

# **APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE IMAGEN 3D E HIPERESPECTRAL PARA LA EVALUACIÓN DE LA FRECUENCIA DE PESCADO**



**MÁSTER UNIVERSITARIO EN GESTIÓN DE LA SEGURIDAD Y CALIDAD  
ALIMENTARIA**

Maribel Quelal Vásconez

Raúl Grau Melo  
Jose Manuel Barat Baviera  
Directores

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

# APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE IMAGEN 3D E HIPERESPECTRAL PARA LA EVALUACIÓN DE LA FRECURA DE PESCADO

Maribel Quelal<sup>1</sup>, Eugenio Ivorra<sup>3</sup>, Antonio Sánchez<sup>3</sup>, J.M. Barat<sup>2</sup>, Raúl Grau<sup>2</sup>

## RESUMEN

En el presente trabajo se aplicó la técnica no destructiva 3D e Hiperespectral para la evaluación de la frescura del pescado *sparus aurata* (dorada), para esto primero se efectuó la preparación de muestras que consistió en envasar 28 pescados de un peso aproximado de 125 g en moldes de aluminio cubiertos con polietileno de baja densidad y almacenados a 4°C. Luego se realizó la captura de imagen de cada ojo y los análisis físico químicos como pH, índice de refracción del humor vítreo, NBV-T, color del ojo. Los análisis se realizaron los días 0, 1, 3, 5, 7, los resultados de los análisis físico químicos entre días fueron estadísticamente significativos, los valores de NBV-T estuvieron entre  $20.86 \pm 0.33$  para el día 0 y  $34.18 \pm 3.50$  mgN/100g en el día 7, el humor vítreo tomo valores entre 1.3366 a día 0 hasta valores de 1.3396 a día 7 mientras que en el color la coordenada "a" resultó significativo desde el primer día y los análisis microbiológicos permitieron determinar que la dorada no es apta para el consumo en el día 7. Con los resultados del análisis de imagen hiperespectral se realizó un análisis de componentes principales con la obtención de 2 componentes latentes que explicaron el 95,46% de la variabilidad de los datos, la primera componente explicó el 94,14 % en tanto que la segunda explicó el 1,18%, esta segunda componente mostró la presencia de grupos de datos según los días de almacenamiento, luego mediante un análisis PLS se obtuvo un modelo de predicción con un RMSE de ajuste y uno de validación cruzada de 0.487 y 0.862 respectivamente y los  $R^2$  de 0.95 y 0.86 respectivamente esto indica que la tecnología aplicada en este estudio es efectiva en la evaluación de la frescura por días de almacenamiento a partir de la captura, con la ventaja de que puede ser utilizada en línea sin las limitaciones que un análisis de laboratorio implica, serán necesarios estudios sucesivos utilizando por ejemplo una zona del ojo mediante la segmentación de la imagen para obtener un modelo de predicción más robusto.

**PALABRAS CLAVE:** Imagen 3D, Hiperespectral, *Sparus aurata*, Seguridad Alimentaria, Análisis no Invasivo, Frescura, Vida útil Pescado.

## RESUM

En el present treball s'aplicà la tècnica no destructiva 3D i HIPERESPECTRAL per a l'evaluació de la frescura del peixcat SPARUS AURATA (rossejada), per a açò primer s'efectuà la preparació de mostres que consistí en envasar 28 peixcats d'un pes aproximat de 125 G en moles d'alumini coberts en POLIETILENO de baixa densitat i almagasensats a 4°C. Després se realitzà la captura d'imatge de cada ull i els anàlisis físic-químics com PH, índex de refracció de l'humor vitreu, NBV-T, color de l'ull. Els anàlisis se realitzaren els dies 0, 1, 3, 5, 7, els resultats dels anàlisis físic-químics entre dies foren estadísticament significatius, els valors de NBV-T estigueren entre  $20.86 \pm 0.33$  per al dia 0 i  $34.18 \pm 3.50$  MGN/100G en el dia 7, l'humor vitreu tomà valors entre 1.3366 a dia 0 fins a valors de 1.3396 a dia 7 mentre que en el color la coordenada "a" resultà significatiu des del primer dia i els anàlisis MICROBIOLÒGICS permeteren determinar que la rossejada no és apta per al consum en el dia 7. En els resultats de l'anàlisi d'imatge HIPERESPECTRAL se realitzà un anàlisi de components principals en l'obtenció de 2 components latents que explicaren el 95,46% de la variabilitat de les senyals, la primera component explicà el 94,14 % en tant que la segona explicà el 1,18%, esta segona component mostrà la presència de grups de senyals segons els dies d'almagament, després mitjançant un anàlisi PLS s'obtingué un model de predicció en un RMSE d'ajust i un de VALIDACIÓN creuada de 0.487 i 0.862 respectivament i els R<sup>2</sup> de 0.95 i 0.86 respectivament açò indica que la tecnologia aplicada en este estudi és efectiva en l'evaluació de la frescura per dies d'almagament a partir de la captura, en la ventaja de que pot ser utilitzat en línia sense les limitacions que un anàlisi de laboratori implica, seran necessaris estudis successius utilitzant per exemple una zona de l'ull mitjançant la segmentació de l'imatge per a obtenir un model de predicció més robust.

PARAULES CLAU: Imatge 3D, HIPERESPECTRAL, SPARUS AURATA, Seguretat Alimentària, Anàlisi no Invasiu, Frescura, Vida útil Peixcat.

## ABSTRACT

In this work the non-destructive technique 3D Hyperspectral was applied to evaluate fish freshness of *sparus aurata* (sea bream) for this, sample preparation was performed and this consisted in pack in aluminum molds 28 fish weighing approximately 125 g, then cover with low density polyethylene and store at 4°C. Image capture of each eye and physicochemical analysis such as pH, refractive index of the vitreous humor, TVBN, eye color is then performed. Analysis were performed on days 0, 1, 3, 5, 7, the results of the physicochemical analysis were statistically significant between days, the TVBN presented values from  $20.86 \pm 0.33$  for the day 0 and  $34.18 \pm 3.50$  mgN/100g on day 7, and the humor vitreous had values between 1.3366 in the day 0 to 1.3396, while the chroma "a" of color was significant from the first day, microbiological analyzes have revealed that the sea bream is unfit for consumption on day 7 with a count of Enterobacteriaceae of  $5.26 \pm 0.046$  log (ufc/g), and psychrotrophic microorganisms counts between  $5.26 \pm 0.006$  log (ufc/g). The results of the analysis of hyperspectral image were used to do an analysis of principal components, the result were 2 latent components that accounted for 95.46% of the variability of the data, the first component explained 94.14% while the second explained 1.18%, this second component showed the presence of groups of data as the days of storage, then by analyzing PLS, a prediction model was obtained RMSE and adjusting one of cross-validation of 0.487 and 0.862 respectively and  $R^2$  of 0.95 and 0.86 respectively indicating that the technology effect of this study is effective in evaluating the freshness storage days after the capture, with the advantage of which can be used online without limitations of laboratory analysis involves, successive studies will be necessary using for example a eye area by segmenting the image to obtain a more robust prediction model.

**KEY WORDS:** 3D Image, Hyperespectral, *Sparus aurata*, Food Safety, non-destructive analysis, freshness, fish, shelf life.

1 Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo (Iu-IAD).

2 Grupo de Investigación e Innovación Alimentaria (CUINA). Dto. Tecnología de Alimentos.

3 Instituto de Automática e Informática Industrial (ai2).

## INTRODUCCIÓN

El pescado es un alimento altamente perecedero por lo que su frescura se valora tanto para su procesamiento como para su consumo en fresco. Este control se viene realizando mediante inspecciones visuales utilizando el método Quality index method (Campus et al., 2011), mediante técnicas físico – químicas como el análisis del Nitrógeno Básico Volátil Total (NBVT), pH, humedad, humor vítreo y mediante técnicas microbiológicas como son la determinación de *E. coli*, *Enterobacterias* y *mesófilos*, los cuales se caracterizan por ser costosos y requieren de tiempo para la obtención de resultados, por lo que no son utilizados para el control o evaluación de la calidad inmediata (Alasalvar et al., 2001; Fuentes et al., 2013).

Estas técnicas empleadas tienen la característica de ser destructivas y en el caso del control visual y sensorial muy dependiente de la experticia del inspector o evaluador, por lo que es necesario incursionar en técnicas de análisis que eviten la destrucción de la muestra y que además sean rápidas y efectivas en la evaluación de la frescura del pescado, y en su caso puedan trabajar en línea. Dentro de este marco se han realizado estudios sobre la utilización de técnicas no destructivas para el análisis de alimentos. De entre estas, se encuentran las técnicas potenciométricas (Barat et al., 2008), el uso de nariz optoelectrónica (Zaragozá et al., 2013), la visión artificial (Dowlati et al., 2013), la visión 3D (Ivorra et al., 2014), el Infrarrojo cercano (Gráu et al., 2010), hiperespectral (Lawrence, et al., 2003).

Una de las técnicas de visión 3D es la basada en el concepto de luz estructurada. En este sistema de captura, en cualquiera de sus variantes, requiere tres elementos fundamentales: una fuente de luz activa o laser, un sistema de detección o cámara CCD y un sistema de procesamiento de datos. Así el laser recorre la superficie del objeto mientras la cámara hace capturas a unos intervalos de tiempo determinados. Con las capturas realizadas el sistema de procesamiento genera la imagen en tres dimensiones. La reconstrucción digital se basa en el cálculo por triangulación clásica de las coordenadas de cada punto de la línea del laser que han sufrido variaciones por el paso del objeto (Verdú et al., 2013). Esta técnica está siendo aplicada en alimentos con éxito (Kelkar et al., 2001, Uyar y Erdogan, 2009; Ivorra et al., 2014; Verdú et al., 2015).

De igual forma, el uso de imágenes hiperespectrales se ha convertido en una técnica para la evaluación de la calidad y la inspección de la seguridad de la producción agrícola y productos alimenticios (Gráu et al., 2010; Ivorra et al., 2013; Huang H., 2014 ; Verdú et al., 2015b). Esta se basa en que todas las muestras biológicas en este caso de alimentos emiten y absorben de manera continua energía debido al aumento o disminución de sus niveles de energía molecular. Las longitudes de onda a las que las moléculas absorben, reflejan y transmiten radiación electromagnética es característica de su estructura, lo cual permite que la espectroscopia pueda proporcionar huellas típicas. A nivel macro, la onda electromagnética se observa como

luz. Debido a que parte de la luz es absorbida por los tejidos de la muestra, la fuerza y las longitudes de onda de emisión y absorción dependen de los estados físicos y químicos de la muestra. La luz que se genera es convertida en un espectro y reconfigurada en imágenes mediante hiperspectrómetros, estas imágenes serán diferentes si se presentan cambios en la estructura molecular. La imagen hiperspectral puede detectar tanto la luz visible como la luz de las gamas ultravioleta e infrarroja cercana y mediante estas se puede obtener información sobre los constituyentes químicos y propiedades físicas de las muestras de alimentos. (Huang H., 2014).

Dado que la tasa de biodegradación de los diferentes tejidos del pescado se produce de forma diferente (Sivertsen et al., 2011; Ivorra et al, 2013) en el presente trabajo se plantea como objetivo combinar las técnicas de 3D, como técnica de reconocimiento de la zona a inspeccionar (ojo) y multiespectral, como técnica de inspección, con la finalidad de evaluar la frescura del pescado (dorada) a través de lecturas realizadas en el ojo de este.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Materia prima y toma de muestra**

Para desarrollar el estudio se han utilizado 28 pescados de la especie *Sparus aurata* (dorada) de piscifactoría, comprados en un supermercado local, con un peso aproximado de 125 g. Estos fueron envasados en bandejas de aluminio, de 14 cm de largo por 11 cm de ancho, cerradas con film plástico (polietileno de baja densidad).

La toma de muestra, para los análisis físicoquímicos (destruictivos), se realizó los días 0, 1, 3, 5 y 7, siendo el número de peces evaluados cada día de 4. Para los análisis microbiológicos solo se tomaron muestras los días 0 y 7. En el caso de los análisis de imagen y de color esta se efectuó los días 0, 1, 3 y 6.

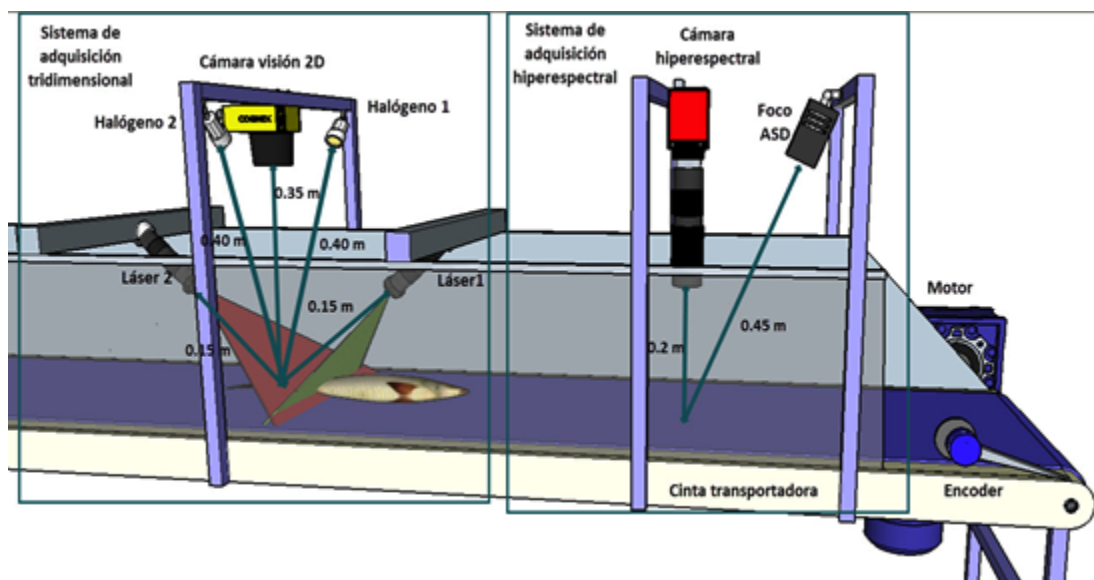
### **Análisis de imagen**

El equipo que se utilizó está siendo desarrollado por el Instituto de Automática e Informática Industrial (ai2) y consta de dos subsistemas (figura 1). Por una parte el sistema de adquisición de tridimensional (3D) por luz estructurada que aporta información espacial muy precisa y por otra el sistema de adquisición hiperspectral (SW-NIR) que proporciona información espectral. Ambos subsistemas están acoplados sobre una cinta transportadora Nikatrans NT130 (Nikai Systems S.L. Guadalajara, España) accionada por un motor de alterna Nord 71s/4 (Nord Drivesystems S.L., Bargteheide, Alemania) y controlado por un variador de frecuencia Telemecanique altivar 31 (Schneider Electric, Rueil-Malmaison, Francia) gracias a los cuales los peces van deslizándose y pasando por las cámaras.

Para la ubicación exacta del ojo del pescado, sobre el que realizar las medidas mediante la técnica (SW-NIR), se utilizó la visión 3D el cual es un

sistema compuesto por una luz estructurada y una cámara AD-080CL (JAI Company, Yokohama, Kanagawa, Japón) situada a 0.35 m de la cinta transportadora. La luz estructurada se generó mediante dos láseres rojos lineales (Lasiris SNF 410, Coherent Inc. Santa Clara, California (USA)).

La captura de imágenes, de las que se extraen los espectros SW-NIR, se realizó mediante una cámara CMOS Photonfocus MV1-D1312 40gb 12 (Photonfocus AG, Lachen, Suiza), un filtro SpecimImSpector V10 1/2" (Specim Spectral Imaging, LTD., Oulu, Finlandia) y un foco comercial ASD illuminator (ASD Inc, Boulder, EE. UU). Mediante este sistema se consiguen espectros que abarcan un rango de 400 a 1040 nm de longitud de onda. La posición del iluminante y de la cámara siempre fueron constantes para preservar las condiciones de adquisición a lo largo del estudio. La distancia entre el foco y la muestra fue de 0.525 m para asegurar que no modificara la temperatura de la misma. La cámara se encontraba a una distancia de 0.225 m respecto a la muestra. Se adquirieron las imágenes a una temperatura ambiente constante de 21°C. De cada muestra se capturaron tres imágenes de cada ojo.



**Figura 1.** Sistema de adquisición tridimensional e hiperespectral para el análisis de frescura de la dorada

## **Análisis Físico – químicos**

### **POTENCIAL DE HIDRÓGENO (pH)**

El pH se midió con un pH-metro portátil MM40 (Crison Instruments S. A, Alella, Barcelona, España). Para ello, se tomó 10 g de producto y 90 mL de agua destilada y se homogenizó la muestra con un Ultra-Turrax T25 (IKA Labortechnik, Staufen, Alemania) antes de hacer la lectura (Fuentes, 2008).

## NITRÓGENO BÁSICO VOLÁTIL TOTAL (N-BVT)

El contenido de N-BVT se determinó según los procedimientos descritos por Malle y Tao (1987). Para medir el N-BVT se homogenizó en Ultra-Turrax T25 (IKA Labortechnik, Staufen, Alemania) 40 g de muestra, previamente triturada, con 80 mL de una disolución acuosa de ácido tricloroacético (7,5% p/v) durante 1 min. Este homogenizado se centrifugó a 4500 rpm durante 20 min y el sobrenadante fue filtrado a través de papel filtro Whatman nº 1, obteniéndose así el extracto de la muestra. En un tubo de destilación tipo Kjeldahl, se introdujeron 25 mL del filtrado obtenido y 5 mL de una disolución acuosa de NaOH (10% p/v). Los tubos se llevaron a una unidad de destilación PRO-NITRO M (Selecta, S. A., Barcelona, España) y el destilado fue recogido sobre 15 mL de una disolución acuosa de ácido bórico (4% p/v). Finalmente, la disolución obtenida se valoró con ácido sulfúrico 0,01 N, utilizando Shiro T-Shiro como indicador. Los resultados de expresaron en mg de N-VBT/100 g de producto (ecuación 2),

$$\text{mg N/100 g muestra} = \frac{N_{\text{H}_2\text{SO}_4} \cdot f \cdot (V_m - V_b) \cdot (80 + (m \cdot H)) \cdot 14}{m \cdot 25} \cdot 10^5 \quad (2)$$

Donde

$N_{\text{H}_2\text{SO}_4}$  = normalidad del ácido sulfúrico

$f$  = factor de normalidad del ácido sulfúrico

$V_m$  = volumen de ácido sulfúrico empleado en la valoración de la muestra (L).

$V_b$  = volumen de ácido sulfúrico empleado en la valoración del blanco (L).

$m$  = masa de la muestra (g)

$H$  = contenido de humedad de la muestra (g agua/muestra).

Los resultados se contrastaron, con lo sugerido por Billon et al., (1979), en las tres categorías de pescado:

Clase I, N-BVT < 30 mg/100 g

Clase II, 30 mg/100 g < N-BVT < 40 mg/100 g

Clase III, N-BVT > 40 mg/100 g. (No apto para el consumo humano)

## INDICE DE REFRACCIÓN DEL HUMOR VÍTREO

De la cámara anterior del ojo de cada pescado se tomó una muestra del humor vítreo mediante una jeringuilla desechable de 5cc. Se depositó la gota obtenida en la lente del refractómetro Abbe (RFM330+, Kent, United Kingdom) obteniendo el índice de refracción las medidas tomadas se contrastaron con la tabla 1, (Farber, 1965, Fontes et al., 2007)



**TABLA 1.** Índice de Refracción del humor vítreo y calidad del pescado

<b>CALIDAD DEL PESCADO</b>	<b>IR</b>
EXCELENTE	1,3347 – 1,3366
BUENO	1,3367 – 1,3380
REGULAR	1,3381 – 1,3393
NO APTO	> 1,3394

## COLOR

Las medidas de color se realizaron directamente sobre el ojo. Para ello se empleó un espectrofotómetro Minolta (CM-700d/600d, Minolta Cámara Co., Osaka, Japón), utilizando un iluminante D65 y un observador estándar 10° (UNE 40-080, 1984). El sistema de color utilizado fue el CIEL\*a\*b\*. Sobre cada uno de los ojos se realizaron 4 mediciones, utilizando un tamaño de apertura de 8 mm de diámetro.

## Análisis microbiológicos

Para el efecto, se homogenizaron las muestras en Stomacher durante 2 minutos con una proporción de 1:9 en agua de peptona tamponada y se prepararon diluciones decimales (AENOR, 2004). Se estableció un límite de  $10^6$  ufc/ g para el deterioro microbiano de acuerdo a estudios anteriores (Ribes et al., 2013; Pascual 2000; Özogul et al., 2004). De cada dilución se sembraron 2 placas.

El recuento de microorganismos aerobios mesófilos se realizó mediante siembra en profundidad en Agar Plate Count (PCA), después de 72 h de incubación a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  (ISO 4833:2003). El recuento de enterobacterias se realizó mediante siembra en doble capa en Agar Violeta Rojo Bilis Glucosa (VRBG, Scharlau), y las placas se incubaron a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 18-24 h (Pascual, 2000).

## Análisis estadístico

Para evaluar el efecto del tiempo sobre los parámetros físico-químicos medidos, se realizó un análisis de la varianza ANOVA de un factor. En los casos en los que las diferencias fueron significativas ( $p\text{-value} < 0.05$ ), las medias fueron analizadas mediante el test de Fisher (LSD). Para llevar a cabo estos estudios estadísticos se usó el paquete estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI.

El análisis de los datos de imagen se realizó mediante el paquete estadístico Matlab (The Mathworks, Natick, Massachussets, USA). La disposición espontanea de los datos y eliminación de datos anómalos se efectuó mediante el análisis de componentes principales PCA. Con la finalidad de poder obtener un modelo de predicción con el tiempo de almacenamiento (frescura), los datos de imagen (SW-NIR) fueron modelizados mediante una regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS),

utilizando la cros-validación de bloques continuos. La bondad del análisis fue expresada por la suma cuadrática de los errores (RMSE) y el R cuadrado del ajuste ( $R^2$ ) entre los valores observados y los predichos. Para la realización del estudio, los datos fueron filtrados mediante un filtrado ortogonal y posteriormente estandarizados mediante un autoescalado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Resultados Físico – químicos

El análisis de la varianza para cada variable dependiente (resultados de los análisis destructivos) con el factor tiempo de almacenamiento (días) se muestra en la tabla 2. Como se puede observar para todos los parámetros analizados existieron diferencias significativas ( $p$ -value $<0.05$ ) con el tiempo de almacenamiento.

**TABLA 2.** Datos del pH, NBVT y humor vítreo, de muestras de dorada almacenadas en refrigeración (4°C). Media  $\pm$  desviación estándar (n=3).

Tiempo (Días)	Humor vítreo	NBV-T (mg N/100 g)	pH
0	1.3366 $\pm$ 0.0003a	20.86 $\pm$ 0.33a	6.05 $\pm$ 0.03a
1	1.3367 $\pm$ 0.0002ab	26.68 $\pm$ 0.61b	6.11 $\pm$ 0.04ab
3	1.3375 $\pm$ 0.0006abc	26.56 $\pm$ 1.79b	6.17 $\pm$ 0.08bc
5	1.3385 $\pm$ 0.0010bcd	28.06 $\pm$ 1.29b	6.22 $\pm$ 0.01c
7	1.3396 $\pm$ 0.0015d	34.18 $\pm$ 3.50c	6.23 $\pm$ 0.06c

Letras iguales en una misma columna indican la pertenencia a grupos homogéneos. Nivel de significación =(p-valor): ns=no hay diferencia significativa; \*  $p<0,05$ .

A medida que el tiempo de almacenamiento incrementó, también lo hicieron los valores de humor vítreo, NBV-T y pH. En el caso del humor vítreo este varió desde valores de 1.3366  $\pm$  0.0003 a día 0 hasta valores de 1.3396  $\pm$  0.0015 a día 7. Ludorff y Meyer en 1978 ya reportaron como los líquidos oculares se vuelven turbios y opacos como consecuencia de la desecación y la concentración de las sustancias disueltas. En base a los valores obtenidos para este parámetro, a partir del quinto día de almacenamiento el producto tendría una calidad regular, no siendo apto para consumo en el séptimo día al alcanzar valores superiores a 1,3394 (Yapar y Yetim, 1998), por lo que la fecha límite de consumo se establecería entorno al sexto día.

El análisis NBV-T obtuvo valores entre 20.86  $\pm$  0.33 para el día 0 y 34.18  $\pm$  3.50 en el día 7, si bien durante los primeros 5 días este incremento fue leve, este resultado ya fue señalado por Fuentes (2008), que indica que el análisis de NBVT no es un buen indicador para los primeros días de

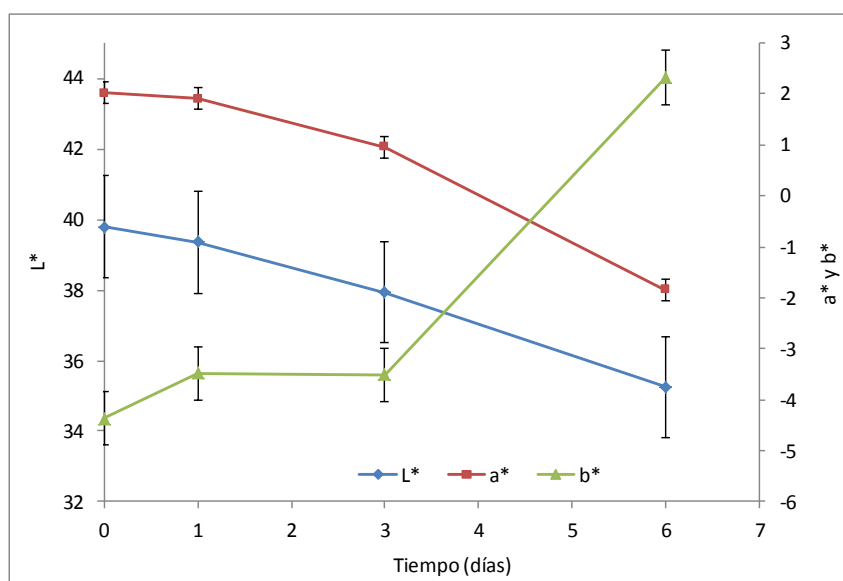
conservación puesto que muestra etapas de deterioro más avanzadas. Ribes et al., 2013 e Ivorra et al., 2014 obtuvieron valores ligeramente más bajos en los primeros días, en tanto que Kyrana, et al. 1997, también en dorada procedente de piscifactoría, el valor inicial de 26,0 mg N /100 g, permaneció prácticamente constante durante los 10 primeros días de almacenamiento. Esta diferencia en los valores iniciales puede deberse, según Goulas y Kontominas, 2007, a que el contenido de nitrógeno tiene dependencia del nitrógeno no proteico del pescado, el cual está relacionado con la alimentación, etapa de captura, tamaño del pescado y factores medioambientales. Así en base a la clasificación establecida por Billon et al., en 1979 el pescado sería apto para el consumo incluso a los 7 días, si bien la Regulación de la UE (CEE, 2005), en base a esta clasificación, no fija valores límite de NBV-T para la familia *sparidae*.

El pH presentó un valor de  $6.05 \pm 0.03$  el día 0, subiendo ligeramente hasta el día 7 ( $6.23 \pm 0.06$ ). Este comportamiento es similar al mencionado por Ribes, et al., (2013) y Barat et al., (2013), los cuales atribuyen el ligero aumento al incremento de sustancias básicas que se generan como consecuencia del desarrollo microbiano cuyo metabolismo daría lugar a compuestos básico (Pascual, 2000; Herrera, 2003).

Los recuentos microbiológicos realizados mostraron valores de Enterobacterias totales de  $2.43 \pm 0.045$  log (ufc/g) para el día 0, alcanzando niveles no aceptables para el día 7 ( $5.26 \pm 0.046$  log (ufc/g)). Los niveles de aerobios mesófilos para el día 0 fueron de  $4.05 \pm 0.046$  log (ufc/ g), subiendo a valores de  $5.26 \pm 0.006$  log (ufc/g) a los 7 días. Valores similares fueron encontrados por otros autores (Fuentes et al., 2011; Carrascosa et al., 2014), los cuales reportan la vida útil de la dorada en torno a 6 – 8 días.

## **Resultados del análisis de Color**

En la figura 2, se muestra la evolución de las coordenadas de color  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  del espacio de color CIEL\*a\*b\* medidas sobre el ojo de la dorada a lo largo del tiempo de almacenamiento. Como se puede observar todas las variables muestran diferencias significativas ( $p\text{-value}>0.05$ ) con el tiempo.  $L^*$  decrece sus valores si bien las diferencias significativas solo se alcanzan cuando se comparan los valores del día 6 con los de los días 1 y 2. Para los tres primeros días los valores fueron similares, no mostrando diferencias significativas. Los valores de  $a^*$  también decrecen con el tiempo de almacenamiento, pero en este caso los cambios son más evidentes, existiendo diferencias significativas ( $p\text{-value}>0.05$ ) a partir del tercer día de almacenamiento, siendo los valores al sexto día muy diferentes a los obtenidos para los primeros tres días. La coordenada  $b^*$  fue la única que experimento un ascenso, si bien como ocurría con la coordenada  $L^*$  los valores solo fueron significativamente diferentes al sexto día. Para las tres variable evaluadas, los valores coincidieron con los de otros autores (Dowlati et al, 2013), los cambios observados pudieron deberse a reacciones de oxidación de lípidos y su reacción con proteínas (Masniyom, 2011).



**Figura 2:** Evolución de los parámetros de color  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  de doradas almacenadas en refrigeración. Barras expresan error estándar.

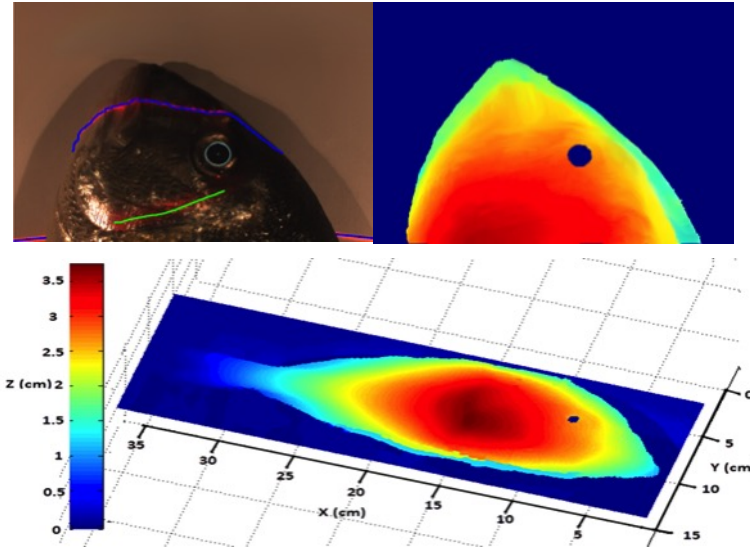
### Evaluación de la frescura mediante técnicas de imagen.

Para la evaluación de la frescura de la dorada, mediante técnicas de imagen, a partir de la información obtenida de lecturas realizadas en el ojo, las muestras fueron depositadas sobre la cinta transportadora a fin de que circularan primero bajo el dispositivo de imagen que genera la imagen en 3D y marca la posición del ojo y posteriormente sobre el dispositivo de imagen que realiza las lecturas mediante la cámara multispectral obteniéndose los espectros tanto del visible como del infrarrojo cercano para los píxeles establecidos como ojo.

Para la evaluación de la frescura de la dorada, mediante técnicas de imagen, a partir de la información obtenida de lecturas realizadas en el ojo, las muestras fueron depositadas sobre la cinta transportadora a fin de que circularan primero bajo el dispositivo de imagen que genera la imagen en 3D y posteriormente bajo la cámara multispectral (Figura 1). Así en un primer paso, mediante la imagen 3D, se define que píxeles son los que corresponden al ojo y posteriormente mediante las lecturas empleando la cámara multispectral se obtienen los espectros, tanto del visible como del infrarrojo cercano, analizándose solo aquellos que corresponden a los píxeles clasificados como ojo.

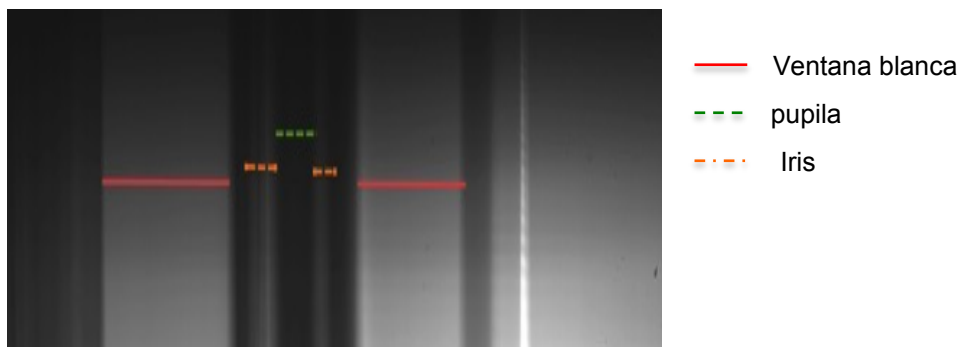
Como se puede ver en la Figura 3, mediante un sistema de dos láser el equipo es capaz de escanear el pescado generando la información numérica necesaria para codificar el pescado y que en este caso se ha utilizado para construir la representación en 3D, en la que se observa como se forma un área azulada que corresponde al ojo. La reconstrucción numérica de la imagen como se muestra en la no es necesaria, se ha realizado para que se

pueda visualizar cómo funciona el equipo. La información numérica es lo que se desea, ya que así se puede codificar el área que representa el ojo, para que posteriormente se analicen solo estos píxeles del área codificada como ojo.



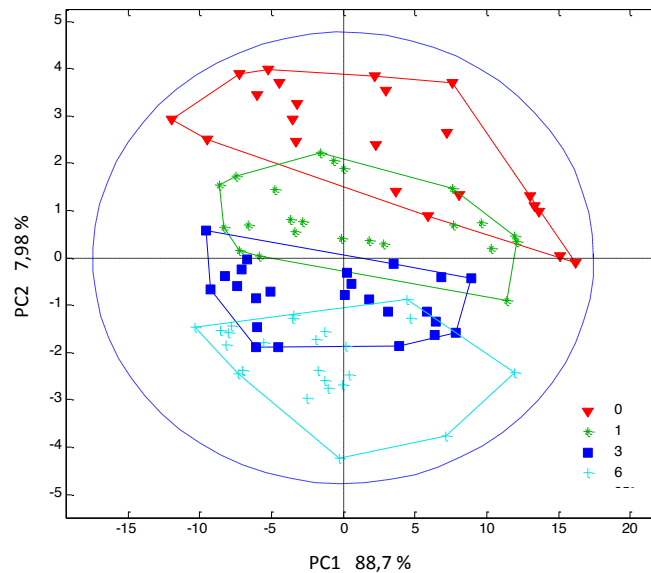
**Figura 3:** Imagen 3D del pescado con la ubicación del ojo

Una vez realizadas las lecturas con la cámara multispectral se obtienen los espectros de los píxeles. Con la finalidad de poder visualizar esta información, los espectros de los píxeles se han codificado en una escala de grises como se muestra en la Figura 4. En ella se puede visualizar aquellos píxeles que corresponden a la zona del ojo y dentro de este incluso al iris (línea naranja) o la pupila (línea verde). Si bien en la imagen se ha podido diferenciar ambas zonas del ojo, en el presente estudio dada que la segmentación de la imagen no está aún establecida de forma continua, el análisis del ojo se ha hecho en conjunto, es decir utilizando toda la información de los píxeles que corresponden al ojo.



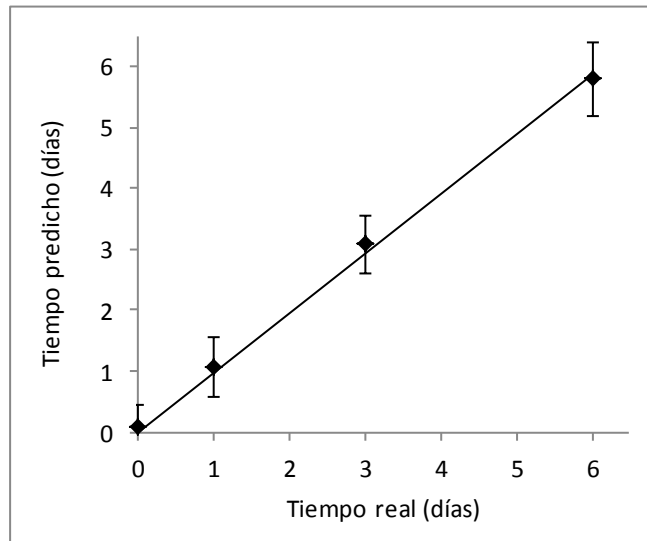
**Figura 4:** Imagen obtenida en escala de grises a partir de la información obtenida mediante la cámara multispectral.

El análisis de los espectros mediante componentes principales (figura 5), mostró como se produjeron agrupaciones espontaneas en función del tiempo de almacenamiento, siendo el número de componentes principales resultantes igual a 3 (varianza acumulada = 98,63%). La componente 1 presento una mayor varianza (88,7%), si bien la componente 2 con una varianza del 7,98% es la que discrimina las muestras en función del tiempo de almacenamiento.



**Figura 5:** Análisis de componentes principales (PCA) de las dimensiones obtenidas de la imagen hiperespectral.

Una vez evaluados los datos, estos fueron usados para desarrollar el modelo matemático de predicción del tiempo de almacenamiento. Para ello se utilizó el análisis estadístico PLS. Los resultados mostraron como solo dos componentes latentes (% de la varianza = 95.46%) fueron necesarias para obtener el modelo, siendo los tanto por cienes de la varianza para cada uno de ellos de 94.14 y de 1.18%. En la figura 6 se muestra la recta de ajuste entre los valores observados (días de almacenamiento) y predichos por el modelo. Como se puede observar se obtuvo un muy buen ajuste, siendo los valores de la suma de los errores cuadráticos para la calibración y cros-validación de 0.487 y 0.862 respectivamente y los  $R^2$  de 0.95 y 0.86 respectivamente. Además el modelo ha sido capaz de poder diferenciar las doradas, entre día 1 y día 3, lo cual no había podido ser realizado por ninguna de las técnicas no destructiva aplicadas, aunque si mediante la medida del color a través del parámetro  $a^*$ . Pero en el caso del color, las medidas tuvieron que ser tomadas bajo condiciones de laboratorio muy controladas y en discontinuo, mientras que el equipo es capaz de trabajar en condiciones no tan controladas y en línea.



\*Error cuadrático medio de calibración

**Figura 6:** Días de frescura del pescado predichos vs. observados. Barras indican valores de desviación estándar.

## • CONCLUSIONES

De las técnicas destructivas aplicadas al análisis de la frescura de dorada (Humor vítreo, NBV-T, pH y Humedad) ninguna de ellas fue capaz de diferenciar de una forma clara el tiempo de almacenamiento de las doradas, si bien todas ellas mostraron una evolución con el tiempo. Por otro lado, las medidas de color realizadas directamente sobre el ojo sí fueron capaces de diferenciar las doradas en función del tiempo de almacenamiento a través del parámetro  $a^*$ , siendo capaces de realizarlo a partir del primer día.

La aplicación combinada de la tecnología no destructiva 3D e imagen hiperespectral en la evaluación de la frescura del pescado fue capaz de clasificar las muestras en función del día de almacenamiento, pudiendo ser clasificadas las doradas con un día de almacenamiento de las de tres días. Del estudio se ha podido obtener un modelo matemático de predicción, si bien nuevos ensayos son necesarios a fin de aumentar el número de muestras que haga que el modelo sea más robusto y eficaz.

## • REFERENCIAS

- AENOR, Norma UNE EN-ISO 6887-3. (2004). Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico. Parte 3: Reglas específicas para la preparación de pescados y productos de la pesca.
- Alasalvar, C.; Taylor K.; Öksüz, A.; Garthwaite, T.; Alexis M.; Grigorakis, K. (2001). Freshness assessment of cultured sea bream (*Sparus aurata*) by chemical, physical and sensory methods, *Food Chemistry* 72, 33 -40.

- Barat, J.; Gil, L.; García-Breijo, E.; Aristoy, M.; Toldrá, F.; Martínez-Máñez, R. (2008). Freshness monitoring of sea bream (*Sparus aurata*) with a potentiometric sensor. *Food Chemistry*, 108, 681–688.
- Barat, J.; Martínez R. (2013). Evaluation of sea bream (*Sparus aurata*) shelf life using an optoelectronic nose, *Food Chemistry* 138, 1374–1380.
- Billon, J.; Ollieuz, N.; Tao, S. H. (1979). Etude d'une nouvelle dosage de l'azote basique volatile total (ABVT). *RTVA*, 149, 13-19.
- Campus, M.; Bonaglini, E.; Cappuccinelli, R.; Porcu, C.; Tonelli, R.; Roggio, T. (2011). Effect of modified atmosphere packaging on quality index method (QIM) scores of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) at low and abused temperatures. *Journal of Food Science*, 76, S185–S191.
- CEE (2005). Reglamento (CE) nº 2074/2005 de la comisión de 5 de diciembre de 2005 por el que se establecen medidas de aplicación para determinados productos (...). Sección II, Capítulo I: Valores límite de nitrógeno básico volátil total (NBVT) para determinadas categorías de productos de la pesca y métodos de análisis que deberán utilizarse. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L338, 36.
- Dowlati, M.; Saeid Mohtasebia, S.; Omida, M.; Hadi Razavic, S.; Jamzadd, M.; De la Guardia, M. (2013). Freshness assessment of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) by machine vision based on gill and eye color changes. *Journal of Food Engineering* 119, 277–287.
- Farber, L. (1965). Freshness tests. In: BORGSTROM, G. (Ed.). *Fish as food*. New York: Academic, v.IV, 66-69.
- Fuentes, A. (2008). Desarrollo de productos ahumados a partir de lubina (*Dicentrarchus labrax* L.) Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- Fuentes, A.; Fernández-Segovia, I.; Barat, J.; Serra, J. (2011). Influence of sodium replacement and packaging on quality and shelf life of smoked sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *LWT Food Science Technology* 44, 917-923.
- Fuentes, A.; García, E.; Fernández, I. (2013). Determinación del contenido en Nitrógeno Básico Volátil Total (NBVT) en pescado fresco [en línea]. Universidad Politécnica de Valencia. [riunet.upv.es](http://riunet.upv.es). [Consulta: 2 Sept. 2014].
- Fontes, M.; Esteves, A.; Caldeira, F.; Saraiva, C.; Vieira-Pinto, M. y Martins, C. (2007). Estado de frescor e qualidade higiênica do pescado vendido numa cidade do interior de Portugal. [en línea] *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 59(5), 1308-1315, [www.scielo.br](http://www.scielo.br). [Consulta: 7 Marzo. 2015].
- Goulas A. y Kontominas M. (2007). Combined effect of light salting, modified atmosphere packaging and oregano essential oil on the shelf-life of sea bream (*Sparus aurata*): Biochemical and sensory attributes. *Food Chemistry* . 100, 287-296.
- Gráu, R.; Sánchez, A.; Girón, J.; Ivorra, E.; Fuentes, A.; Barat, M. (2010). Nondestructive assessment of freshness in packaged sliced chicken breasts using SW-NIR spectroscopy. *Food Research Internacional*. Volume 44, Issue 1, 331–337.



- Grigorakis, K. (2007). Compositional and organoleptic quality of farmed and wild gilthead seabream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and factors affecting it: A review. *Aquaculture* 272, 55–75.
- Herrera, H.; Lutz, G.; Bolaños, N. (2003). *Química de alimentos: Manual de Laboratorio*. [En línea] Ed.1. San José de Costa Rica p. 81. [www.books.google.es](http://www.books.google.es), [Consulta 4 Dic. 2014].
- Huang, H.; Liu, L.; Ngadi, M. (2014). Recent Developments in Hyperspectral Imaging for Assessment of Food Quality and Safety. *Sensors*, 14, 7248-7276. [En línea] <http://www.mdpi.com/1424-8220/14/4/7248/htm>, [Consulta 5 Dic. 2014].
- ISO 4833: (2003). Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of microorganisms. Colony-count technique at 30 degrees C.
- Ivorra, E.; Girón, J.; Sánchez, A.; Verdú, S.; Barat, J.; Grau, R. (2013). Detection of expired vacuum-packed smoked salmon based on PLS-DA method using hyperspectral images. *Journal of Food Engineering*. 117(3):342-349. doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.02.022.
- Ivorra, E.; Verdú, S.; Sánchez, A.; Barat, J.; Grau, R. (2014). Continuous monitoring of bread dough fermentation using a 3D vision Structured Light technique, *Journal of Food Engineering*, 130 (2014), 8-13.
- Kelkar, S.; Stella, S.; Boushey, C.; Okos, M. (2011). Developing novel 3D measurement techniques and prediction method for food density determination. In 11th International congress on engineering and food (ICEF11), Vol. 1(0), 483-491.
- Kyranas, V.; Lougovois, V.; Valsamis, D. (1997). Assessment of shelf-life of maricultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice. *International Journal of Food Science and Technology* 32, 339-347.
- Lawrence, K.; Windham, W.; Park, B.; Buhr, R. (2003). Hyperspectral imaging system for identification of fecal and ingesta contamination on poultry carcasses. *J. Near Infrared Spectrosc.* 11, 269–281.
- Ludorff, W.; Meyer, V. (1978). Pescado y los productos de la pesca. En: Durazo E. Aprovechamiento de productos pesqueros. [En línea] Universidad de Baja California, Mexicali, 106-107. [www.books.google.es](http://www.books.google.es) [Consulta: 10 Oct. 2014].
- Malle, P.; Tao, S. (1987). Rapid Quantitative Determination of Trimethylamine using Steam Distillation. *Journal of Food Protection* 50, (9), 756-760.
- Masniyom, P. (2011). Deterioration and shelf-life extension of fish and fishery products by modified atmosphere packaging Songklanakarin *Journal of Science and Technology*, 33 (2), 181-192.
- Özogul, F.; Polat, A.; Özogul, Y., (2004). The effects of modified atmosphere packaging and vacuum packaging on chemical, sensory and microbiological changes of sardines (*Sardina pilchardus*). *Food Chemistry*. 85, 49–57.
- Pascual, M. (2000). *Microbiología Alimentaria*. [En línea] Díaz de Santos, Ed. 2 Madrid, p. 247. [www.books.google.es](http://www.books.google.es), [Consulta 4 Dic. 2014].
- Ribes, S.; Fuentes, A.; Segovia, I. (2013). Evaluación de la Vida Útil de Dorada Empleando Sensores Voltamétricos y Colorimétricos. [En línea]

- Trabajo final de Master. Universidad Politécnica de Valencia. riunet.upv.es. [Consulta 5 Dic. 2014].
- Sivertsen, A.; Kimiya, T.; Heia, K. (2011). Automatic freshness assessment of cod (*Gadus morhua*) fillets by Vis/Nir spectroscopy. *Journal of Food Engineering* 103, 317–323.
- Uyar, R., y Erdogdu, F. (2009). Potential use of 3-dimensional scanners for food process modeling. *Journal of Food Engineering*, 93(3), 337- 343.
- Verdú, S. Ivorra, E., Sánchez A., Girón J., Barat, J., Grau R. (2013). Comparison of TOF and SL techniques for in-line measurement of food item volume using animal and vegetable tissues *Food Control*, 33 (1), 221–226
- Verdú, S.; Ivorra, E.; Sánchez A.; Barat, J.; Grau R. (2015). Relationship between fermentation behavior, measured with a 3D vision Structured Light technique, and the internal structure of bread. *Journal of Food Engineering* 146, 227–233.
- Verdú, S.; Ivorra, E.; Sánchez A.; Barat, J.; Grau R. (2015b). Study of high strength wheat flours considering their physicochemical and rheological characterization as well as fermentation capacity using SW-NIR imaging. *Journal of Cereal Science* 62, 31-37.
- Yapar, A.; Yetim, H. (1998). Determination of anchovy freshness by refractive index of eye fluid. *Food Research International*, 31, 693 - 695.
- Zaragozá, P.; Fuentes, A.; Fernández-Segovia, I.; Vivancos, J.; Rizo, A.; Ros-Lis, J.; Barat, J.; Martínez-Máñez, R. (2013). Evaluation of sea bream (*Sparus aurata*) shelf life using an optoelectronic nose. *Food Chemistry*. 138(2-3): 1374-1380.
- Carrascosa, C.; Millán, R.; Saavedra, P.; Jaber, J.R.; Montenegro, T.; Raposo, A.; Pérez, E.; Sanjuán, E. (2014). Predictive models for bacterial growth in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. *International Journal of Food Science and Technology*, 49, 354–363.
- UNE 40-080, (1984). Determinación de las magnitudes cromáticas CIE. Norma española. Madrid: Instituto Español de Normalización (IRANOR).