soroll.

La Taula 4.4 mostra els valors estadístics obtinguts amb l'equip NIR d'alta resolució (Bruker) per els models de classificació després d'aplicar el pre-processat espectral. Tal com es pot observar, el model de classificació desenvolupat per les mostres congelades una vegada (Temps 1) té una major precisió (84.3% d'encert global) que el model desenvolupat per mostres descongelades una vegada (Temps 1) (66% d'encert global). Així doncs, la classificació és més acurada en el cas de les mostres que estan en estat congelat respecte les descongelades. Quan les mostres han estat congelades i descongelades dues vegades (Temps 2), s'observa la mateixa tendència, la precisió dels models de classificació és major en mostres congelades (76% d'encert global).

No obstant, podem observar que les mostres que han estat sotmeses a dos cicles de congelació i descongelació són més fàcils de ser detectades i, en conseqüència, classificades. Quan es mesuren les mostres congelades, independentment dels cicles de congelació i descongelació

que hagin patit, la dispersió de la llum es veu afectada per l'estructura cristal·lina del gel, aquest fet associat al contingut d'aigua que contenen les mostres de peix serà la que permetrà una classificació més encertada. Com s'ha esmentat anteriorment, una congelació ràpida formarà uns cristalls més petits i la dispersió de la llum actuarà diferent en comparació als cristalls de gel més grossos en una congelació lenta, com en el cas de les mostres C1 (-20°C) i C2 (-80°C).

Taula 4.4. Resultats de classificació dels conjunts de calibratge i validació de L1 i L2 utilitzant l'espectròmetre Bruker quan es mesuren les mostres de verat a t=1 i t=2 congelades i descongelades.

Temps mostreig	Estat de la mostra	Pretractament	n	n CAL	n VAL	LV	Real / Predit	Calibratge				Validació			
								C1	C2	C3	Precisió mitjana (%)	C1	C2	C3	Precisió mitjana (%)
t=1 (setmana 3)	Congelat	1a Deriv. i Mean Center	151	100	51	9	C1	30	1	1	92.0	17	2	1	84.3
							C2	0	34	3		4	10	1	
							C3	0	3	28		0	0	16	
	Descongelat	1a Deriv. i Mean Center	148	98	50	6	D1	24	4	4	69.0	11	1	2	66.0
							D2	5	26	9		6	10	4	
							D3	3	5	18		0	4	12	
t=2 (setmana 5)	Congelat	1a Deriv. i Mean Center	148	98	50	8	C1	30	1	1	96.9	16	5	3	76.0
							C2	0	31	0		0	12	2	
							C3	1	0	34		1	1	10	
	Descongelat	1a Deriv. i Mean Center	149	98	51	9	D1	21	7	0	77.6	10	6	0	74.5
							D2	11	25	2		5	10	0	
							D3	1	1	30		1	1	18	

Els valors de C1 corresponen a la congelació a -20°C, C2 congelació ó a -80°C en una cambra de congelació i C3 tractament de congelació ràpida a -20°C a partir d'una rampa amb abatador. Mentre que els valors de D1 corresponen a les mostres descongelades després d'haver estat congelades a -20°C, D2 ha estat sotmeses a una congelació ó a -80°C en una cambra de congelació i D3 tractament de congelació ràpida a -20°C a partir d'una rampa amb abatador.

La Taula 4.5 mostra els valors estadístics obtinguts amb el sensor NIR de baix cost (SCiO) per els models de classificació després d'aplicar el pre-processat espectral.

De la mateixa manera que s'ha observat amb l'equip d'alta resolució, els models desenvolupats amb mostres de verat descongelat tenen una precisió mitjana més baixa (60.8%) respecte a les mostres que es mesuren en producte congelat (94.1%). En aquest cas la diferència entre els dos equips ve donada per la precisió que disposa cadascun d'aquests.

També s'observa que el model desenvolupat que presenta una pitjor classificació és el que utilitza mostres de verat congelades a -20°C . La tècnica no ha permès diferenciar el mètode de congelació quan es tracta d'espectres de les mostres descongelades. Aquests es classifiquen de forma errònia, confonent amb les mostres que han estat sotmeses a un tractament de -20°C amb congelació ràpida (C1) amb les mostres que han estat tractades amb un abatedor (C3).

En el cas de les mostres corresponents a congelacions lentes, amb una obtenció d'espectres en estat congelat (C1 i C2) sí que són fàcilment diferenciables però, al descongelar-se, pateixen danys que generen una mala classificació d'aquestes un cop s'obtenen i pre-tracten els espectres. Aquest fet es pot veure relacionat amb el contingut d'aigua, com s'ha comentat, els cicles de congelació provoquen danys en el teixit muscular i en les cèl·lules, dificultant la retenció d'aigua un cop s'han descongelat. En aquest cas, el pre-tractament aplicat per a les mostres congelades va ser el mateix que en els anteriors, però en les descongelades, per obtenir una classificació més rigorosa, es va aplicar un pre-tractament SNV on es calcula per separat per a cada espectre, corregint l'efecte de la dispersió.

En el cas de les mostres del temps 2, presentades a la Taula 4.5 amb els pre-tractaments de primera derivada i el Mean Center, igual que s'han tractat les dades del Bruker, s'obtenen uns resultats molt similars i, en aquest cas, la diferència entre mostres congelades i descongelades és més considerable, essent del 98% i 72.5%, respectivament.

Un cop realitzats els dos models, on el factor variant és les vegades que les mostres han estat sotmeses a un tractament de congelació i posterior descongelació, podem veure que en el cas del temps 2 la precisió és major, per tant, quantes més vegades pateixen descongelació més danyat es veu el teixit muscular del peix i, per tant, menor retenció d'aigua, afectant així a la intensitat de la senyal absorbida per l'equip NIR.

Cal recordar que per aquest estudi s'han utilitzat dos lots de peix que han estat capturats en diferents moments de l'any, això fa que hagi variacions inicials en el contingut de greix i aigua que també poden interferir en els resultats. Si només es realitzés amb el lot 1 o només amb el lot2, la capacitat de discriminació seria molt millor. El fet que el contingut d'aigua inicial sigui diferent afecta a la capacitat de classificació posterior. Per aquest motiu, és molt important desenvolupar models robustos amb mostres procedents d'extraccions al llarg de tot l'any. Els resultats obtinguts mostren la capacitat d'aquests sensors però abans d'utilitzar aquesta eina cal desenvolupar aquests models i fer una validació externa.

Taula 4.5. Resultats de classificació dels conjunts de calibratge i validació de les mostres de L1 i L2 utilitzant l'espectròmetre SCiO quan es mesuren les mostres de t=1 i t=2, congelades i descongelades.

Temps mostreig	Estat de la mostra	Pretractament	n	n CAL	n VAL	LV	Real Predit	Calibratge				Validació			
								C1	C2	C3	Precisió mitjana (%)	C1	C2	C3	Precisió mitjana (%)
t=1 (setmana 3)	Congelat	1a Deriv. i Mean Center	149	98	51	8	C1	31	0	3	90.8	16	0	0	94.1
							C2	0	31	2		0	15	2	
							C3	1	3	27		0	1	17	
	Descongelat	SNV	149	98	51	7	D1	21	4	13	62.2	14	1	12	60.8
							D2	2	27	6		2	14	3	
							D3	9	3	13		1	1	3	
t=2 (setmana 5)	Congelat	1a Deriv. i Mean Center	147	97	50	8	C1	36	1	0	99.0	14	0	0	98.0
							C2	0	30	0		0	17	1	
							C3	0	0	30		0	0	18	
	Descongelat	1a Deriv. i Mean Center	145	94	51	7	D1	24	2	7	70.2	13	2	2	72.5
							D2	3	25	6		1	12	4	
							D3	6	4	17		3	2	12	

Els valors de C1 corresponen a la congelació a -20°C, C2 congelació ó a -80°C en una cambra de congelació i C3 tractament de congelació ràpida a -20°C a partir d'una rampa amb abatador. Mentre que els valors de D1 corresponen a les mostres descongelades després de ser congelades a -20°C, D2 han estat sotmeses a una congelació ó a -80°C en una cambra de congelació i D3 a tractament de congelació ràpida a -20°C a partir d'una rampa amb abatador.

4.4. Model classificació per producte fresc i descongelat de la mostra

Finalment, es va desenvolupar un model de classificació segons l'estat de la mostra, és a dir si aquesta ha estat descongelada i, per tant, prèviament congelada, o si es tracta de mostres de peix fresc que no han estat sotmeses a cap tractament de congelació. En aquest cas, també s'ha utilitzat un pre-processat matemàtic: primera derivada i Mean Center.

A partir d'aquí, es classifiquen els conjunts de validació respecte l'equip utilitzat. En aquest cas, s'ha observat una precisió mitjana molt semblant, sent superior la del SCIO (amb un 97,5%), mentre que la del Bruker és menor (93,2%). A la Taula 4.7 es pot observar que les mostres no identificades correctament corresponen a mostres fresques que han sigut categoritzades com a descongelades. És doncs, que amb ambdós equips, segons el model de classificació elaborat, totes les mostres que han estat sotmeses a un tractament de congelació, indiferent de les condicions, són classificades com a tal, mentre que les mostres fresques es poden veure predides com a descongelades. Aquest darrer fet pot venir donat per molts factors, entre ells: variacions en el color, humitat de la mostra, activitat d'aigua, dany cel·lular degut a la congelació, etc. (Sun et al., 2019).

El conjunt de fets s'han atribuït al diferent contingut d'aigua present en el teixit del peix després de les diferents congelacions (-20°C, -80°C i congelació ràpida per abatador a -20°C) i posterior descongelació (a temperatures entre 4-10°C), que produeixen canvis d'absorció al voltant de 980 nm associats al contingut d'aigua.

Taula 4.6. Resultats de classificació dels conjunts de calibratge i validació utilitzant l'espectròmetre Bruker quan es mesuren les mostres segons l'estat de la mostra.

Classificació	Tecnologia NIR	Pretractament	n	n CAL	n VAL	LV	Real Predit	Calibratge			Validació		
								D	F	Precisió mitjana (%)	D	F	Precisió mitjana (%)
Estat	Bruker	1a Deriv. i Mean Center	348	230	118	9	D	194	0	97.0	89	0	93.2
							F	7	29		8	21	
	SCiO	1a Deriv. i Mean Center	348	229	119	9	D	193	0	99.1	100	0	97.5
							F	2	34		3	16	

Els valors de D corresponen als espectres de mostres descongelades, que prèviament han estat congelades amb els diferents tractaments esmentats anteriorment. Les mostres anomenades F son les que s'han pres en estat fresc.

4.5. Models de classificació de les mostres de verat en funció dels cicles de congelació-descongelació

De la mateixa manera que s'ha fet a l'apartat anterior, una vegada obtingudes les dades químiques de les mostres utilitzades per al desenvolupament dels models predictius, es varen analitzar qualitativament els espectres adquirits mitjançant Matlab®. Es van provar diferents pre-processats matemàtics per reduir el soroll de fons i augmentar el senyal i, finalment, es van seleccionar els que donaven millors resultats.

Concretament, en el cas dels models de classificació segons els cicles de congelació-descongelació, desenvolupats amb l'equip Bruker com amb el SCiO, es va aplicar una primera derivada i Mean Center, això permet millorar la interpretació de les dades. A la Taula 4.6 es mostren els valors estadístics obtinguts pel model de classificació després d'aplicar el pre-processat espectral.

Tal com es pot observar, la precisió de l'equip NIR d'alta resolució és menor que la de l'equip NIR de baix cost, obtenint un encert global del 62.7% i 95.0%, respectivament. Aquesta diferència ve donada per la resolució de l'equip.

En el cas dels resultats de classificació dels conjunts de validació utilitzant l'espectròmetre Bruker, podem veure que la que presenta més dificultat per ser classificada de forma correcta és la mostra de temps 2, ja que més d'un 30% d'aquestes han estat predites com a mostres de temps 1, mentre que les d'aquest darrer temps si que tenen major encert. Aquesta diferència no es tant destacable amb els resultats de classificació obtinguts amb el SCiO.

Taula 4.7. Resultats de classificació dels conjunts de calibratge i validació utilitzant l'espectròmetre Bruker i SCiO quan es mesuren les mostres segons el temps

Classificació	Tecnologia NIR	Pretractament	n	n CAL	n VAL	LV	Real Predit	Calibratge				Validació			
								t0	t1	t2	Precisió mitjana (%)	t0	t1	t2	Precisió mitjana (%)
Cicle congelació - descongelació	Bruker	1a Deriv. i Mean Center	347	229	118	7	t0	25	6	4	86.0	15	8	8	62.7
							t1	3	83	10		3	28	7	
							t2	1	8	89		3	15	31	
	SCiO	1a Deriv. i Mean Center	348	229	119	9	t0	34	2	0	93.9	48	3	0	95.0
							t1	0	91	5		1	49	0	
							t2	0	7	90		1	1	16	

Els valors de t=0 corresponen a l'adquisició d'espectres a la setmana 0, adquisició d'espectres de les mostres fresques. t=1 en la setmana 3; adquisició d'espectres de les mostres descongelades pels tres tractaments de congelació. Finalment, t=2: setmana 5; adquisició d'espectres de les mostres pels tres tractaments de congelació.

5. APLICABILITAT

Un aspecte important d'aquest projecte és l'aplicabilitat, ja que els instruments miniaturitzats basats en espectroscòpia d'infrarojos propers (NIR) són d'especial interès pels organismes de control i els consumidors, pel seu baix cost. Aquests instruments estan a l'abast de les empreses alimentàries i obren un ampli ventall de possibilitats per al control de qualitat de diverses matèries primeres i productes, així com pel control de procés.

Els models predictius desenvolupats en aquest projecte amb el sensor NIR de baix cost poden ser molt útils, ja que actualment ha augmentat l'interès per a la determinació en línia de la qualitat del peix i d'una manera no destructiva. Aquestes tecnologies poden ser molt adequades per evitar el frau en el sector pesquer i comprovar que s'està venent al consumidor el que realment està etiquetat i també permeten determinar l'estacionalitat en que s'han capturat.

Els models que s'han desenvolupat en el marc d'aquest projecte permeten determinar el contingut d'humitat de verat fresc, congelat i descongelat. El fet de treballar amb mostres de dos lots de peixos capturats en dos èpoques de l'any diferents, ha permès elaborar uns models predictius més robustos, fent una validació i permetent avaluar la diferència de contingut d'humitat de les mostres de peix entre diferents estacions (hivern i primavera). Tanmateix, per tal que aquests es puguin implementar en la indústria alimentària i que en un futur, també puguin ser utilitzats pels consumidors, cal elaborar un model més robust amb una major quantitat de mostres. Aquests serviran pel control del verat, evitant que sigui venut com a fresc, tot i haver estat sotmès a algun tractament de congelació previ.

Els equips NIR de baix cost (SCiO) poden ser útils perquè els inspectors alimentaris i els consumidors avaluin la qualitat dels productes de la pesca i previnguin el frau alimentari in-situ.

En aquest projecte, s'han desenvolupat models predictius específics per al verat (*Scomber scombrus*), però aquest sensor NIR de baix cost també es podria utilitzar en altres productes de la pesca o altres aliments, només caldria realitzar un procés de calibratge específic per al tipus producte que es vulgui analitzar.

6. CONCLUSIONS

- 1) Els models predictius desenvolupats amb la tecnologia NIR permeten classificar les mostres de verat descongelat sotmeses a diferents temperatures de congelació (congelació lenta a -20°C, -80°C i congelació ràpida a -20°C) amb un encert global del 81.4% i 75.2% en el cas dels equips SCiO i Bruker, respectivament.
- 2) El moment de captura del peix fa variar el contingut d'humitat de les mostres, fent que les mostres capturades a l'hivern (Lot 1), tinguin menor contingut d'humitat que les mostres capturades a la primavera (Lot 2).
- 3) Els models predictius desenvolupats a partir dels espectres adquirits amb un sensor de baix cost (SCiO) i amb un equip d'alta resolució (Bruker) permeten classificar les mostres de verat fresc i les mostres de verat congelat de manera satisfactòria
- 4) Els sistemes NIR utilitzats en aquest estudi permeten determinar si el verat ha patit un o dos cicles de congelació-descongelació. Les mostres de verat que han estat sotmeses a un o més cicles de congelació poden ser distribuïdes d'acord els paràmetres corresponents, a partir del model de classificació elaborat. Les mostres són classificables amb elevada precisió tant per nombre de vegades que han estat sotmeses a cicles de congelació-descongelació com per estat de la mostra (fresc/descongelat).
- 5) Els equips NIR de baix cost avaluats són útils per a detectar diferents tipus de frau en peix. Tot i això, cal desenvolupar models molt robustos que tinguin en compte la variació estacional en contingut de greix que té el verat ja que això pot produir un error significatiu en la capacitat de classificació.
- 6) Els resultats són prometedors i fan pensar que es podria arribar a proporcionar una eina de baix cost a les autoritats competents així com al consumidor per tal de detectar el frau en temes de frescor de peix i prevenir males pràctiques de congelació/descongelació.

BIBLIOGRAFIA

- Agyekum, A. A., Kutsanedzie, F. Y. H., Annavaram, V., Mintah, B. K., Asare, E. K., & Wang, B. (2020). FT-NIR coupled chemometric methods rapid prediction of K-value in fish. *Vibrational Spectroscopy*, 108, 103044. Accessible a: [10.1016/j.vibspec.2020.103044](https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2020.103044)
- Alamprese, C., & Casiraghi, E. (2015). Application of FT-NIR and FT-IR spectroscopy to fish fillet authentication. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 720-725. Accessible a: [10.1016/j.lwt.2015.03.021](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.021)
- AOAC. (1990). Official methods of analysis of the AOAC, 15th Edition. *Association of official analytical chemists*. Arlington, VA, USA
- Baianu, I., Guo, J., Nelson, R., You, T., and Costescu, D. (2011) NIR Calibrations for Soybean Seeds and Soy Food Composition Analysis: Total Carbohydrates, Oil, Proteins and Water Contents [v.2]. *Nature Precedings*.
- Balaban, M. O., Kristinsson, H. G., & Otwell, W. S. (2005). Evaluation of Color Parameters in a Machine Vision Analysis of Carbon Monoxide-Treated Fish—Part I. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 14(2), 5–24. Accessible a: https://doi.org/10.1300/J030v14n02_02
- Balaban, M. O., Ünal Şengör, G. F., Soriano, M. G., & Ruiz, E. G. (2010). Using Image Analysis to Predict the Weight of Alaskan Salmon of Different Species. *Journal of Food Science*, 75(3), E157–E162. Accessible a: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01522.x>
- Barbin, D. F., Ana Lucia De Souza Madureira Felicio, Sun, D.-W., Nixdorf, S. L., and Hirooka, E. Y. (2014) Application of infrared spectral techniques on quality and compositional attributes of coffee: An overview. *Food Research International* 61, 23–32. Accessible a: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.005>
- Bjarnadottir, S. G., Lunde, K., Alvseike, O., Mason, A., & Al-Shamma'a, A. I. (2015). Assessing quality parameters in dry-cured ham using microwave spectroscopy. *Meat Science*, 108, 109–114. Accessible a: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.06.004>
- Cai, J., Chen, Q., Wan, X., and Zhao, J. (2011) Determination of total volatile basic nitrogen (TVB-N) content and Warner–Bratzler shear force (WBSF) in pork using Fourier transform near infrared (FT-NIR) spectroscopy. *Food Chemistry* 126, 1354–1360. Accessible a: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.098>
- Cakli, S., Kilinc, B., Cadun, A., Dincer, T., & Tolasa, S. (2006). Effects of Gutting and Ungutting on Microbiological, Chemical, and Sensory Properties of Aquacultured Sea Bream (*Sparus aurata*) and Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) Stored in Ice. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(7), 519–527. <https://doi.org/10.1080/10408390500343209>
- Cakli, S., Kilinc, B., Cadun, A., Dincer, T., & Tolasa, S. (2007). Quality differences of whole ungutted sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) while stored in ice. *Food Control*, 18(5), 391–397. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.11.005>

Cappeln, G., Nielsen, J., & Jessen, F. (1999). Synthesis and degradation of adenosine triphosphate in cod (*Gadus morhua*) at subzero temperatures. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(8), 1099-1104.

Cascant, M. M., Breil, C., Fabiano-Tixier, A. S., Chemat, F., Garrigues, S., & de la Guardia, M. (2018). Determination of fatty acids and lipid classes in salmon oil by near infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 239, 865-871. Accessible a: [10.1016/j.foodchem.2017.06.158](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.158)

Celignis Limited. (2019). *Near Infrared Spectroscopy, NIR model development at Celignis*. Accessible a: <https://www.celignis.com/NIR.php>

Celik, M. (2008). Seasonal changes in the proximate chemical compositions and fatty acids of chub mackerel (*Scomber japonicus*) and horse mackerel (*Trachurus trachurus*) from the north eastern Mediterranean Sea. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(5), 933-938. Accessible a: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2007.01549.x>

Çerçi, K. N., and Hürdoğan, E. (2020) Comparative study of multiple linear regression (MLR) and artificial neural network (ANN) techniques to model a solid desiccant wheel. *International Communications in Heat and Mass Transfer* 116, 104713. Accessible a: [10.1016/j.icheatmasstransfer.2020.104713](https://doi.org/10.1016/j.icheatmasstransfer.2020.104713)

Cheng, J. H., Dai, Q., Sun, D. W., Zeng, X. A., Liu, D., i Pu, H. B. (2013). Applications of non-destructive spectroscopic techniques for fish quality and safety evaluation and inspection. *Trends in Food Science & Technology*, 34(1), 18-31. Accessible a: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.08.005>

Collell, C. (2012). *Espectroscòpia NIR per a la determinació on-line de l'aw i del contingut d'aigua i sal durant l'assecat de productes crus-curats*. Tesi doctoral. Universitat de Girona i Institut de Tecnologia Agroalimentària, Catalunya.

Collell, C., Gou, P., Picouet, P., Arnau, J., & Comaposada, J. (2010). Feasibility of near-infrared spectroscopy to predict aw and moisture and NaCl contents of fermented pork sausages. *Meat Science*, 85(2), 325-330. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.01.022>

Copepy, F., Bécue, A., Sacré, P.-Y., Ziemons, E. M., Hubert, P., and Esseiva, P. (2020) Providing illicit drugs results in five seconds using ultra-portable NIR technology: An opportunity for forensic laboratories to cope with the trend toward the decentralization of forensic capabilities. *Forensic Science International* 110498. Accessible a: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110498>

Cozzolino, D., & Murray, I. (2002). Effect of Sample Presentation and Animal Muscle Species on the Analysis of Meat by near Infrared Reflectance Spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 10(1), 37-44. <https://doi.org/10.1255/jnirs.319>

Desai, P. M., Acharya, S., Armstrong, C., Wu, E. L., and Zaidi, S. A. (2020) Underpinning mechanistic understanding of the segregation phenomena of pharmaceutical blends using a near-infrared (NIR) spectrometer embedded segregation tester. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 154, 105516. Accessible a: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105516>

Dumalisile, P., Manley, M., Hoffman, L., and Williams, P. J. (2020) Near-Infrared (NIR) Spectroscopy to Differentiate *Longissimus thoracis et lumborum* (LTL) Muscles of Game Species. *Food Analytical Methods* 13, 1220–1233

Farrés, M.; Platikanov, S.; Tsakovski, S.; Tauler, R. (2015). Comparison of the Variable Importance in Projection (VIP) and of the Selectivity Ratio (SR) Methods for Variable Selection and Interpretation. *Journal of Chemometrics* 29, 528–536. Accessible a: <https://doi.org/10.1002/cem.2736>

Fulladosa, E., Duran-Montgé, P., Serra, X., Picouet, P., Schimmer, O., & Gou, P. (2013). Estimation of dry-cured ham composition using dielectric time domain reflectometry. *Meat Science*, 93(4), 873–879. Accessible a: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.12.002>

Genot, V., Bock, L., Dardenne, P., Colinet, G. (2014). Use of near-infrared reflectance spectroscopy in soil analysis. A review. *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment* 18(2), 247-261.

Ghidini, S., Varrà, M. O., Dall'Asta, C., Badiani, A., Ianieri, A., & Zanardi, E. (2019). Rapid authentication of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) according to production method, farming system, and geographical origin by near infrared spectroscopy coupled with chemometrics. *Food Chemistry*, 280, 321-327. Accessible a: [10.1016/j.foodchem.2018.12.075](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.075)

Giró, M. (2019). *Determinació de la composició i qualitat de la carn separada mecànicament amb un sistema NIR de baix cost* (Treball de fi de Grau). Universitat de Girona, Catalunya.

Grassi, S., Casiraghi, E., & Alamprese, C. (2018). Handheld NIR device: A non-targeted approach to assess authenticity of fish fillets and patties. *Food Chemistry*, 243, 382-388. Accessible a: [10.1016/j.foodchem.2017.09.145](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.145)

Groenewald, D. N., Skelton, R. E., Gilbank, D. G., & Loubser, S. I. (2017). The close pair fraction of BCGs since $z = 0.5$: major mergers dominate recent BCG stellar mass growth. *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society*, 467(4), 4101–4117. Accessible a: <https://doi.org/10.1093/mnras/stx340>

Guo, Y., Ni, Y., and Kokot, S. (2016) Evaluation of chemical components and properties of the jujube fruit using near infrared spectroscopy and chemometrics. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 153, 79–86.

Heia, K., Lutén, J. B., Oehlenschläger, J., & Ólafsdóttir, G. (2003). *Quality of fish from catch to consumer*. Macmillan Publishers. <https://doi.org/10.3920/978-90-8686-510-9>

Hubert, M., Rousseeuw, P.J. i Van Aelst, S. (2008). High-breakdown robust multivariate methods. *Statistical Science*, (23), 92-119.

Karlsdóttir, M. G., Arason, S., Kristinsson, H. G., & Sveinsdóttir, K. (2014). The application of near infrared spectroscopy to study lipid characteristics and deterioration of frozen lean fish muscles. *Food Chemistry*, 159, 420-427. Accessible a: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.050>

Khodabux, K., L Omelette, M. S. S., Jhaumeer-Laulloo, S., Ramasami, P., & Rondeau, P. (2007). Chemical and near-infrared determination of moisture, fat and protein in tuna fishes. *Food Chemistry*, 102(3), 669-675. Accessible a: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.057>

- Kim, S. H., Park, J. H., Kwon, J. S., Cho, J. G., Park, K. G., Park, C. H., Yoo, J. J., Atala, A., Choi, H. S., Kim, M. S., and Lee, S. J. (2020) NIR fluorescence for monitoring in vivo scaffold degradation along with stem cell tracking in bone tissue engineering. *Biomaterials* 258, 120267. Accessible a: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120267>
- Kimiya, T., Sivertsen, A. H., & Heia, K. (2013). VIS/NIR spectroscopy for non-destructive freshness assessment of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fillets. *Journal of Food Engineering*, 116(3), 758-764. Accessible a: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.008>
- Lalabadi, H. M., Sadeghi, M., and Mireei, S. A. (2020) Fish freshness categorization from eyes and gills color features using multi-class artificial neural network and support vector machines. *Aquacultural Engineering* 90, 102076. Accessible a: <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2020.102076>
- Leghrib, R., Aantri, Y., Sanchez, J. B., Berger, F., and Kaaya, A. (2020) Assessing the freshness of Agadir blue fish using a metal oxide gas sensing array. *Materials Today: Proceedings* 22, 1–5. Accessible a: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.08.054>
- Li, P., Li, S., Du, G., Jiang, L., Liu, X., Ding, S., & Shan, Y. (2020). A simple and nondestructive approach for the analysis of soluble solid content in citrus by using portable visible to near-infrared spectroscopy. *Food Science & Nutrition*, 8(5), 2543–2552. Accessible a: <https://doi.org/10.1002/fsn3.1550>
- Li, X., Zhang, L., Zhang, Y., Wang, D., Wang, X., Yu, L., Zhang, W., and Li, P. (2020) Review of NIR spectroscopy methods for nondestructive quality analysis of oilseeds and edible oils. *Trends in Food Science & Technology* 101, 172–181. Accessible a: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.05.002>
- Marty-Mahé, P., Loisel, P., Fauconneau, B., Haffray, P., Brossard, D., & Davenel, A. (2004). Quality traits of brown trouts (*Salmo trutta*) cutlets described by automated color image analysis. *Aquaculture*, 232(1–4), 225–240. Accessible a: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00458-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00458-7)
- Mathiassen, J. R., Misimi, E., Bondø, M., Veliyulin, E., i Ostvik, S. O. (2011). Trends in application of imaging technologies to inspection of fish and fish products. *Trends in Food Science & Technology*, 22(6), 257–275. Accessible a: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.03.006>
- Mercasa (2021). *Alimentación en España 2021. Febrer 2022*. Accessible a: <https://www.mercasa.es/publicaciones/otras-publicaciones/alimentacion-espana-2021>
- Misimi, E., Mathiassen, J. R., & Erikson, U. (2007). Computer Vision-Based Sorting of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Fillets According to Their Color Level. *Journal of Food Science*, 72(1), S030–S035. Accessible a: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00241.x>
- Moriarity, R. J., Liberda, E. N., and Tsuji, L. J. (2020) Subsistence fishing in the Eeyou Istchee (James Bay, Quebec, Canada): A regional investigation of fish consumption as a route of exposure to methylmercury. *Chemosphere* 258, 127413. Accessible a: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127413>

- Nilsen, H., & Esaiassen, M. (2005). Predicting sensory score of cod (*Gadus morhua*) from visible spectroscopy. *LWT - Food Science and Technology*, 38(1), 95–99. Accessible a: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.05.001>
- Nielsen, J., and Jessen F. (2007). *Handbook of meat, poultry and seafood quality: quality of frozen fish* (2a ed.), Blackwell Pub.
- Nieto, S., Melado, A., Foti, G., Olabarrieta, I., Ramilo, G., Gonzalez, C., Teixeira, B., Velasco, A., and Mendes, R. (2021). Rapid Differentiation of Unfrozen and Frozen-Thawed Tuna with Non-Destructive Methods and Classification Models: Bioelectrical Impedance Analysis (BIA), Near-Infrared Spectroscopy (NIR) and Time Domain Reflectometry (TDR). *Foods* 2022, 11(1), 55. Accessible a: <https://doi.org/10.3390/foods11010055>
- Nordey, T., Joas, J., Davrieux, F., Chillet, M., & Léchaudel, M. (2017). Robust NIRS models for non-destructive prediction of mango internal quality. *Scientia Horticulturae*, 216, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.12.023>
- Ocaño-Higuera, V., Maeda-Martínez, A., Marquez-Ríos, E., Canizales-Rodríguez, D., Castillo-Yáñez, F., Ruíz-Bustos, E., Graciano-Verdugo, A., and Plascencia-Jatomea, M. (2011) Freshness assessment of ray fish stored in ice by biochemical, chemical and physical methods. *Food Chemistry* 125, 49–54. Accessible a: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.034>
- Oliveira, A. C. M., O'Keefe, S. F., & Balaban, M. O. (2004). Video Analysis to Monitor Rigor Mortis in Cultured Gulf of Mexico Sturgeon (*Ancipenser oxyrinchus desotoi*). *Journal of Food Science*, 69(8), E392–E397. Accessible a: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb09901.x>
- Pennisi, F., Giraud, A., Cavallini, N., Esposito, G., Merlo, G., Geobaldo, F., Acutis, P. L., Pezzolato, M., Savorani, F., & Bozzetta, E. (2021). Differentiation between Fresh and Thawed Cephalopods Using NIR Spectroscopy and Multivariate Data Analysis. *Foods*, 10(3), 528. Accessible a: <https://doi.org/10.3390/foods10030528>
- Pierna, J. A. F., Vermeulen, P., Eylembosch, D., Burger, J., Bodson, B., Dardenne, P., and Baeten, V. (2020) Chemometrics in NIR Hyperspectral Imaging: Theory and Applications in the Agricultural Crops and Products Sector. *Comprehensive Chemometrics* 361–379.
- Qu, J.-H., Liu, D., Cheng, J.-H., Sun, D.-W., Ma, J., Pu, H., and Zeng, X.-A. (2015) Applications of Near-infrared Spectroscopy in Food Safety Evaluation and Control: A Review of Recent Research Advances. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 55, 1939–1954.
- Quevedo, R. A., Aguilera, J. M., & Pedreschi, F. (2010). Color of Salmon Fillets By Computer Vision and Sensory Panel. *Food and Bioprocess Technology*, 3(5), 637–643. Accessible a: <https://doi.org/10.1007/s11947-008-0106-6>
- Rahman, A., Kondo, N., Ogawa, Y., Suzuki, T., Shirataki, Y., and Wakita, Y. (2015) Prediction of K value for fish flesh based on ultraviolet–visible spectroscopy of fish eye fluid using partial least squares regression. *Computers and Electronics in Agriculture* 117, 149–153.
- Reboucas, M. V., Santos, J. B. D., Domingos, D., and Massa, A. R. C. (2010) Near-infrared spectroscopic prediction of chemical composition of a series of petrochemical process streams for aromatics production. *Vibrational Spectroscopy* 52, 97–102.

- Reis, M., Martínez, E., Saitua, E., Rodríguez, R., Pérez, I., & Olabarrieta, I. (2017). *Non-invasive differentiation between fresh and frozen/thawed tuna fillets using near infrared spectroscopy (Vis-NIRS)*. *LWT*, 78, 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.12.014>
- Rinnan, Å., Nørgaard, L., van den Berg, F., Thygesen, J., Bro, R., Engelsen, S.B.(2009. *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control* (1st ed), Da-Wen Sun, Ed.; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands.
- Rubio-Celorio, M., Garcia-Gil, N., Gou, P., Arnau, J., & Fulladosa, E. (2015). Effect of temperature, high pressure and freezing/thawing of dry-cured ham slices on dielectric time domain reflectometry response. *Meat Science*, 100, 91–96. Accessible a: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.10.005>
- Rubio, M., García-Gil, N., Gou, P., Arnau, J., & Fulladosa, E. (2013). Detection of pastiness 42 in dry-cured ham using dielectric time domain reflectometry. *ICOMST Conference, Izmir, Turkey, 18-23 August 2013*.
- Sannia, M.; Serva, L.; Balzan, S.; Segato, S.; Novelli, E.; Fasolato, L. (2019) Application of Near-Infrared Spectroscopy for Frozen-Thawed Characterization of Cuttlefish (*Sepia officinalis*). *J. Food Sci. Technol.* 56, 4437–444. Accessible a: [10.1007/s13197-019-03957-6](https://doi.org/10.1007/s13197-019-03957-6)
- Sivertsen, A. H., Kimiya, T., & Heia, K. (2011). Automatic freshness assessment of cod(*Gadus morhua*) fillets by Vis/Nir spectroscopy. *Journal of Food Engineering*, 103(3), 317–323. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.10.030>
- Stien, L. H., Suontama, J., & Kiessling, A. (2006). Image analysis as a tool to quantify rigor contraction in pre-rigor-filleted fillets. *Computers and Electronics in Agriculture*, 50(2), 109–120. Accessible a: <https://doi.org/10.1016/j.compag.2005.08.012>
- Sun, X., Yuan, H., Song, C., Li, X., Hu, A., Yu, S., and Ren, Z. (2019) A novel drying-free identification method of cashmere textiles by NIR spectroscopy combined with an adaptive representation learning classification method. *Microchemical Journal* 149, 104018.
- Taheri-Garavand, A., Fatahi, S., Banan, A., and Makino, Y. (2019) Real-time nondestructive monitoring of Common Carp Fish freshness using robust vision-based intelligent modeling approaches. *Computers and Electronics in Agriculture* 159, 16–27.
- Tinacci, L., Armani, A., Guidi, A., Nucera, D., Shvartzman, D., Miragliotta, V., Coli, A., Giannesi, E., Stornelli, M.R., Fronte, B., (2018). Histological Discrimination of Fresh and Frozen/Thawed Fish Meat: European Hake (*Merluccius merluccius*) as a Possible Model for White Meat Fish Species. *Food Control*, 92, 154–161. Accessible a: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.056>
- Uddin, M., Turza, S., & Okazaki, E. (2007). Rapid Determination of Intact Sardine Fat by NIRS Using Surface Interactance Fibre Probe. *International Journal of Food Engineering*, 3(6). <https://doi.org/10.2202/1556-3758.1248>
- Wang, S., Dong, D., Li, P., Hua, X., Zheng, N., Sun, S., Hou, S., An, Q., Li, P., Li, Y., Song, X., and Li, X. (2020) Mercury concentration and fatty acid composition in muscle tissue of marine fish species harvested from Liaodong Gulf: An intelligence quotient and coronary heart disease risk assessment. *Science of The Total Environment* 726, 138586

Wilson, R. H., Nadeau, K. P., Jaworski, F. B., Tromberg, B. J., & Durkin, A. J. (2015). Review of short-wave infrared spectroscopy and imaging methods for biological tissue characterization. *Journal of Biomedical Optics*, 20(3), 030901. Accessible a: <https://doi.org/10.1117/1.jbo.20.3.030901>

Wood, J. D., Enser, M., Fisher, A. V., Gute, G. R., Sheard, P. R. i Richardson, R. I. (2008). Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Science*, (78), 343–358.

Zhang, C., Wu, W., Zhou, L., Cheng, H., Ye, X., and He, Y. (2020) Developing deep learning based regression approaches for determination of chemical compositions in dry black goji berries (*Lycium ruthenicum Murr.*) using near-infrared hyperspectral imaging. *Food Chemistry* 319, 126536.

Zhou, J., Wu, X., Chen, Z., You, J., & Xiong, S. (2019). Evaluation of freshness in freshwater fish based on near infrared reflectance spectroscopy and chemometrics. *LWT*, 106, 145-150.

Zhu, F. (2013). Application of visible and near infrared hyperspectral imaging to differentiate between fresh and frozen–thawed fish fillets." *Food and Bioprocess Technology* 6.10 2931-2937.

Zontov, Y., Rodionova, O. Y., Kucheryavskiy, S., & Pomerantsev, A. (2020). PLS-DA – A MATLAB GUI tool for hard and soft approaches to partial least squares discriminant analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 203, 104064. Accessible a: <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2020.104064>