



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería del Diseño

Detección de daños por congelación en limones usando
Espectroscopía de impedancia electroquímica

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Sensores para Aplicaciones Industriales

AUTOR/A: Ochandio Fernández, Adrián

Tutor/a: Laguarda Miró, Nicolás

Cotutor/a: Masot Peris, Rafael

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior de Ingeniería del Diseño

Universitat Politècnica de València

Escuela Técnica Superior de Ingeniería de Diseño

**DETECCIÓN DE DAÑOS POR CONGELACIÓN EN
LIMONES USANDO ESPECTROSCOPIA DE
IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA**

Trabajo Final de Máster

***Máster Universitario en Sensores para Aplicaciones
Industriales***

Alumno:

D. Adrián Ochandio Fernández

Tutores:

D. Nicolás Laguarda Miró

D. Rafael Masot Peris

Septiembre 2022

Abstract: Lemon is the most sensitive citrus fruit to cold. Therefore, it is of capital importance to detect and avoid temperatures that could damage the fruit both when it is still in the tree and in its subsequent commercialization. In order to rapidly identify frost damage in this fruit, a system based on the electrochemical impedance spectroscopy technique (EIS) was used. This system consists of a signal generator device associated with a personal computer (PC) to control the system and a double-needle stainless steel electrode. Tests with a set of fruits both natural and subsequently frozen-thawed allowed us to differentiate the behavior of the impedance value depending on whether the sample had been previously frozen or not by means of a single principal components analysis (PCA) and a partial least squares discriminant analysis (PLS-DA). Artificial neural networks (ANNs) were used to generate a prediction model able to identify the damaged fruits just 24 hours after the cold phenomenon occurred, with sufficient robustness and reliability (CCR = 100%).

Abstract: El limón es el cítrico más sensible al frío. Por lo tanto, es de vital importancia para detectar y evitar temperaturas que puedan dañar el fruto tanto cuando aún está en el árbol como en su posterior comercialización. Con el fin de identificar rápidamente el daño por heladas en esta fruta, se utilizó la técnica de espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS). Este sistema consiste en un dispositivo generador de señales asociado con un ordenador personal (PC) para controlar el sistema y un electrodo de acero inoxidable de doble aguja. Pruebas con un conjunto de frutas tanto al natural como posteriormente congelado-descongelado nos permitió diferenciar el comportamiento del valor de la impedancia en función de si la muestra había sido previamente congelada o no mediante un único análisis de componentes principales (PCA) y un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA). Las redes neuronales artificiales (RNA) se utilizaron para generar un modelo de predicción capaz de identificar los frutos dañados tan solo 24 horas después de la se presentó el fenómeno del frío, con suficiente robustez y confiabilidad (CCR = 100%).

Palabras clave: espectroscopia de impedancia electroquímica; limón; daños por congelación; detección

Keywords: electrochemical impedance spectroscopy; lemon; freeze damage detection

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento al director de presente Trabajo Máster, profesores don Nicolas Laguarda Miró y don Rafael Masot Peris

A mi familia, en especial a mis padres, Eduardo y Carmina, a mi abuela Lilla, a mi hermana Zoraida y a mi cuñado Rubén, por su apoyo y ánimos durante todo este tiempo, además de su ayuda brindada en momentos de duda.

A mis amigos, en especial a Joan Gil, Javier Montoliu y Mario Santana, por sus ánimos, ayuda y consejo.

Pero sobretodo a mi pareja, Tania Gorri, pues sin sus consejos, su paciencia en los momentos tensos, además de todo su apoyo y ayuda, sin ella no habría podido haberlo llevado a buen término. Gracias de todo corazón.

Índice

1. Introducción	
1	
2. Material y programas utilizados	6
2.1. Materia prima y análisis	6
2.2. Aplicación de Software	9
2.3. Equipo electrónico	10
3. Metodología	
12	
3.1. Sistema y Análisis de espectroscopia de impedancia electroquímica	12
3.1.1. Espectroscopía de Impedancia	12
3.1.2. Circuito equivalente Fricke-Morse	13
3.1.3. Muestras realizadas	13
3.2. Tratamiento de datos	14
3.3. Análisis multivariable	14
3.4. ANN	15
4. Resultados	16
4.1. Resultados de Espectroscopía de impedancia	16
4.2. Resultados del análisis Multivariable	17
4.3. Resultados ANN	18
5. Conclusiones	19
6. Bibliografía Consultada	21

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los cultivos cítricos más destacados en el mundo es el limón, del cual se produjeron casi 16 millones de toneladas en el 2016, representando esto el 12,2% de la producción de cítricos a nivel mundial. España es el sexto país en cuanto a producción de este fruto, con 950 mil toneladas, y el segundo a nivel de exportación, dedicando dos terceras partes de su producción en la exportación, siendo solo superado por China [1]. Por lo que las actividades de cultivo, postcosecha y comercialización del limón son muy importantes estratégicamente en España.

España exporta toneladas de limones cada año a lugares como: Estados Unidos, Países Bajos, Rusia, Alemania, Francia e Irak. Siendo España, México y Argentina los principales exportadores de limones frescos, representando el 27 por ciento del consumo mundial. Sin embargo, la producción y exportación de limón presenta un serio problema relacionado directamente con el daño por congelamiento [2,3] Teniendo en cuenta que el valor del limón en 2022 y 2023 se estima que va a ser de entre 0,50€ y 0,60€ céntimos por Kilo, el valor monetario que se pierde por congelamiento exportando miles de toneladas al año, es muy significativa para el sector agrario.

La variedad más extendida en España presenta un intenso color amarillo, el limonero Verna, normalmente presenta dos floraciones al año, aunque en ocasiones puntuales se amplía hasta tres, ocurriendo estas en primavera y verano principalmente.

Para que las cosechas resulten saludables hay que tener en cuenta el limonero, la zona de cultivo y las condiciones climatológicas habituales de la plantación. El limón es una planta exigente en cuestiones de drenaje de suelo, favoreciendo así la aparición de enfermedades en la planta como la Gonmosis de los Cítricos. Esta se presenta cuando el suelo hay excesiva humedad, el suelo no drena bien el agua y se forman estas condiciones idóneas para la aparición de este patógeno que lleva a la muerte directa del árbol.

Las condiciones idóneas para los limoneros es que el clima cuente con precipitaciones repartidas a lo largo de todo el año, así se reduce la necesidad de riego y la aparición del patógeno mencionado anteriormente. Otro problema que puede darse es la antracnosis que impiden la producción de la cosecha aun que el árbol tenga buena floración. Por eso ha de haber cierta separación entre los árboles para evitar la propagación de la enfermedad.

Periódicamente, la región mediterránea (lugar en el que se produce la mayor parte del limón español) experimenta fenómenos climáticos adversos que provocan noches heladas. Además, una gestión inadecuada del almacenamiento refrigerado también puede dar lugar a la congelación. Ambos casos generan una pérdida en la calidad y potencial comercialización de los frutos cítricos [4,5,6]

El daño por congelación en limones aparece por lo general cuando las temperaturas descienden entre -0,8 y -1,4 °C, ya que el limón es el cítrico más sensible a la congelación [7,8] Sin embargo, las consecuencias del enfriamiento pueden variar según la intensidad y la duración del episodio de congelación y otros factores bioclimáticos [9].

La congelación puede afectar de muchas maneras. Una de ellas es que los vegetales, al estar expuestos al frío, como carecen de sistemas de autorregulación de temperatura, reducen la velocidad en la que respiran y hacen la fotosíntesis, además de que aumenta la microviscosidad de la matriz lipídica y la rigidez de las membranas, adquiriendo una estructura gel cristalina.[4]

Por ejemplo, para un fruto que aún no se ha desprendido del árbol, otras heridas por congelación habituales son la decoloración interna, el oscurecimiento del flavedo y el albedo, las picaduras y lesiones en la corteza y los tejidos empapados de agua [18]



Figura 1: "https://www.tecnicoagricola.es/categoria/calidad_en_citricos/10-frigoconservacion/"

Si la congelación es rápida, aparecen cristales de hielo tanto en los intersticios entre las células como en su interior, rompiendo así la estructura y provocando la muerte de las células, provocando necrosis en el tejido afectado e imposibilidad de cualquier tipo de recuperación. Por otro lado, si la congelación es lo suficientemente lenta, el agua intercelular comienza a congelarse de manera que las células no se ven afectadas inicialmente. Si el fenómeno persiste, se producirá una deshidratación progresiva de la célula por pérdida de agua hacia el intersticial, llegando al equilibrio osmótico entre líquidos en la parte interna y externa de las células.

Este proceso, si es demasiado exigente para la célula, puede conducir a la muerte, pero solo si excede su capacidad de producir agua sin perecer. Además, descongelar después de la congelación puede conducir a la supervivencia de las células vivas si es lo suficientemente lento. Sin embargo, si es demasiado rápido, también puede provocar deshidratación y muerte celular por transpiración [9,10].

En esencia, el proceso que sufre el limón cuando llega a su temperatura crítica de congelación es el siguiente: el agua en el limón comienza a congelarse, tanto el agua intersticial como la del interior de las células. Según la velocidad e intensidad de la congelación, el líquido intracelular permitirá que las células se recuperen al descongelarse, en caso de ser más intenso, los cristales de hielo de mayor tamaño provocarán la ruptura de la pared celular y la muerte definitiva de la célula.

Estos problemas y enfermedades causadas por el frío se llaman: daños por el frío (DF), suelen darse por temperaturas que rondan los -0.5°C y unos 15°C . Curiosamente, se pensaba que solamente era un problema puntual en zonas tropicales, pero tras realizar varias investigaciones, se observó que había factores en común: eran especies con un metabolismo muy activo, una elevada tasa respiratoria y eran proclives a sufrir DF. Cada especie tenía sus propios rangos de temperaturas, no obstante, para las especies poco sensibles y de clima templado su temperatura crítica oscilaba entre los $-0,5^{\circ}\text{C}$ y los 7°C [4]

Adicionalmente, algunos autores han identificado efectos específicos de la congelación en limones como la pérdida de textura y apariencia empapada, la interrupción del metabolismo normal de la fruta [11,12], la liberación de enzimas, cambios en color, olor, sabor y valor nutritivo [13], picaduras, manchas en la corteza, manchas rojas y necrosis en el flavedo [14]. Algunos de estos efectos son fácilmente detectables, pero otros no son aparentes ni inmediatos, por lo que son difíciles de identificar.

Cuando se habla por ejemplo de apariencia empapada nos referimos la enfermedad de la antracnosis, esta puede variar bastante según la especie de hongo y la planta, pero las hojas tiernas son por lo general las que se ven más afectadas. La apariencia empapada son unas manchas de apariencia de mojada en el follaje o los frutos son los primeros indicios visibles. Esto significa que el tejido de las hojas muere, adquiriendo una textura de papel y un color marrón a medida que la enfermedad se propaga.

En los frutos que están creciendo en el árbol se ven afectados y se acaban marchitando o muriendo junto con la planta. Esto por ejemplo es detectable a simple vista y solucionable. Sin embargo, cuando no vemos patologías aparentes y el limón es consumido estando enfermo, puede afectar a la salud de la persona que lo a ingerido que no se dará cuenta hasta que lo huela o lo ingiera.

Un estrés severo por choque de frío produce daños de forma muy rápida y sus consecuencias son fatales, irremediables o letales sin que se llegue a producir una congelación de tejidos evidente a simple vista. Se distinguen los daños primarios sobre las biomembranas vegetales y los verdaderos daños que suceden como consecuencia de desviaciones del metabolismo, una vez superada la fase de latencia.[4]

Con el fin de resolver este problema, se han desarrollado varios métodos para la detección y control de daños por congelación en frutas cítricas. Estos métodos son diversos, desde los más simples, basados en la inspección visual de la fruta [15], hasta técnicas físicas como la separación de la fruta por densidad (flotación) [16], detección de etanol [5], sensores de visión [17,18], cromatografía de gases-masa [19], fluorescencia [6] o resonancia magnética nuclear [20].

También existen tratamientos químicos que suelen ser descartados, pues el consumidor final muestra una clara preocupación por los residuos que pueden quedar en los limones y que además podrían ser nocivos para el hombre o el medio ambiente. [4]

Existen también tratamientos de carácter térmico como: retrasar el enfriamiento o el acondicionamiento térmico, el calentamiento intermitente entre otros que no son tan conocidos. Aunque estos se ven muy limitados por la situación en la que se encuentra el limón físicamente y su variedad. [4]

La limitante de estos métodos es que estos son en su mayoría técnicas de laboratorio que tienen requisitos específicos en términos de instrumentos, personal, tiempo, muestreo y pruebas, lo que los vuelve comparativamente menos ágiles con respecto a la espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS).

Por el contrario, la EIS, combinado con un adecuado tratamiento estadístico de datos, es una técnica sencilla, económica, inmediata, on-line y robusta [21,22]. La espectroscopia de impedancia [23] es un método para caracterizar las propiedades eléctricas de los materiales y sus interfaces utilizando electrodos. Esta técnica consiste en aplicar un estímulo eléctrico a los electrodos, observar la respuesta y determinar sus propiedades, interacciones y dependencias con determinados factores.

La respuesta eléctrica puede variar sustancialmente según las cargas (iones libres), la microestructura y la naturaleza de la muestra y la geometría y las propiedades de los electrodos. Como la impedancia eléctrica es una propiedad intrínseca correlacionada con la estructura interna de las muestras, las medidas EIS [24] determinan o infieren información sobre las mismas siempre que el evento en análisis presente un cambio en su comportamiento eléctrico.

De hecho, EIS ya se ha utilizado con éxito en el campo de la tecnología alimentaria, particularmente en el control de calidad de varios parámetros de frutas y verduras [25,26] como plátanos [27], kiwis [28], mangos [29], berenjenas [24], tomates [30], zanahorias [31,32] patatas [33], productos manufacturados [34] y su valorización de residuos [35,36]. También es utilizada en la: carne, pescado, miel y productos procesados, así como en cuanto a detección de plaguicidas y valorización de residuos agroalimentarios.

Conociendo el valor de la impedancia de las muestras y los procesos que han experimentado, mediante técnicas de análisis multivariado se pueden obtener modelos estadísticos de predicción que posteriormente se pueden utilizar para predecir las propiedades de nuevas muestras a partir de sus correspondientes medidas de impedancia. Dado que EIS genera una gran cantidad de datos por prueba, se necesita una poderosa herramienta estadística para garantizar resultados confiables.

En consecuencia, en una primera fase se ha utilizado el análisis de componentes principales (PCA) y el de mínimos cuadrados parciales (PLS), que hasta el momento han dado resultados muy satisfactorios al trabajar con este tipo de datos [37,38,39].

Se seleccionó un análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales, ya que había una gran cantidad de datos por muestra, y estos estaban claramente organizados en grupos en función de sus diferentes respuestas electroquímicas [25,40].

A continuación, se utilizaron redes neuronales artificiales (ANN) para mejorar los métodos antes mencionados, ya que son muy flexibles y adaptables, se ajustan fácilmente a sistemas no lineales y pueden aprender de sus propios errores [41,42].

Las ANN también son fáciles de usar, claras y fáciles de implementar en una computadora personal (PC), ya que también tienen requisitos computacionales bajos. De hecho, la aplicación potencial de ANN que se pueden implementar en un microprocesador para crear un dispositivo de detección portátil que podría usarse en el campo para la detección de daños por congelamiento in situ fue de particular interés para este estudio.

En consecuencia, y atendiendo a la experiencia preliminar en este campo [25], el objetivo de este estudio fue determinar la capacidad de un sistema que combina el análisis EIS mediante el uso de un sensor específico y una herramienta de tratamiento de datos (ANN) adecuada para detectar daños por congelamiento. en limones de una forma rápida, fácil, económica y fiable.

2. MATERIAL Y PROGRAMAS UTILIZADOS

2.1 MATERIA PRIMA Y ANÁLISIS:

Los limones fueron seleccionados en base a sus aspectos físicos, variedad, origen, tamaño y maduración, y la ausencia de daños o lesiones; intentamos obtener una serie de muestras lo más homogéneas posible según su origen natural [43]. Una vez en el laboratorio, los frutos fueron lavados, secados y mantenidos a temperatura ambiente para ser posteriormente sometidos a las pruebas correspondientes.

En el caso específico de los ensayos con limones congelados, las frutas se expusieron primero con unas condiciones controladas para conseguir así, a una simulación nocturna de congelación en laboratorio introduciéndolas en un congelador (LIEBHERR Modelo GGU 1500 Premium, Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, Alemania) el tiempo suficiente para alcanzar y superar ligeramente la temperatura de congelación de la fruta. Luego, de la estabilización de la temperatura del producto por al menos 12 horas, se volvieron a ensayar siguiendo el mismo protocolo [25].

A la hora de trabajar con el fruto lo primero era medir su temperatura interna, para asegurarnos de que se encontraba en buenas condiciones para su análisis. Esta comprobación se hacía mediante un polímetro ajustado para que midiera la temperatura clavando un filamento de metal en el interior del limón.

A la hora de las tomar mediciones, lo realizábamos con tres tipos de ensayos diferentes sobre el limón. El primero sin modificar la fruta, se introducía el sensor atravesando la piel haciéndolo en un solo gajo.

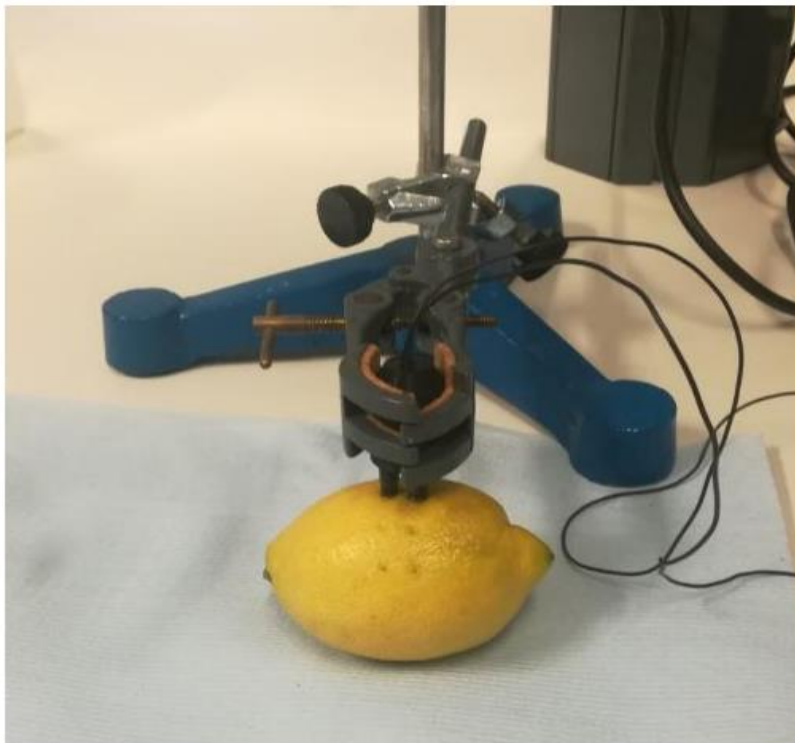


Figura 2: Propia. Análisis espectroscopia con piel.

El segundo y tercer ensayo se realizaba pelando el fruto de forma parcial, en el segundo el sensor se colocaba sobre un gajo sin piel, mientras que el tercero el sensor se colocaba con cada punta de un gajo diferente.

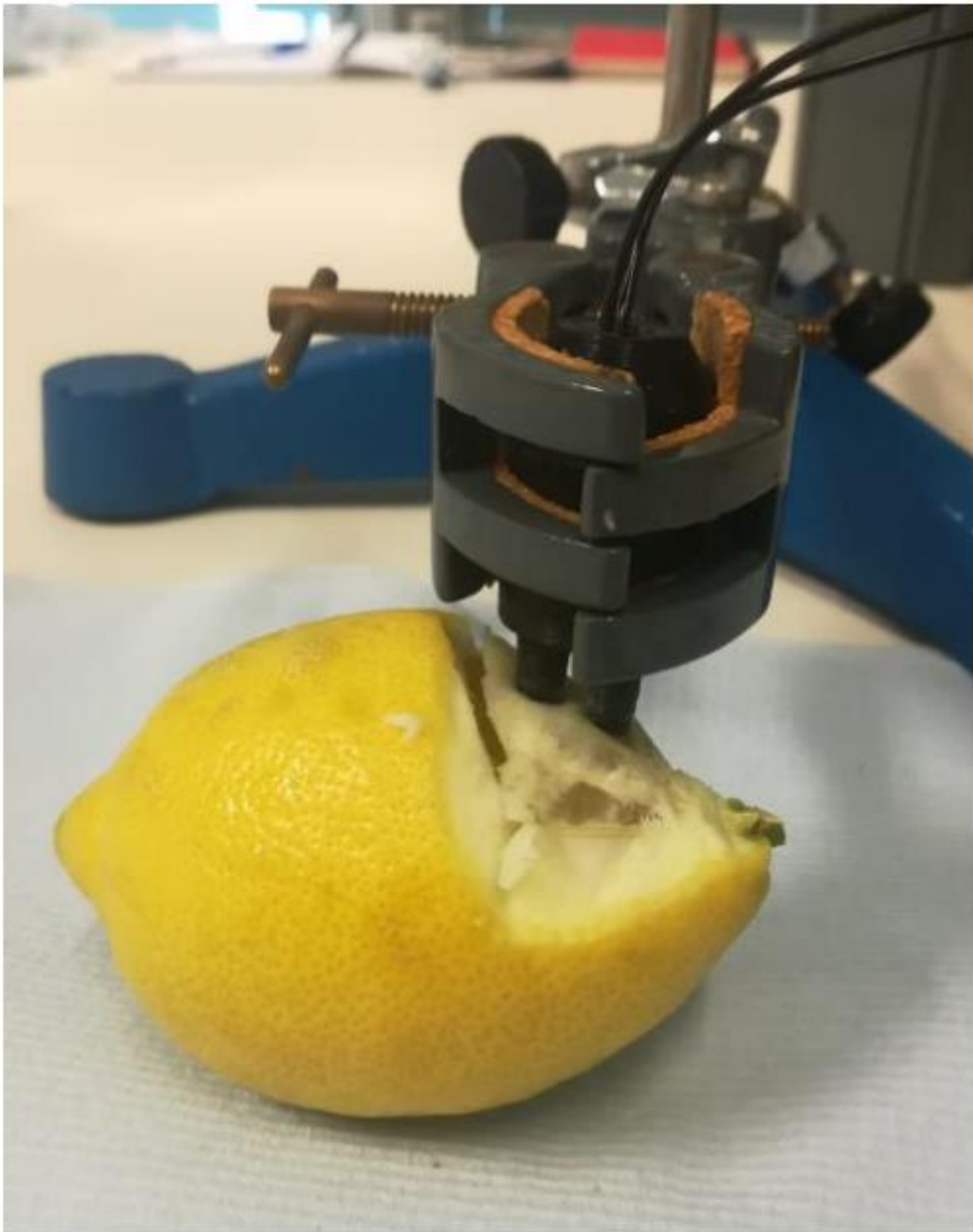


Figura 3: Propia. Análisis espectroscopia entre 1 gajos.

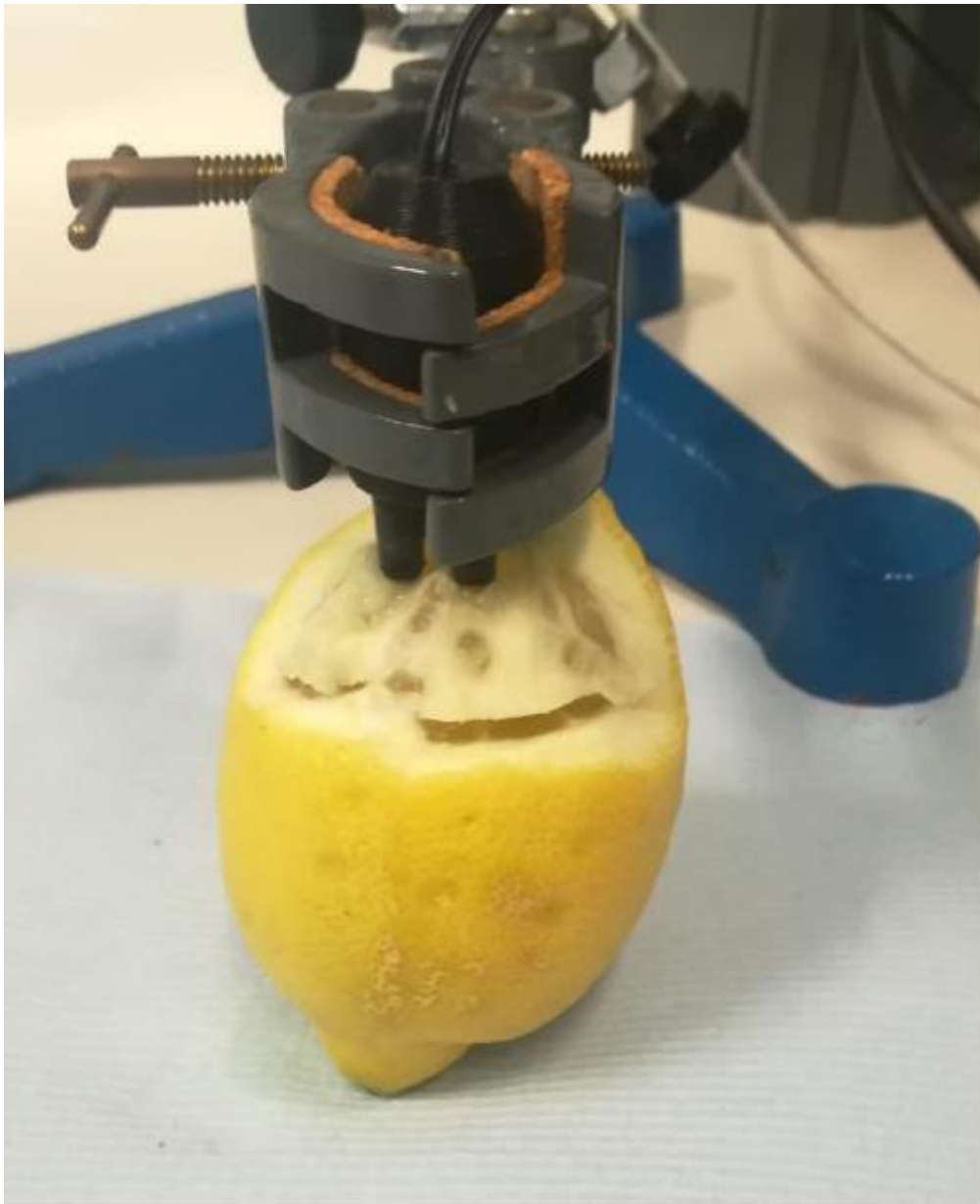


Figura 4: Propia. Análisis espectroscopia entre 2 gajos

Usábamos una mitad antes de congelarlo y la otra mitad se quedaba perfecta para una vez hubiera sido congelada. De esta forma evitábamos que las primeras mediciones pudieran interceder con el ensayo posterior. Todo esto sin partir el limón físicamente.

La metodología empleada es la misma tanto si el fruto ya se había congelado como si no, la única variación en estos es la delicadeza con al que tratar el fruto, pues una vez congelados los frutos pierden parte de su integridad volviéndolos un poco más sensibles a la presión.

2.2 APLICACIÓN DE SOFTWARE

Mediante la aplicación de software se realizó un barrido de frecuencias para obtener el módulo de impedancia y la fase de la muestra. El usuario establecía el rango de frecuencia y la amplitud de las señales sinusoidales aplicadas a los electrodos.

Para cada una de las frecuencias, la aplicación calculaba la evolución temporal de la señal y enviaba esta información (junto con el resto de los datos necesarios para generar la señal) al equipo electrónico a través de un puerto USB. Luego, con los datos de respuesta del equipo electrónico, la aplicación de software determinó la amplitud y la fase de las señales de tensión y corriente a través de una DFT.

A partir de estos datos, la aplicación de software calculó el módulo y la fase de la impedancia de muestra para la frecuencia actual. Luego, la aplicación almacenaba el resultado de la medición en un archivo y repetía el mismo proceso para el resto de las frecuencias. Las especificaciones del sistema de medición EIS se muestran en la Tabla 1.

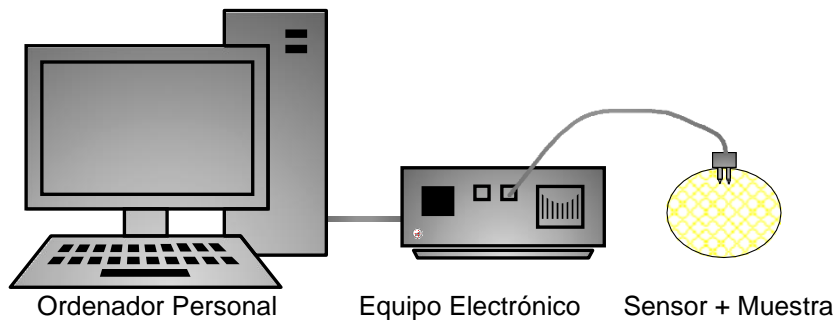


Figura 5: Sistema de Espectroscopía de Impedancia.

Parameter	Specifications
Frequency range	1 Hz-1 MHz
Signal amplitude	Up to 500 mV
Type of signal	Sinusoidal
Impedance calculation	Discrete Fourier Transform
Measured parameters	Current and Voltage
Output data	Modulus and phase of the impedance
Data set per assay	Up to 100 data (50 for modulus and 50 for phase)

Tabla 1. Especificaciones sobre la espectroscopía de impedancia (EIS) Sistema de medida

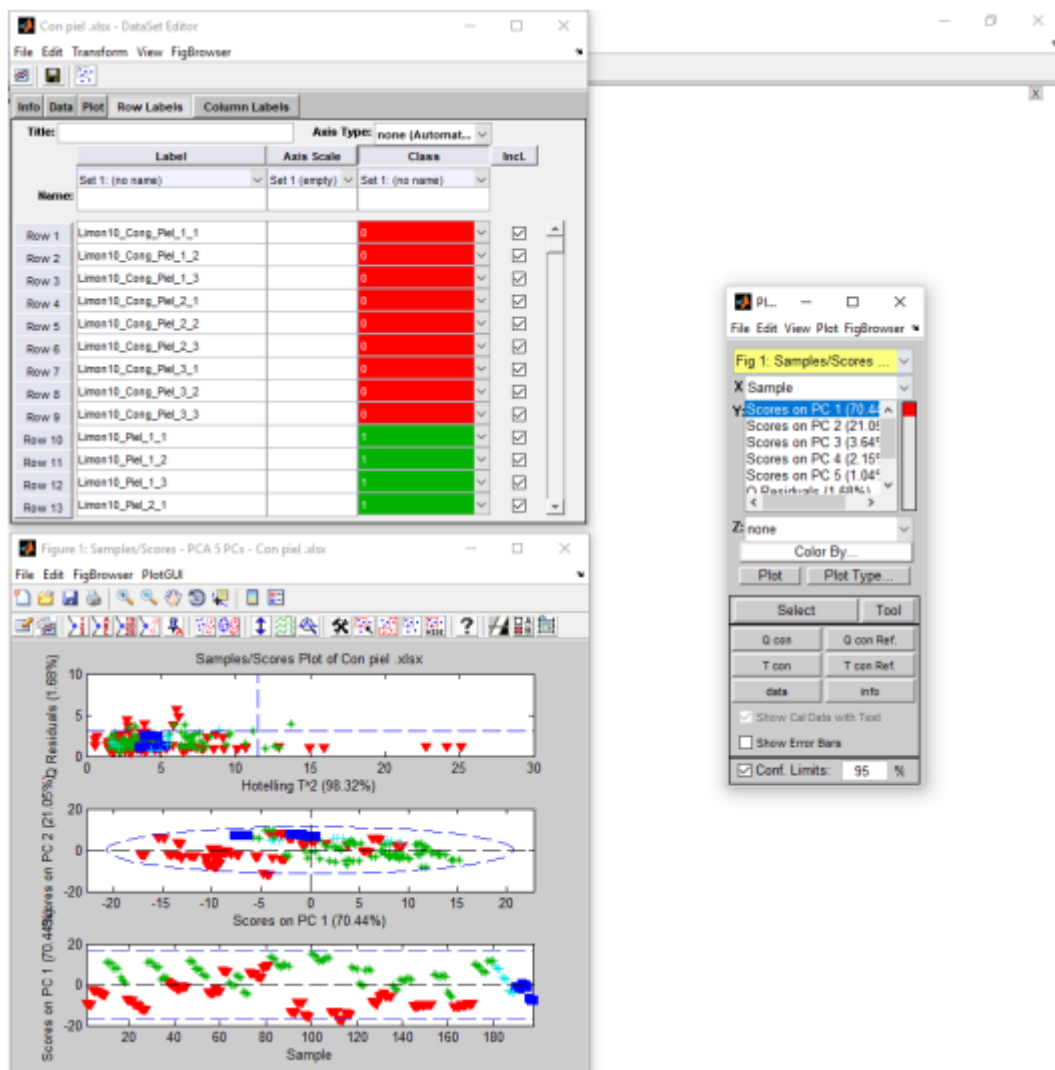


Figura 6: Propia. Interfaz del programa para trabajar con los datos introducidos.

2.3 EQUIPO ELECTRÓNICO

El sistema consta de una aplicación de software que se ejecuta en un PC y un equipo electrónico. La aplicación realiza un barrido de frecuencias con el que obtiene el módulo de impedancia y la fase del dispositivo bajo prueba (DUT) para un rango configurado de frecuencias. El usuario establece el rango de frecuencia y la amplitud de las señales sinusoidales aplicado al electrodo. Para cada una de las frecuencias la aplicación calcula 256 puntos correspondientes a la señal temporal evolución y envía esta información (junto con el resto de los datos necesarios para generar la señal) al equipo electrónico a través de un puerto RS-232.

El equipo electrónico recibe la información enviada por el ordenador y genera la forma de onda sinusoidal. Se muestrean las señales de voltaje en el electrodo y se recolectan las muestras que se envían al PC (256 puntos para el voltaje y 256 puntos para la corriente).

El ordenador recolecta las muestras y realiza un análisis de Fourier (DFT) para determinar la amplitud y la fase de las señales de voltaje y corriente en el electrodo. A partir de estos datos, la aplicación de software calcula el módulo y la fase del DUT impedancia para la frecuencia actual. Entonces la aplicación almacena el resultado de la medición en un archivo y repite el mismo proceso para el resto de las frecuencias.

El equipo electrónico incluye un bloque digital, un DAC de 10 bits convertidor, dos convertidores ADC de 8 bits y varios circuitos de conversión de señales analógicas. El bloque digital integra 2 CPLD's y tres memorias RAM estáticas de 2 kB. El primero CPLD (Altera EPM7160SLC84) junto con una de las memorias RAM se encargan del proceso de recepción de los datos enviados por el PC y la generación de la señal. El CPLD recibe datos a través de un interfaz UART interna y los almacena en la RAM externa. Cuando se reciben todos los datos correspondientes a la señal, el CPLD los envía al conversor DAC con una tasa que cumple con la señal requisitos de frecuencia.

El CPLD repite constantemente los datos almacenados hasta que recibe desde el PC una orden de paro. La señal de la salida DAC se ajusta en voltaje y se amplifica en corriente y aplicado al electrodo. Paralelamente, el segundo CPLD (Altera EPM7160SLC84) muestra las señales correspondientes al voltaje aplicado al electrodo y la corriente que circula por él. Las muestras se almacenan en cada una de las dos memorias RAM estáticas. Una vez que un ciclo completo de la señal ha sido muestreado, los valores de las muestras se transmiten al ordenador. Los bloques de adaptación de señal se han implementado con amplia amplificadores operacionales de ancho de banda. Para la implementación del bloque de medición de corriente se utilizó una configuración de Auto-Balancing-Bridge para reducir los efectos de las altas frecuencias en la medición.

Los dos CPLD trabajan a una frecuencia de 25 MHz, por lo que la frecuencia máxima para la generación de la señal y el muestreo es 25.000.000 pulsos por segundo. Por lo tanto, señales sinusoidales de 1MHZ se implementan con 25 pulsos por ciclo.

El sistema de medida electrónico fue diseñado por el Grupo de Desarrollo Electrónico y Sensores Impresos (GED y PS) del Instituto Interuniversitario de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM) de la Universitat Politècnica de València (UPV) [45].

3. METODOLOGÍA

3.1 SISTEMA Y ANÁLISIS DE ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA

3.1.1 Espectroscopia de impedancia

La técnica de medición escogida y utilizada fue la espectroscopia de impedancia de dos electrodos (Figura 7a). Esta técnica consiste en aplicar una diferencia de potencial entre dos electrodos y medir la corriente a través de ellos para encontrar la impedancia electrodo-muestra-electrodo. Los electrodos utilizados son agujas de acero inoxidable. El material tiene una alta resistencia a la corrosión y se usa ampliamente en aplicaciones de contacto con alimentos [44].

Además, la resistencia de los electrodos es muy pequeña ($\sim 3 \text{ m}\Omega$), del orden de un millón de veces menor que la resistencia de la muestra, por lo que la parte resistiva de la impedancia medida es prácticamente la resistencia de la muestra. Los electrodos se conectaron a dos cables alojados en un marco de resina epoxi (Figura 7b).

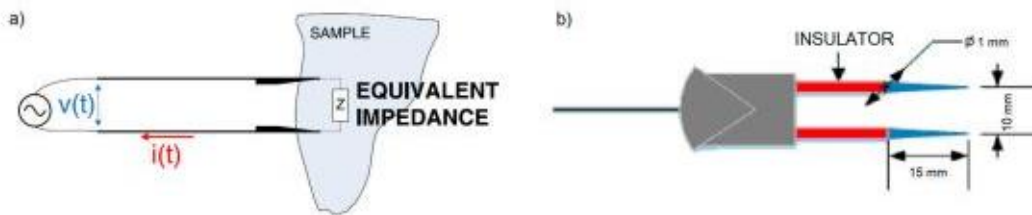


Figura 7: Esquemas de (a) la técnica de medición de dos electrodos aplicada y (b) los electrodos de acero inoxidable utilizados en los ensayos.



Figura 8: Sensor de doble aguja de acero inoxidable

El sistema consistió en un equipo electrónico y una aplicación de software que se ejecutaba en un PC (Figura 5). Se aplicaron a la muestra señales eléctricas alternas sinusoidales con diferentes frecuencias y se midió la respuesta de corriente para cada una de las frecuencias.

Luego, el sistema calculó el espectro de impedancia de la muestra por medio de la Transformada Discreta de Fourier (DFT) y lo mostró en pantalla. Los parámetros del sistema (amplitud de la señal, rango de frecuencia, escala de corriente, etc.) fueron configurados por el usuario a través de la interfaz gráfica de usuario. El sistema EIS se dividió en dos partes claramente diferenciadas.

La finalidad de la espectroscopia de impedancias es la obtención de la gráfica entre el módulo t fase de la conductividad del material, obteniendo a partir de esta las variaciones de impedancia que se producen en función de la frecuencia. En este

caso, el análisis de la variación de impedancia de los limones antes y después de ser congelados.

Una vez congelado el fruto tanto la conductividad como los condensadores formados cambiarían, puesto que las células del limón se romperían por el frío cambiando así su impedancia. Con esto, los condensadores variarían también su valor al verse modificados.

3.1.2 Circuito Equivalente Fricke-Morse.

En 1925, Fricke-Morse [55] introdujo un circuito eléctrico equivalente para materiales biológicos (Figura 9) que se ha utilizado ampliamente en el análisis de impedancia bioeléctrica y otras aplicaciones como como tecnología alimentaria [22,31,56].

Las principales ventajas del modelo de Fricke son su simplicidad y directa interpretación física. En este modelo, las células se representan mediante tres elementos: R_e (resistencia de líquido extracelular), R_i (resistencia del líquido intracelular) y C_m (componente capacitivo de la membrana celular) [57].

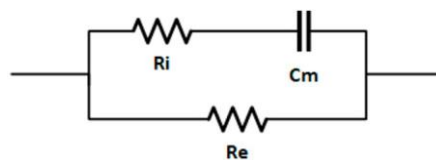


Figura 9: Modelo eléctrico de tejido biológico de Fricke.

3.1.3 Muestras analizadas.

Las muestras se prepararon previamente como se describe en la Sección 2.1. Luego, se seleccionaron diez frutos, y se llevaron a cabo análisis EIS. Para ello, se probó cada limón de tres formas diferentes, realizando tres repeticiones y tres iteraciones por ensayo, teniendo un total de 27 ensayos por fruto. El primero tipo de ensayos se realizó con limones sin alterar, pinchando el sensor directamente en la piel.

Los segundos se realizaron después de pelar una parte de la fruta y pinchar el sensor en un solo segmento. Finalmente, el tercer tipo de ensayos se realizó pinchando cada aguja (electrodo) del sensor en un segmento diferente, dejando las membranas de los segmentos (separación entre segmentos) en el medio.

La idea de realizar estos tres tipos diferentes de pruebas era determinar qué parte de la fruta experimentó los cambios más significativos en términos de respuesta electroquímica a la helada fenómeno. En términos simples, esto nos permitió saber qué parte del limón era la más sensible a la congelación.

Se diseñó un protocolo específico para las pruebas de espectroscopia de impedancia. Era el siguiente: En primer lugar, se verificó que todo el sistema (dispositivo de medición y PC) estaba encendido, conectado y funcionando correctamente.

Luego, se midió la temperatura de la fruta utilizando un multímetro (FLUKE 16 Multímetro, FLUKE, Everett, WA, EE. UU.). A continuación, se perforó el sensor en

la fruta en el lugar apropiado. para el tipo de prueba a realizar. Posteriormente, la prueba se preparó activando el software.

Luego, el sistema recibió la orden de generar una señal eléctrica específica que fue transmitida a la fruta a través del sensor. La respuesta también se recolectó del sensor y llegó a la PC donde se mostró en la pantalla y se almacenó para el procesamiento posterior de los datos. Luego se limpió el sensor y secado para dejarlo listo para la próxima prueba.

3.2 TRATAMIENTO DE DATOS

Una vez terminados los análisis de todas las muestras, era momento de volcar los datos en dos Excel diferentes El total de datos es de 59.400 teniendo 19.800 datos de cada tipo de análisis, obteniendo 5.400 valores de cada limón ya que realizamos 27 interacciones antes de congelarlo, y 27 después de haberlo congelado, obtenemos así 100 resultados de cada interacción.

Los datos fueron divididos en tres hojas de Excel, en la primera tendremos los valores obtenidos de los limones, en la segunda los nombres que le pondremos a cada fila de datos y en la última los marcaremos con valores de 0 y 1, donde 0 es para los limones antes de ser congelados y con el 1 para los que ya han sido congelados.

Dado que la respuesta para cada prueba EIS realizada consistió en un total de 100 datos (50 módulos de valores y valores de fase 50), el volumen de datos a trabajar era muy alto. Así, un adecuado método de procesamiento de datos era esencial.

3.3 ANÁLISIS MULTIVARIABLE

Se realizó un análisis multivariante de los datos recogidos. Para ello, se hizo un PCA preliminarmente con el fin de comprobar si los datos obtenidos tendían a agruparse de forma natural, mostrando diferencias entre los limones naturales y los previamente congelados.

A continuación, se realizó un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) de los datos para discriminar las muestras analizadas e identificar si hubo diferencias significativas entre ellas con respecto a las variables obtenidas. El PLS-DA es un análisis de regresión en el que la variable dependiente es categórica, que es la clase a la que pertenecen las muestras [46], y las variables independientes son los 100 datos obtenidos por análisis (50 valores de módulo y 50 valores de fase). La particularidad en esta metodología es que se utilizan nuevos valores independientes para probar el modelo. Así, el 67% de los datos se usó para la calibración, y el 33% restante del conjunto de datos se usó para probar el modelo [47].

La precisión del modelo obtenido se analizó mediante el coeficiente de determinación (R^2) y la raíz errores cuadráticos medios de validación cruzada y predicción (RMSCV y RMSEP). Los análisis PCA y PLS-DA se realizaron utilizando el software SOLO© (Eigenvector Research, Indiana, Manson, WA, EE. UU.)

3.4 ANN

Alternativamente, se realizó un estudio para detectar la posibilidad de modelar la electroquímica respuesta de los frutos por medio de ANNs, ya que este tipo de redes además es fácil de usar, clara y fácilmente implementable en una PC porque también tiene bajos requisitos computacionales. De hecho, el potencial La implementación de ANN en un microprocesador fue de particular interés en este estudio. Así, un portátil dispositivo para análisis in situ podría detectar daños por congelación en las frutas cuando aún están en los campos, cumpliendo así con todos los requisitos de baja potencia, fácil manejo y fiabilidad.

En realidad, este tipo de desarrollo [48] ya se ha aplicado con éxito utilizando ANN simplificadas, [49,50] que son aún más simple, computacionalmente menos exigente, rápido de programar, fácil de usar y muy confiable [51]. El objetivo era trabajar con un sistema de predicción más flexible, adaptable y versátil que los métodos tradicionales de tratamiento de datos estadísticos [52,53].

Fue particularmente interesante teniendo en cuenta que las muestras eran frutas naturales que estaban sujetas a un amplio conjunto de variables que podrían haber generado mayor o menor diversidad entre ellos a pesar de pertenecer a la misma especie y al mismo lote (madurez, acidez, contenido de azúcar, tamaño, tiempo de recolección, etc.).

El tipo y la estructura de la ANN se fijaron preliminarmente mediante un conjunto de ensayos iniciales. Entonces, un estudio más profundo nos permitió seleccionar una arquitectura específica de la red (capas y neuronas en cada capa) y también las funciones a aplicar en cada neurona y los algoritmos a trabajar dentro de las capas. Los datos para estos estudios se dividieron apropiadamente al azar en tres conjuntos de datos diferentes para ser utilizados en los diferentes pasos del diseño de ANN:

Entrenamiento (70%), validación (15%) y prueba (15%). La primera etapa (capacitación) nos permitió utilizar el modelo ANN para las fases de validación y prueba, evaluando respectivamente el modelo obtenido utilizando tanto datos previamente utilizados en la fase de entrenamiento como datos independientes.

Además, como el sobreajuste es un problema probado en los modelos de predicción basados en ANN, una proporción se seleccionó en la estructura de la red, y se utilizaron la validación cruzada y la detención anticipada al entrenar el modelo [54]. En este caso específico, la precisión de la ANN obtenida se expresó en términos de la tasa de clasificación correcta (CCR%) y la matriz de confusión asociada.

El modelado de ANN se realizó utilizando el software Alyuda Neurointelligence 2.2 © (Alyuda Research Inc., Cupertino, CA, EE. UU.)

4. RESULTADOS

4.1 RESULTADOS DE LA ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA

Una vez que se completó la prueba EIS, se recolectaron 27,000 datos en total (27 pruebas/muestra 10 muestras 100 datos/prueba). Este conjunto de datos fue almacenado apropiadamente en la PC y mostrado gráficamente por el software, permitiéndonos crear figuras como las que se muestran en la Figura 10, que representan tanto la fase como el módulo de la impedancia para las muestras seleccionadas.

Los gráficos que muestran los diagramas de Nyquist fueron también disponibles en la interfaz gráfica del software

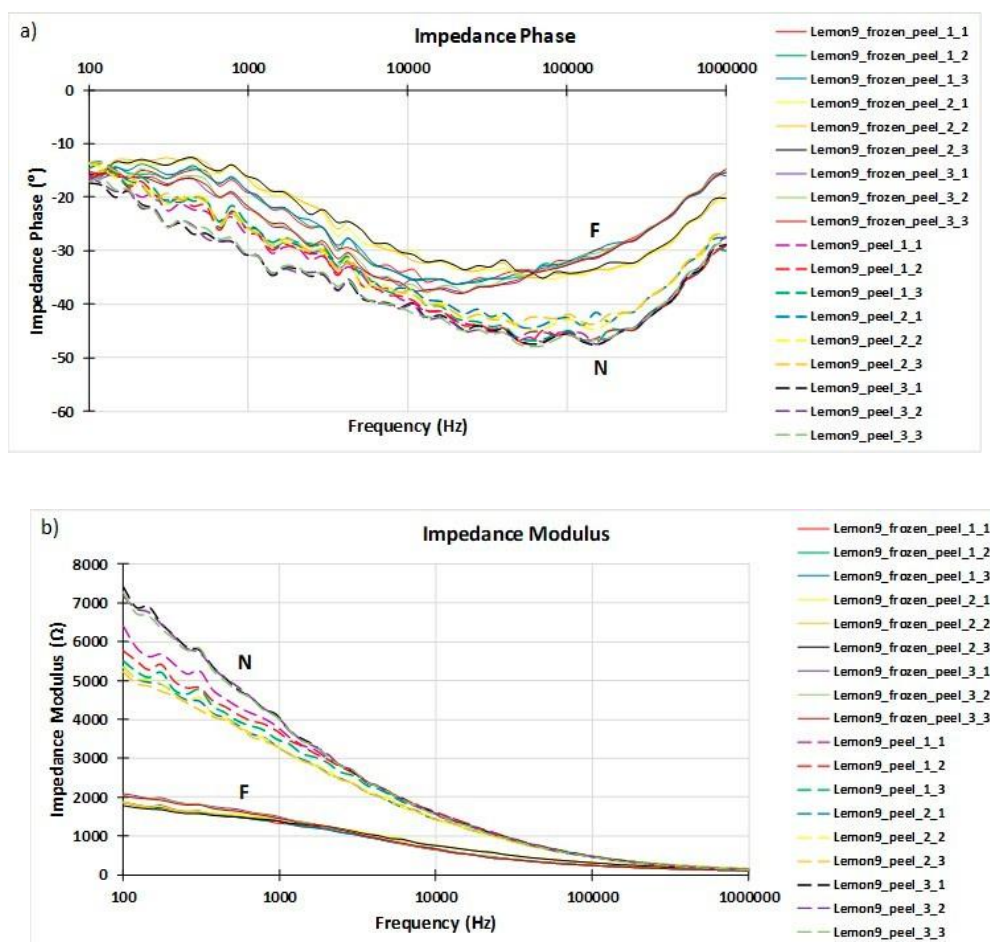


Figura 10: (a) Fase y (b) módulo de los análisis EIS para el limón número 9 tanto natural (N) como 12 h después de la congelación (F) utilizando el sensor pinchado directamente en la cáscara.

Los resultados obtenidos responden a este comportamiento debido a que la congelación cambia la estructura interna de los materiales biológicos al romper las membranas celulares y, por ende, la impedancia de los materiales. En el modelo de Fricke, esta impedancia se muestra de forma doble. En primer lugar, se manifiesta en la reducción de los componentes capacitivos, como se puede observar en la disminución del valor absoluto de la fase de impedancia (Figura 10a) debido a la ruptura de la propia membrana celular.

En segundo lugar, se muestra en la disminución del módulo de impedancia (Figura 10b) debido al aumento de la conductividad sobre el líquido extracelular generado por la liberación de líquido intracelular que altera la concentración salina tras el colapso de las células.

En general, este comportamiento se observó en todas las muestras analizadas; fue más evidente en aquellos en los que se superó el umbral de temperatura de congelación, y aumentó drásticamente en aquellos casos en los que la temperatura de congelación fue algo más severa.

4.2 RESULTADOS DEL ANÁLISIS MULTIVARIABLE

Un estudio PCA de los datos EIS obtenidos nos permitió discriminar claramente las muestras según su comportamiento electroquímico (Figura 11).

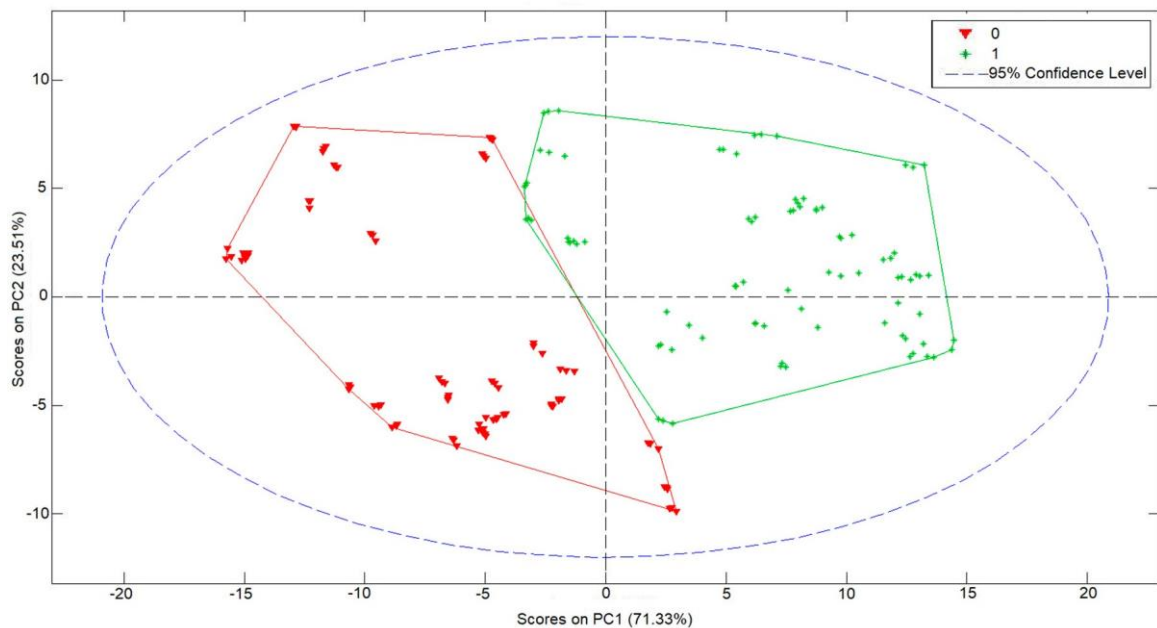


Figura 11: Análisis de componentes principales (PCA) para los limones estudiados considerando datos entre dos secciones. La clase 0 (roja) representa muestras congeladas. La clase 1 (verde) representa los naturales.

Este PCA fue capaz de explicar hasta un 71,33% de la varianza con una sola variable latente de componente principal y un 23,51% adicional si se añadía una segunda. Esto significa que el modelo fue capaz de explicar hasta un 94,84% con solo dos variables latentes de componentes principales.

Posteriormente se realizó un análisis PLS con el fin de obtener un modelo capaz de detectar los fenómenos de congelación en estas muestras.

Así, se utilizó específicamente un PLS-DA, y los resultados obtenidos permitieron comprobar que es posible clasificar las muestras de limón en dos grupos diferentes (natural y previamente congelado), ya que el modelo mostró una alta sensibilidad tanto para la fase de calibración como para la de predicción (Figura 12).

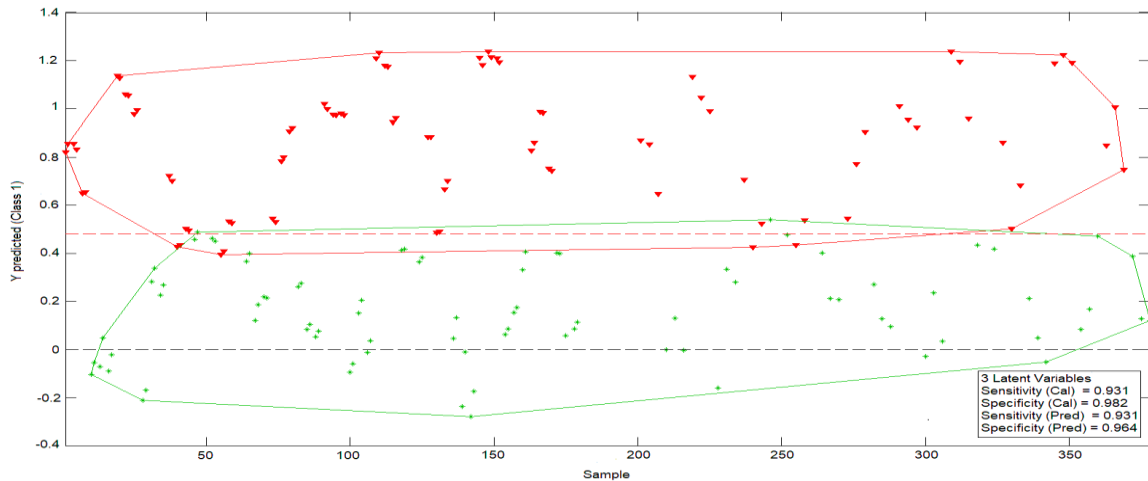


Figura 12: Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) para el mismo conjunto de datos. Clase 0 (rojo): Muestras congeladas. Clase 1 (verde): Muestras naturales.

4.3 RESULTADOS ANN

Finalmente, se estudió un modelo basado en ANN, ya que este tipo de modelado es más flexible, adaptativo y no responde necesariamente a un patrón de comportamiento lineal. Los resultados preliminares permitieron observar que era posible predecir la congelación en limones por ANN. Un estudio más detallado logró obtener una red 20-13-1, siendo esta la mejor de las estructuras sugeridas por el software.

La estructura seleccionada fue una red piramidal con tres niveles o capas: una capa inicial de entrada con 20 nodos, una capa oculta con 13 nodos y una capa de salida con un solo nodo. Esta red se ejecutó con un algoritmo de retropropagación en línea y funciones de activación de tipo logístico en los nodos de las capas oculta y de salida, lo que demostró ser muy efectivo en la discriminación de muestras de limón según habían experimentado o no. un fenómeno de helada previo en las últimas 24 h. La red obtenida fue capaz de clasificar correctamente el 100% de las muestras analizadas (Tabla 2).

ANN Architecture: 20-13-1																																							
Training	Validation	Test	Overall																																				
CCR = 100%	CCR = 100%	CCR = 100%	CCR = 100%																																				
<table border="1"> <tr><td>Target output:</td><td>0</td><td>1</td></tr> <tr><td>0</td><td>59</td><td>0</td></tr> <tr><td>1</td><td>0</td><td>63</td></tr> </table>	Target output:	0	1	0	59	0	1	0	63	<table border="1"> <tr><td>Target output:</td><td>0</td><td>1</td></tr> <tr><td>0</td><td>16</td><td>0</td></tr> <tr><td>1</td><td>0</td><td>13</td></tr> </table>	Target output:	0	1	0	16	0	1	0	13	<table border="1"> <tr><td>Target output:</td><td>0</td><td>1</td></tr> <tr><td>0</td><td>15</td><td>0</td></tr> <tr><td>1</td><td>0</td><td>14</td></tr> </table>	Target output:	0	1	0	15	0	1	0	14	<table border="1"> <tr><td>Target output:</td><td>0</td><td>1</td></tr> <tr><td>0</td><td>90</td><td>0</td></tr> <tr><td>1</td><td>0</td><td>90</td></tr> </table>	Target output:	0	1	0	90	0	1	0	90
Target output:	0	1																																					
0	59	0																																					
1	0	63																																					
Target output:	0	1																																					
0	16	0																																					
1	0	13																																					
Target output:	0	1																																					
0	15	0																																					
1	0	14																																					
Target output:	0	1																																					
0	90	0																																					
1	0	90																																					

Tabla 2. Tasas de clasificación correctas (CCR) y matrices de confusión del modelo de red neuronal artificial (ANN) obtenido para la detección de daños por congelación en limones por EIS

5. CONCLUSIONES

Siendo el limón el cítrico más sensible al frío, es de capital importancia establecer estrategias para prevenir daños y detectar rápidamente los efectos de un fenómeno de heladas. Esto ayudará en la toma de decisiones que apunten a minimizar los desperdicios y pérdidas económicas, así como a evitar la introducción al mercado de frutas con una calidad inferior a la esperada.

En este estudio se analizó una técnica EIS combinada con un adecuado tratamiento de datos vía ANN, lo que nos permitió obtener un sistema capaz de identificar muestras de limón que han experimentado un fenómeno de congelación con una alta confianza estadística. En concreto, los resultados mostraron que esta técnica fue capaz de clasificar con éxito el 100% de las muestras analizadas, diferenciando claramente las muestras que habían estado congeladas de aquellas que no habían experimentado este fenómeno.

Esto significa que esta técnica basada en EIS es una metodología prometedora en este uso específico y nos permite presentarla como una alternativa a los procesos de laboratorio existentes que generalmente son lentos, costosos, requieren instrumentos complejos y requieren personal experimentado para realizar análisis.

Además, los resultados obtenidos sugieren que esta técnica también podría ser exitosa para la detección de heladas en otros cítricos.

Por tanto, los pasos a seguir serían:

- Realizar análisis de los diversos cítricos de interés, y buscar así los diversos patrones existentes en el resto de los frutos

- Realizar una red neuronal en la que almacenar y gestionar los datos de todas las frutas.

- Realizar un estudio de los datos mediante el ajuste con un circuito equivalente eléctrico Hyden (Figura 13). Puesto que ha habido varios cambios en la interpretación del comportamiento eléctrico de los tejidos biológicos desde el primer circuito equivalente propuesto por Fricke-Morse en 1925. El circuito eléctrico equivalente de Hayden modificado permitiría un mejor ajuste con este tipo de tejido y es más complejo que otros modelos, pero no tanto como para dificultar demasiado los procesos de simulación.

Pues el modelo de Hayden con tejidos biológicos es mejor que otros modelos, debido a la inclusión de un elemento de fase constante (CPE) en el circuito, siendo este capaz de asumir la relajación tisular dieléctrica debido a la distribución celular no homogénea en el tejido de la muestra.

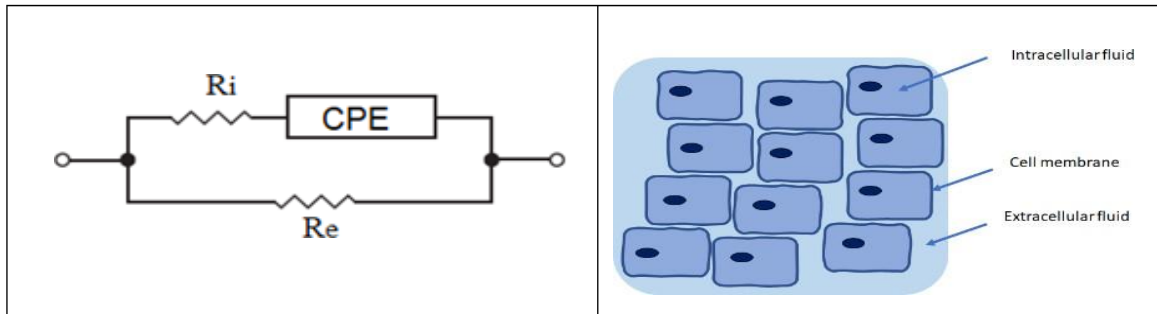


Figura 13: El circuito equivalente eléctrico Hayden modificado seleccionado para tejidos biológicos compuesto por tres componentes R_e (resistencia de líquido extracelular), R_i (resistencia del líquido intracelular) y un elemento de fase constante CPE (Relacionado con la membrana y la distribución celular no homogénea).

Se tendría que utilizar las siguientes ecuaciones para ajustar el modelo equivalente (Z_{eq}), y realizar un estudio de su validez estadística mediante R2 y error cuadrático medio (RMSE):

$$Z_{eq} = R_E || (R_i + Z_{CPE}) = \frac{R_e \cdot (R_i + Z_{CPE})}{R_e + (R_i + Z_{CPE})}$$

$$Z_{CPE} = \frac{1}{CPE \cdot (j\omega)^\alpha}$$

En dichas ecuaciones ω es la frecuencia angular y α es una constante adimensional en el rango [0,1] relacionada con el comportamiento no estrictamente capacitivo del CPE.

6. Bibliografía Consultada

- 1 FAO. Citrus Fruit Fresh and Processed Statistical Bulletin 2016; Food and Agriculture Organization: Rome, Italy, 2017; p. 66.
- 2 El-Otmani, M.; Ait-Oubahou, A.; Zacarías, L. Citrus spp.: Orange, mandarin, tangerine, clementine, grapefruit, pomelo, lemon and lime. In Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits; Yahia, E.M., Ed.; Woodhead Publishing: Sawston, UK, 2011; pp. 437–516.
- 3 Zabihi, H.; Vogeler, I.; Amin, Z.M.Y.; Gourabi, B.R. Mapping the sensitivity of citrus crops to freeze stress using a geographical information system in Ramsar, Iran. *Weather Clim. Extrem.* 2016, 14, 17–23. [[CrossRef](#)]
- 4 Artes, F.; Artes-Hernandez, F. Daños por frío en la postrecolección de frutas y hortalizas. In *Avances en Ciencias y Técnicas del Frío 1*; Gómez, A.L., Calero, F.A., Esnoz, A., Nicuesa, A.E., Eds.; Universidad Politécnica de Cartagena: Cartagena, Spain, 2003; pp. 299–310.
- 5 Tan, E.S.; Slaughter, D.C.; Thompson, J.F. Freeze damage detection in oranges using gas sensors. *Postharvest Biol. Technol.* 2005, 35, 177–182. [[CrossRef](#)]
- 6 Slaughter, D.C.; Obenland, D.M.; Thompson, J.F.; Arpaia, M.L.; Margosan, D.A. Non-destructive freeze damage detection in oranges using machine vision and ultraviolet fluorescence. *Postharvest Biol. Technol.* 2008, 48, 341–346. [[CrossRef](#)]
- 7 Martínez, L.; Ibacache, A.; Rojas, L. Daños por heladas en frutales. *Tierra Adentro* 2008, 80, 32–35.
- 8 Wang, C.Y. Chilling and freezing injury. In *The Commercial Storage of Fruits, Vegetables, and Florist and Nursery Stocks*. Agriculture Handbook 66; Gross, K.C., Wang, C.Y., Saltveir, M., Eds.; Agriculture Handbook: Washington, DC, USA, 2016.
- 9 Snyder, R.L.; Melo-Abreu, J.P.; Villar-Mir, J.M. Protección Contra Las Heladas: Fundamentos, Práctica y Economía; Food and Agriculture Organization: Rome, Italy, 2010; p. 68.
- 10 Urbina Vallejo, V. Daños por heladas en frutales. Sintomatología y evaluación. In *Curs de Valoració de Danys Climatològics i Incendis*, Reus-Tarragona, Spain, May 28th–29th 2007 Centre de Formació i Estudis Agrorurals; Generalitat de Catalunya—Departament d’Agricultura, Alimentació i Acció Rural: Barcelona, Spain, 2007; p. 19.
- 11 Sala, J.M.; Sanchez-Ballesta, M.T.; Alférez, F.; Mulas, M.; Zacarias, L.; Lafuente, M.T. A comparative study of the postharvest performance of an ABA deficient mutant of oranges II. Antioxidant enzymatic system and phenylalanine ammonia-lyase in non-chilling and chilling peel disorders of citrus fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 2005, 37, 232–240. [[CrossRef](#)]
- 12 Siboz, X.I.; Bertling, I.; Odindo, A.O. Salicylic acid and methyl jasmonate improve chilling tolerance in cold-stored lemon fruit (*Citrus limon*). *J. Plant Physiol.* 2014, 171, 1722–1731. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- 13 Jha, P.K.; Xanthakis, E.; Chevallier, S.; Jury, V.; Le-Bail, A. Assessment of freeze damage in fruits and vegetables. *Food Res. Int.* 2018, 121, 479–496. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

- 14 Sala, J.M.; Lafuente, M.T. Catalase in the heat-induced chilling tolerance of cold-stored hybrid Fortune mandarin fruits. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 2410–2414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- 15 USDA. Arizona California Citrus Loss Adjustment Standards Handbook; USDA: Washington, DC, USA, 1999;p. 35.
- 16 Hatton, T.T.; Cubbedge, R.H. Separation of frozen grapefruit by using emulsions of differing specific gravities.*Proc. Fla. State Hortic. Soc.* 1978, 91, 126–128.
- 17 Miller, W.M.; Wardowski, W.F.; Grierson, W. Separation and grading of freeze- damaged fruit. In *Fresh Citrus Fruits*; Wardowski, W.F., Miller, W.M., Hall, D.J., Grierson, W., Eds.; Florida Science Source, Inc.: Longboat Key, FL, USA, 2006; pp. 299–306.
- 18 Moomkesh, S.; Ahmad Mireei, S.; Sadeghi, M.; Mazeri, M. Early detection of freezing damage in sweet lemons using Vis/SWNIR spectroscopy. *Biosyst. Eng.* 2017, 164, 157–170. [[CrossRef](#)]
- 19 Obenland, D.M.; Aung, L.H.; Bridges, D.L.; Mackey, B.E. Volatile emissions of navel oranges as predictors of freeze damage. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 3367–3371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- 20 Gambhir, P.N.; Choi, Y.J.; Slaughter, D.C.; Thompson, J.F.; McCarthy, M.J. Proton spin–spin relaxation time of peel and flesh of navel orange varieties exposed to freezing temperature. *J. Sci. Food Agric.* 2005, 85, 2482–2486. [[CrossRef](#)]
- 21 Fuentes, A.; Masot, R.; Fernández-Segovia, I.; Ruiz-Rico, M.; Alcañiz, M.; Barat, J.M. Differentiation between fresh and frozen-thawed sea bream (*Sparus aurata*) using impedance spectroscopy techniques. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2013, 19, 210–217. [[CrossRef](#)]
- 22 Conesa, C.; Gracia-Breijo, E.; Loeff, E.; Seguí, L.; Fito, P.; Laguarda-Miró, N. An Electrochemical Impedance Spectroscopy-Based Technique to Identify and Quantify Fermentable Sugars in Pineapple Waste Valorization for Bioethanol Production. *Sensors* 2015, 15, 22941–22955. [[CrossRef](#)]
- 23 Macdonald, J.R.; Barsoukov, E. *Impedance Spectroscopy. Theory, Experiment and Applications*, 2nd ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2005; p. 595.
- 24 Wu, L.; Ogawa, Y.; Tagawa, A. Electrical impedance spectroscopy analysis of eggplant pulp and effects of drying and freezing-thawing treatments on its impedance characteristics. *J. Food Eng.* 2008, 87, 274–280.[[CrossRef](#)]
- 25 Serrano-Pallicer, E.; Muñoz-Albero, M.; Pérez-Fuster, C.; Masot Peris, R.; Laguarda-Miró, N. Early Detection of Freeze Damage in Navelate Oranges with Electrochemical Impedance Spectroscopy. *Sensors* 2018, 18, 4503. [[CrossRef](#)]
- 26 Grossi, M.; Riccò, B. Electrical impedance spectroscopy (EIS) for biological analysis and food characterization: A review. *J. Sens. Sens. Syst.* 2017, 6, 303–325. [[CrossRef](#)]
- 27 Chowdhury, A.; Bera, T.K.; Ghoshal, D.; Chakraborty, B. Electrical Impedance Variations in Banana Ripening: An Analytical Study with Electrical Impedance Spectroscopy. *J. Food Process Eng.* 2017, 40, 1–14. [[CrossRef](#)]

- 28 Bauchot, A.D.; Harker, F.R.; Arnold, W.M. The use of electrical impedance spectroscopy to assess the physiological condition of kiwifruit. *Postharvest Biol. Technol.* 2000, 18, 9–18. [[CrossRef](#)]
- 29 Figueredo, A.; Cárdenas, N.; Rabelo, E.; Pequeño de Oliveira, H. Determination of mango ripening degree by electrical impedance spectroscopy. *Comput. Electron. Agric.* 2017, 143, 222–226. [[CrossRef](#)]
- 30 Benavente, J.; Ramos-Barrado, J.R.; Heredia, A. A study of the electrical behaviour of isolated tomato cuticular membranes and cutin by impedance spectroscopy measurements. *Colloids Surf. A* 1998, 140, 333–338. [[CrossRef](#)]
- 31 Ando, Y.; Maeda, Y.; Mizutani, K.; Wakatsuki, N.; Hagiwara, S.; Nabetani, H. Impact of blanching and freeze-thaw pretreatment on drying rate of carrot roots in relation to changes in cell membrane function and cell structure. *LWT Food Sci. Technol.* 2016, 71, 40–46. [[CrossRef](#)]
- 32 Ando, Y.; Maeda, Y.; Mizutani, K.; Wakatsuki, N.; Hagiwara, S.; Nabetani, H. Effect of air-dehydration pretreatment before freezing on the electrical impedance characteristics and texture of carrots. *J. Food Eng.* 2016, 169, 114–121. [[CrossRef](#)]
- 33 Fuentes, A.; Vázquez-Gutiérrez, J.L.; Pérez-Gago, M.B.; Vonasek, E.; Nitin, N.; Barret, D.M. Application of nondestructive impedance spectroscopy to determination of the effect of temperature on potato microstructure and texture. *J. Food Eng.* 2014, 133, 16–22. [[CrossRef](#)]
- 34 M'hiri, N.; Veys-Renaux, D.; Rocca, E.; Ioannou, I.; Mihoubi Bourdinova, N.; Ghoul, M. Corrosion inhibition of carbon steel in acidic medium by orange peel extract and its main antioxidant compounds. *Corros. Sci.* 2016, 102, 55–62. [[CrossRef](#)]
- 35 Conesa, C.; Ibáñez, J.; Seguí, L.; Fito, P.; Laguarda-Miro, N. An Electrochemical Impedance Spectroscopy System for Monitoring Pineapple Waste Saccharification. *Sensors* 2016, 16, 188. [[CrossRef](#)]
- 36 Conesa, C.; Gil, L.; Seguí, L.; Fito, P.; Laguarda-Miro, N. Ethanol quantification in pineapple waste by an electrochemical impedance spectroscopy-based system and artificial neural networks. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 2017, 161, 1–7. [[CrossRef](#)]
- 37 Ulrich, C.; Petersson, H.; Sundgren, H.; Björefors, F.; Krantz-Rülcker, C. Simultaneous estimation of soot and diesel contamination in engine oil using electrochemical impedance spectroscopy. *Sens. Actuators B Chem.* 2007, 127, 613–618. [[CrossRef](#)]
- 38 Olivati, C.A.; Riul, A.; Balogh, D.T.; Oliveira, O.N.; Ferreira, M. Detection of phenolic compounds using impedance spectroscopy measurements. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2009, 32, 41–46. [[CrossRef](#)]
- 39 Martínez Gil, P.; Laguarda-Miró, N.; Soto Camino, J.; Masot Peris, R. Glyphosate detection with ammonium nitrate and humic acids as potential interfering substances by pulsed voltammetry technique. *Talanta* 2013, 115, 702–705. [[CrossRef](#)]
- 40 Górski, Ł.; Sordon, W.; Ciepiela, F.; Kubiak, W.W.; Jakubowska, M. Voltammetric classification of ciders with PLS-DA. *Talanta* 2016, 146, 231–236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

- 41 Kumar, G.; Buchheit, R.G. Use of Artificial Neural Network Models to Predict Coated Component Life from Short-Term Electrochemical Impedance Spectroscopy Measurements. *Corrosion* 2008, 64, 241–254. [CrossRef]
- 42 Eddahech, A.; Briat, O.; Bertrand, N.; Delétage, J.Y.; Vinassa, J.M. Behavior and state-of-health monitoring of Li-ion batteries using impedance spectroscopy and recurrent neural networks. *Int. J. Electron. Power Energy Syst.* 2012, 42, 487–494. [CrossRef]
- 43 Conesa, C.; Seguí, L.; Laguarda-Miró, N.; Fito, P. Microwaves as a pretreatment for enhancing enzymatic hydrolysis of pineapple industrial waste for bioethanol production. *Food. Bioprod. Process.* 2016, 100, 203–213. [CrossRef]
- 44 Council of Europe. Technical Document. Guidelines on Metals and Alloys Used as Food Contact Materials. In Partial Agreement Department in the Social and Public Health Field; Council of Europe: Strasbourg, France, 2002; p. 88. Available online: http://www.mast.is/Uploads/document/guidelines_metals_alloys_used_as_food_contact_materials.pdf (accessed on 11 September 2019).
- 45 Masot, R.; Alcañiz, M.; Fuentes, A.; Schmidt, F.C.; Barat, J.M.; Gil, L.; Baigts, D.; Martínez-Máñez, R.; Soto, J. Design of a low-cost non-destructive system for punctual measurements of salt levels in food products using impedance spectroscopy. *Sens. Actuators A Phys.* 2010, 158, 217–223. [CrossRef]
- 46 Wold, S.; Sjostrom, M.; Eriksson, L. PLS-regression: A basic tool of chemometrics. *Chemom. Intell. Lab.* 2001, 58, 109–130. [CrossRef]
- 47 Legin, E.; Zadorozhnaya, O.; Khaydukova, M.; Kirsanov, D.; Rybakin, V.; Zagrebin, A.; Ignatyeva, N.; Ashina, J.; Sarkar, S.; Mukherjee, S.; et al. Rapid Evaluation of Integral Quality and Safety of Surface and Waste Waters by a Multisensor System (Electronic Tongue). *Sensors* 2019, 19, 2019. [CrossRef] [PubMed]
- 48 Kasuba, T. Simplified fuzzy ARTMAP. *AI Expert* 1993, 8, 18–25.
- 49 Garcia-Breijo, E.; Atkinson, J.; Gil-Sanchez, L.; Masot, R.; Ibañez, J.; Garrigues, J.; Glanc, M.; Laguarda-Miro, N.; Olguin, C. A comparison study of pattern recognition algorithms implemented on a microcontroller for use in an electronic tongue for monitoring drinking waters. *Sens. Actuators A Phys.* 2011, 2, 570–582. [CrossRef]
- 50 Rajasekaran, S.; Vijayalakshmi Pai, G.A. *Neural Networks, Fuzzy Logic and Genetic Algorithms: Synthesis and Applications*; Prentice Hall: New Delhi, India, 2004; p. 456.
- 51 Garcia-Breijo, E.; Garrigues, J.; Gil Sanchez, L.; Laguarda-Miró, N. An Embedded Simplified Fuzzy ARTMAP Implemented on a Microcontroller for Food Classification. *Sensors* 2013, 13, 10418–10429. [CrossRef]
- 52 Brezmes, J.; Cabre, P.; Rojo, S.; Llobet, E.; Xilanova, X.; Correig, X. Discrimination between different samples of olive oil using variable selection techniques and modified fuzzy artmap neural networks. *IEEE Sens. J.* 2005, 5, 463–470. [CrossRef]
- 53 Ibañez Civera, J.; Garcia Breijo, E.; Laguarda Miró, N.; Gil Sánchez, L.; Garrigues Baixauli, J.; Romero Gil, I.; Masot Peris, R.; Alcañiz Fillol, M.

- Artificial neural network onto Eight Bit microcontroller for Secchi depth calculation. *Sens. Actuators B Chem.* 2011, 156, 132–139. [[CrossRef](#)]
- 54 Del Brío, B.M.; Molina, A.S. *Redes Neuronales y Sistemas Borrosos*, 2nd ed.; Ra-Ma: Madrid, Spain, 2001; p. 399.
- 55 Fricke, H.; Morse, S. The electric resistance and capacity of blood for frequencies between 800 and 4(1/2) million cycles. *J. Gen. Physiol.* 1925, 9, 153–167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- 56 Damez, J.-L.; Clerjon, S.; Abouelkaram, S.; Lepetit, J. Dielectric behavior of beef meat in the 1–1500 kHz range: Simulation with the Fricke/Cole-Cole model. *Meat Sci.* 2007, 77, 512–519. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- 57 Zhang, L.; Shen, H.; Lun, Y. Study on the electric conduction properties of fresh and frozen-thawed grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Int. J. Food Sci. Technol.* 2010, 45, 2560–2564. [[CrossRef](#)]