



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

GRADO EN INGENIERÍA AGROALIMENTARIA Y DEL MEDIO RURAL

Curso 2016-2017

APLICACIÓN DE ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CERCANO PARA IDENTIFICAR ADULTERACIONES DE CACAO CON HARINA DE ALGARROBA

AUTORA: LAURA RENUNCIO GABARDA

TUTORES ACADÉMICOS: PAU TALENS OLIAG

ÉDGAR PÉREZ ESTEVE

TUTORA EXPERIMENTAL: MARIBEL QUELAL VÁSCONEZ

VALENCIA, Julio 2017



APLICACIÓN DE ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CERCANO PARA IDENTIFICAR ADULTERACIONES DE CACAO CON HARINA DE ALGARROBA

Laura Renuncio Gabarda, Maribel Alexandra Quelal Vásquez, Édgar Pérez Esteve, Pau Talens Oliag.

El cacao ha incrementado su precio en el mercado en los últimos años. Por este motivo, se sospecha que determinados comerciantes de cacao podrían estar adulterando el cacao en polvo con otros ingredientes más baratos. Entre estos ingredientes destaca la harina de algarroba por ser un producto con características similares en cuanto a color, aroma y sabor. En este contexto, el objetivo de este trabajo es evaluar la tecnología NIR combinada con un análisis multivariante, como método rápido, para la determinación cualitativa y cuantitativa de adulteración de cacao en polvo con harina de algarroba. El proceso experimental consistió en la mezcla de polvos de cacao comerciales ($n = 12$) con harina de algarroba comercial ($n = 6$) en diferentes proporciones (100 a 40%) dando como resultado un total de 216 muestras adulteradas. Los espectros de reflectancia difusa de las muestras se adquirieron a intervalos de 2 nm en un intervalo de longitud de onda de 1100 a 2500 nm utilizando un espectrofotómetro Foss NIR. Para la determinación cualitativa se realizó un análisis de componentes principales (PCA) como análisis exploratorio y un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA). El coeficiente de determinación (R^2) del modelo PLS-DA fue de 0,947 y el coeficiente de determinación de la validación (R^2_{cv}), basado en una validación cruzada completa, fue 0,875 indicando una buena calibración con buena predictibilidad. Estos resultados indican que es posible distinguir las muestras adulteradas de las muestras de polvo de cacao puras. Para el análisis cuantitativo se realizó un análisis de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS). El 70% de las muestras se utilizaron para construir el modelo y el 30% restante para la validación. El modelo de predicción PLS se obtuvo con 4 factores a R^2 de 0,98 y 0,94 y un error cuadrático medio de 2,08 y 4,26 para los conjuntos de calibración y validación, respectivamente. Estos datos han llevado a la conclusión de que la tecnología NIR combinada con análisis multivariante permite la identificación y determinación de la cantidad de polvo de cacao natural presente en una mezcla adulterada con harina de algarroba.

Palabras clave: cacao, algarroba, adulteración, espectro, NIR, análisis multivariante

Valencia, Julio 2017

APLICACIÓ D'ESPECTROSCOPIA D'INFRAROIG PRÒXIM PER A IDENTIFICAR ADULTERACIONS DE CACAU AMB FARINA DE GARROFA

Laura Renuncio Gabarda, Maribel Alexandra Quelal Vásquez, Édgar Pérez Esteve, Pau Talens Oliag.

El cacau ha incrementat el seu preu en el mercat en els últims anys. Per aquest motiu, se sospita que determinats comerciants de cacau podrien estar adulterant el cacau en pols amb altres ingredients més barats. Entre aquests ingredients destaca la farina de garrofa per ser un producte amb característiques similars pel que fa a color, aroma i sabor. En aquest context, l'objectiu d'aquest treball és avaluar la tecnologia NIR combinada amb una anàlisi multivariant, com a mètode ràpid, per a la determinació qualitativa i quantitativa d'adulteració de cacau en pols amb farina de garrofa. El procés experimental va consistir en la mescla de pols de cacau comercials ($n=12$) amb farina de garrofa comercial ($n=6$) en diferents proporcions (100 a 40%) donant com a resultat un total de 216 mostres adulterades. Els espectres de reflectància difusa de les mostres es van adquirir a intervals de 2 nm en un interval de longitud d'ona de 1100 a 2500 nm mitjançant un espectrofotòmetre Foss NIR. Per a la determinació qualitativa es va realitzar una anàlisi de components principals (PCA) com anàlisi exploratòria i una anàlisi discriminant de mínims quadrats parcials (PLS-DA). El coeficient de determinació (R^2) del model PLS-DA va ser de 0,947 i el coeficient de determinació de la validació (R^2CV), basat en una validació creuada completa, va ser 0,875 indicant una bona calibració amb bona predictibilitat. Aquests resultats indiquen que és possible distingir les mostres adulterades de les mostres de pols de cacau pures. Per a l'anàlisi quantitativa es va realitzar una anàlisi de regressió de mínims quadrats parcials (PLS). El 70% de les mostres es van utilitzar per construir el model i el 30% restant per a la validació. El model de predicció PLS es va obtenir amb 4 factors a R^2 de 0,98 i 0,94 i un error quadràtic mitjà de 2,08 i 4,26 per als conjunts de calibratge i validació, respectivament. Aquestes dades han portat a la conclusió que la tecnologia NIR combinada amb anàlisi multivariant permet la identificació i determinació de la quantitat de pols de cacau present en una mescla adulterada amb farina de garrofa.

Paraules clau: cacau, garrofa, adulteració, espectre, NIR, anàlisi multivariant

València, Juliol 2017

NEAR-INFRARED SPECTROSCOPY APPLICATION TO IDENTIFY CAROB POWDER ADULTERATIONS IN COCOA

Laura Renuncio Gabarda, Maribel Alexandra Quelal Vásconez, Édgar Pérez Esteve, Pau Talens Oliag.

Cocoa has increased its price in the market in recent years. For this reason, it is suspected that some cocoa traders may be adulterating cocoa powder with other cheaper ingredients. Among these ingredients, carob flour stands out because it is a product with similar characteristics in terms of color, aroma and flavor. In this context, the objective of this work is to evaluate the NIR technology combined with a multivariate analysis, as a fast method, for the qualitative and quantitative determination of adulteration of cocoa powder with carob flour. The experimental process consisted of the mixing of commercial cocoa powder ($n = 12$) with commercial carob flour ($n = 6$) in different proportions (100 to 40%) resulting in a total of 216 adulterated samples. The diffuse reflectance spectra of the samples were acquired at intervals of 2 nm in a wavelength range of 1100 to 2500 nm using a Foss NIR spectrophotometer. For the qualitative determination, a principal component analysis (PCA) was performed as an exploratory analysis as well as a partial least squares discriminant analysis (PLS-DA). The coefficient of determination (R^2) of the PLS-DA model was 0.947 and the validation determination coefficient (R^2_{CV}), based on a complete cross validation, was 0.875 indicating a good calibration with good predictability. These results indicate that it is possible to distinguish adulterated samples from pure cocoa powder samples. For the quantitative analysis, a partial least squares regression analysis (PLS) was performed. 70% of the samples were used to construct the model and the remaining 30% for validation. The PLS prediction model was obtained with 4 factors at R^2 of 0.98 and 0.94 and an average squared error of 2.08 and 4.26 for the calibration and validation sets, respectively. These data have led to the conclusion that NIR technology combined with multivariate analysis allows the identification and determination of the amount of natural cocoa powder present in a mixture adulterated with carob flour.

Key words: cocoa, carob, adulteration, spectrum, NIR, multivariate analysis.

Valencia, July 10th, 2017

Me gustaría agradecer en primer lugar a mis tutores Pau Talens y Édgar Pérez, por darme la oportunidad de participar en este trabajo.

Agradecer a Maribel todo lo aprendido, las horas dedicadas en el laboratorio y la ayuda recibida en estos meses.

Cabe nombrar del mismo modo a mi madre y a mis tíos Rober y Maite, ya que mi trayectoria no habría sido posible sin su apoyo y su paciencia. A mis amigos, a mis hermanos, y a Amparo y Roberto que me recuerdan cada día que después de la tormenta siempre llega la calma.

Este trabajo se lo dedico a mi padre, porque me alegra pensar lo orgulloso que estaría de poder disfrutar este momento conmigo.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 EL CACAO EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA	1
1.2 ADULTERACIÓN DE CACAO	2
1.3 FRAUDE ALIMENTARIO: DEFINICIÓN Y TIPOLOGÍAS	3
1.4 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA COMO HERRAMIENTA EN EL CONTROL DE CALIDAD	4
1.5 PRETRATAMIENTO DE ESPECTROS NIR	6
1.6 ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE LOS ESPECTROS NIR	7
2. OBJETIVOS	10
2.1 OBJETIVO GENERAL	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
2.3 PLAN DE TRABAJO	10
3. MATERIAL Y MÉTODOS	11
3.1 MATERIA PRIMA	11
3.2 DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE LAS MUESTRAS PURAS	12
3.2.1 Determinación del pH	12
3.2.2 Determinación del color extrínseco	12
3.3 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS ADULTERADAS	13
3.4 DETERMINACIÓN DEL ESPECTO NIR	13
3.5 ANALISIS ESTADÍSTICO	14
4. RESULTADOS	16
4.1. CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA	16
4.2. ANÁLISIS DEL ESPECTRO NIR	20
4.3. OBTENCIÓN DEL MODELO DE CLASIFICACIÓN	21
4.4. OBTENCIÓN DEL MODELO DE PREDICCIÓN	25
5. CONCLUSIONES	27
6. BIBLIOGRAFÍA	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Análisis de componentes principales (PCA) de las muestras no modificadas de cacao en polvo y harina de algarroba.	19
Figura 2. Espectros con datos brutos en el intervalo de 1100 a 2500 nm de cacaos en polvo (a) y harinas de algarroba (b).	20
Figura 3. Espectros de cacao y algarroba tratados con la segunda derivada en el intervalo de 1400 a 2500 nm.	21
Figura 4. NIR-PCA gráfico de puntuaciones para la separación de polvo de cacao y diferentes niveles de adulteración con harina de algarroba, nivel de adulteración alto AA (40-60%), nivel medio AM (20-40%) y nivel bajo AB (0-20%).	22
Figura 5. Gráfico de dispersión NIR PLS-DA de la variable latente 1 y 2, para las muestras de cacao puro (marrón), algarroba pura (gris) y cacao adulterado (azul).	24
Figura 6. Valores predichos frente a valores medidos del porcentaje de adulterante (n = 134) para el cacao puro, la harina de algarrobo y las muestras adulteradas.	26

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. División de la región infrarroja del espectro	5
Tabla 2. Características de procesamiento de las distintas muestras de cacao incluidas en este estudio.....	11
Tabla 3. Características de las distintas muestras de algarroba incluidas en el estudio.	12
Tabla 4. Parámetros del color y pH (valor \pm DS) para las muestras de cacao.....	17
Tabla 5. Parámetros del color y pH (valor \pm DS) para las muestras de algarroba.	18
Tabla 6. Precisión de la clasificación del modelo realizada con el modelo PLS-DA.....	24
Tabla 7. Resultados de los modelos PLS para predecir el porcentaje de adulteración usando EMSC, SNV, Savitzky-Golay y datos sin pretratamiento, utilizando todos los datos divididos en un conjunto de calibración y uno de validación.....	25

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El cacao en la industria alimentaria

El cacao es el ingrediente principal del chocolate. Esto lo convierte en una materia prima de gran aplicación en la industria alimentaria. El cacao que consumimos se obtiene a partir de la semilla o haba de cacao. El árbol del Cacao (*Theobroma Cacao*) se cultiva en zonas tropicales en torno a 10° N y 10°S del Ecuador, siendo los mayores productores Costa de Marfil, Ghana, Brasil, Nigeria y Camerún (Prabhakaran Nair, 2010). Actualmente la producción mundial de cacao está en torno a los 4,5 millones de toneladas, valor que se ha visto incrementado en un 26,7% desde el año 2000 (Sunoj *et al.*, 2016; Faostat, 2017).

El color y el aroma son las dos características más significativas del cacao utilizándose en la industria para proporcionar a otros productos estas cualidades (Ainia Centro Tecnológico, 2012) pero también destacan otros aspectos como el tamaño de partícula del polvo, el contenido de grasa, el pH, o la alcalinidad. El uso del cacao como colorante ha ganado importancia como consecuencia de la restricción de los colorantes artificiales en muchos países.

Para obtener esta capacidad colorante el cacao se alcaliniza utilizando soluciones de carbonato de sodio o potasio en cantidades inferiores a 50 g por cada kg de cacao. Dependerá del color deseado el grado de alcalinización al que será sometido, cuanto más alcalinizado más intenso será el color. En algunas ocasiones, los consumidores relacionan el color marrón de un alimento con el sabor a chocolate, y a medida que se oscurece se relacionan con un sabor más intenso (Ainia Centro Tecnológico, 2012).

La alcalinización produce en las muestras reducción de la acidez y la astringencia y aumenta el aroma mejorándolo (González *et al.*, 2012). También mejora la reacción entre el calor y el pigmento apareciendo colores desde marrón claro a rojo, y en ocasiones colores muy oscuros; e influye en la reacción entre proteínas y azúcares mejorando el sabor (Dyer, 2003).

Dependiendo del grado de alcalinización al que se somete el cacao se puede categorizar en cuatro grupos diferentes. El polvo de cacao natural tiene pH entre 5,0 y 6,0, es ácido y un poco astringente presentando un color que tiende hacia el amarillo. Cuando el cacao es sometido a un grado bajo de alcalinización aumenta su pH, oscilando entre 6,0 y 7,2, y oscurece el color. La alcalinización suaviza el sabor del chocolate eliminando la acidez y la astringencia característica del cacao natural. Del mismo modo la alcalinización también mejora la humectabilidad y dispersabilidad frente a los cacaos naturales. Los cacaos sometidos a un

grado medio de alcalinización presentan un pH entre 7,2 y 7,6, y, por último, los cacaos fuertemente alcalinizados presentan un color muy oscuro y son muy utilizados en repostería. Su sabor es muy intenso y tiene un ligero toque amargo, con pH mayor que 7,6 (Miller *et al.*, 2008; ADM Cocoa, 2010).

1.2 Adulteración de cacao

Junto al petróleo y el café, el cacao es uno de los productos más valiosos del mundo comercial (Lukas & Suter, 2012). Entre las cualidades que contribuyen a su alta popularidad se encuentra su agradable aroma y sabor característico, así como los numerosos beneficios que puede aportar a la salud: propiedades antioxidantes, efectos analgésicos, antitrombóticos, antiinflamatorios, inmunitarios, antimicrobianos y vasodilatadores (Miller *et al.*, 2008).

El aumento del uso por parte de la industria alimentaria, y el incremento subsiguiente en los precios, ha incentivado a la industria a buscar sustitutos que disminuyeran el coste de producción (Fadel *et al.*, 2006).

El apreciado sabor del cacao ha hecho que la industria del sabor busque compuestos característicos para así poder trabajar con sustitutos. Algunos de los productos que se han propuesto para la sustitución han sido las raíces de la achicoria y la algarroba (Fadel *et al.*, 2006). Las vainas de algarroba se caracterizan por tener un alto contenido en azúcar (alrededor del 50%) compuestas esencialmente por sacarosa. Esta característica ha permitido introducirlo en la industria alimentaria como un polvo para endulzar, con sabor y apariencia similar a la del polvo de cacao (Bengoechea *et al.*, 2008). Este alto contenido en azúcares favorece que durante el tostado de la misma se produzcan las mismas reacciones químicas que durante el tostado y alcalinización del cacao: caramelización del alto contenido en azúcares y reacciones de Maillard entre aminoácidos y azúcares (Ziegleder, 1998; Fadel *et al.*, 2006). De esta manera, la algarroba tostada puede aportar aromas similares al del cacao (Ziegleder, 1998).

La algarroba (*Ceratonia siliqua* L) es una especie arbórea de la familia de las fabáceas cultivada en el área mediterránea desde la antigüedad (Bengoechea *et al.*, 2008). Además de requerir escasas labores de cultivo, el procedimiento de postcosecha y su posterior procesado en la industria es mínimo, por lo cual el coste de producción es relativamente bajo y su precio de venta también lo es. Hoy en día se considera un cultivo económicamente importante debido a la demanda que tiene para diferentes usos industriales (Bengoechea *et al.*, 2008).

A partir de la vaina de algarrobo se pueden obtener dos productos de gran importancia en la industria: los propios granos de algarrobo, de donde se extrae la goma o garrofín, representando alrededor del 10% del peso de la vaina, y la restante que se utiliza para forraje de animales, principalmente rumiantes (Bulca, 2016).

Así mismo, cada vez es más frecuente el uso de la algarroba en la dieta humana. La producción mundial de extracto de algarroba es aproximadamente 315000 toneladas por año, siendo España la principal productora y exportadora (42%), seguida de Turquía (Bulca, 2016).

La gran similitud aromática y visual entre la harina de algarroba (natural o tostada) y el cacao (natural y alcalinizado) ha provocado que algunos comerciantes hayan visto en la venta de algarroba (precio medio de 810 euros/Tn) como cacao (1760 euros/Tn), omitiendo esta sustitución, una opción rentable para incrementar sus beneficios (ICCO, 2017; Arias y Zapata, 2017).

Teniendo en cuenta que el control de la calidad de los productos alimenticios es cada vez más importante, las autoridades nacionales e internacionales están estableciendo niveles de calidad para ciertos productos (Garrigues y Guardia, 2007). La Unión Europea define el cacao o cacao en polvo como el producto obtenido por la transformación en polvo de granos de cacao limpios, descascarillados y tostados y que contenga un 20 % como mínimo, de manteca de cacao, calculado sobre el peso de la materia seca, y, como máximo, un 9 % de agua (PARLAMENTO EUROPEO, 2000). Esta definición servirá en futuras pruebas como referente para detectar si el producto con el que nos encontramos es puro, o por el contrario, ha sufrido modificaciones.

1.3 Fraude alimentario: definición y tipologías

El fraude alimentario abarca la sustitución deliberada e intencional, adición, manipulación o falsificación de alimentos, ingredientes alimenticios o envasado de alimentos, etiquetado, información sobre productos o declaraciones falsas / engañosas sobre un producto con fines económicos (Plavinet y Jolivet, 2006). Existen diferentes formas de adulteración dependiendo del método empleado:

- La dilución es el proceso de mezclar un ingrediente líquido con un alto valor con un líquido de menor valor.
- La sustitución es el proceso de reemplazar un ingrediente o parte del producto de alto valor con otro ingrediente o parte del producto de menor valor.

- El ocultamiento es el proceso de disimular la baja calidad de un ingrediente o producto alimenticio.
- El etiquetado incorrecto es el proceso de colocar declaraciones falsas en los envases para obtener ganancias económicas.
- La mejora no aprobada es el proceso de agregar materiales desconocidos y no declarados a los productos alimenticios con el fin de mejorar sus atributos de calidad.
- La falsificación es el proceso de copiar el nombre de la marca, el concepto de envasado, la receta o el método de procesamiento entre otros, de los productos alimenticios para el beneficio económico (SSAFE, 2015).

A pesar de que el fin principal es económico, también supone un peligro para la salud de los consumidores, ya que desconocen las nuevas características del producto, así como los riesgos toxicológicos o higiénicos que ha podido plantear su manipulación (Moore *et al.*, 2012).

El fraude alimentario también supone una desventaja para los competidores que comercializan el mismo producto sin haberlo alterado (Plavinet y Jolivet, 2006), ya que el producto que ofrecen tendrá un precio más elevado y será menos competitivo de cara a los posibles compradores, perjudicando de la misma forma tanto a los compradores profesionales del producto como a los distribuidores e industriales.

1.4 Espectroscopía infrarroja como herramienta en el control de calidad

Una opción para determinar la autenticidad de la materia prima es someter al producto a análisis composicionales. Actualmente la concentración de los principales principios inmediatos de la materia prima que llega a una industria (carbohidratos, proteínas, grasa, fibra, vitaminas, polifenoles, perfil de aminoácidos...) se realiza a través de laboratorios externos, lo que además de costoso retrasa el proceso de producción (Lukas y Suter, 2012). Es por ello que cada vez resulta más necesaria la sustitución de los métodos tradicionales (físicos, químicos y biológicos) por métodos que supongan una reducción del tiempo y el dinero invertido en la determinación de las características de los alimentos (Peiris *et al.*, 1998).

Hoy en día podemos encontrar una gran diversidad de métodos no destructivos utilizados por las industrias para determinar parámetros de calidad (Valente *et al.*, 2009). Entre ellos, la espectroscopia infrarroja es capaz de establecer la interacción de la radiación electromagnética con la materia, siendo por tanto una herramienta adecuada para la investigación y el desarrollo de sistemas de control de calidad de productos (Garrido, 1997).

La región infrarroja del espectro electromagnético se extiende entre el final de la zona visible y el inicio de la región de microondas, y se divide en 3 zonas (Tabla 1):

Tabla 1. División de la región infrarroja del espectro.

Región	Longitud de onda (nm)	Origen de la absorción
Infrarrojo Cercano (NIR)	700-2500	Sobretonos y bandas de combinación de vibraciones moleculares fundamentales
Infrarrojo Medio (MIR)	2500-50000	Vibraciones moleculares fundamentales
Infrarrojo Lejano (FIR)	50000-10 ⁶	Rotaciones moleculares

La espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR), es una metodología analítica rápida, no destructiva ni contaminante y de gran exactitud siempre que se sigan los procedimientos adecuados para crear las ecuaciones de calibración. En los últimos años se han desarrollado numerosas aplicaciones de la espectroscopía NIR para evaluar la composición, el procesamiento y certificación de la calidad de alimentos tanto para alimentación humana como para la alimentación animal (Alomar, 1998; Jiang *et al.*, 2011).

Este método utiliza la región del infrarrojo cercano y se basa en la reacción de la luz que incide sobre la muestra, siendo una parte de los fotones transmitida a través de esta y el resto absorbida por la muestra. Cada grupo funcional de una molécula muestra una absorción característica a longitudes de onda específicas. Por tanto, los espectros NIR representan la huella molecular del material de ensayo que puede utilizarse para verificar la naturaleza de la muestra, ya sea cuantitativamente, es decir, detectar y cuantificar la cantidad de un adulterante, o cualitativamente, discriminando y prediciendo la naturaleza real de una muestra desconocida (Capuano *et al.*, 2015). La absorción de energía produce que los principales enlaces constituyentes de la estructura básica de las sustancias orgánicas, Carbono e Hidrógeno (C-H), Oxígeno e Hidrógeno (O-H) y Nitrógeno e Hidrógeno (N-H), vibren en distintas formas (Givens y Deaville, 1990; Osborne, 2000).

Las ventajas notables de la espectroscopia de infrarrojo cercano sobre las técnicas analíticas tradicionales son que es incomparablemente más rápido y proporciona mayor rendimiento. Esto es aún más cierto si se considera que varios parámetros (no sólo composición química, sino también propiedades físicas y atributos de calidad) se pueden estimar simultáneamente a partir del mismo espectro y la información contenida en un

espectro NIR. Otra ventaja notable es que al ser un análisis no destructivo lo hace adecuado para el control de calidad en línea. La espectroscopia NIR también es respetuoso con el medio ambiente porque no requiere el uso de disolventes y productos químicos y no produce residuos (Capuano *et al.*, 2015).

Por último, el uso rutinario de los instrumentos NIR de la preparación de la muestra para su análisis (cuando sea necesario) para la adquisición del espectro es extremadamente simple y sólo requiere personal mínimamente capacitado (Capuano *et al.*, 2015).

1.5 Pretratamiento de espectros NIR

El problema que aparece en los resultados obtenidos a partir del NIR es que los espectros contienen bandas ampliamente superpuestas, por lo que es necesario utilizar métodos de pretratamiento para el análisis cuantitativo. La selección de un preprocesamiento adecuado de los espectros es un paso importante en el desarrollo del modelo. El preprocesamiento de los espectros incluye principalmente la normalización, la derivación, el suavizado y la corrección del efecto multiplicativo de dispersión y la corrección de la señal ortogonal. A continuación, se describen algunos de los principales tipos de preprocesamiento más utilizados para la aplicación de la espectroscopía NIR al control de calidad de los alimentos.

-La Variable Normal Estándar (SNV, Standard Normal Variate) se utiliza en la corrección de los efectos de tamaño de partícula. Este método se aplica individualmente a cada espectro sin depender de uno de referencia. El procedimiento consiste en centrar cada espectro restando el valor medio de absorbancia del espectro a cada uno de los valores de absorbancia de cada longitud de onda, dividiendo el resultado por la desviación estándar del espectro (Peguero, 2010).

-El suavizado (*Smoothing*) se aplica en aquellos casos en los que el promediado de espectros no es suficiente ya que la relación señal/ ruido es pequeña. En este caso existen algunos algoritmos matemáticos que, aplicados al espectro, reducen el ruido suavizando la señal (Horlick, 1972)

-La derivación es uno de los parámetros más utilizados en espectroscopía para minimizar desviaciones en la línea base. La baja diferenciación que presentan los espectros puede mejorar derivando los espectros, permitiendo aumentar las diferencias entre las bandas anchas y solapadas del espectro. La utilización de la primera derivada elimina los términos

constantes a todas las longitudes de onda, es decir, desplazamientos de línea base, mientras que la segunda derivada corrige además las desviaciones causadas por los términos que varían linealmente con la longitud de onda. La aplicación de las derivadas permite un aumento de la resolución de bandas, pero por el contrario aumenta la relación señal/ruido. Uno de los métodos más utilizados para el cálculo de derivadas es el propuesto por Savitzky-Golay, que incluye un suavizado previo a la derivación (Barnes *et al.*, 1989).

-La corrección del efecto multiplicativo de dispersión (EMSC, Extended Multiple Scatter Correction) tiene la finalidad de corregir desplazamientos espectrales debidos al diferente tamaño de partícula de la muestra. Es por lo tanto un método muy utilizado en NIR, ya que este efecto se presenta en medida de reflectancia. La corrección se lleva a cabo aplicando a cada espectro original los parámetros de la recta obtenida por mínimos cuadrados representando los valores de absorbancia de un intervalo de longitudes de onda no absorbe frente a los valores de absorbancia de un espectro de referencia. Su principal inconveniente es que, si el conjunto de espectros originales es modificado, el espectro de referencia cambia, por lo que los parámetros de la recta obtenida deben recalcularse de nuevo (Geladi *et al.*, 1985).

- La corrección de la señal ortogonal (OSC, Orthogonal Signal Correction) permite suprimir toda la información contenida en los espectros que no está correlacionada con la cualidad a definir. Su aplicación permite obtener modelos de calibración más simples.

Para encontrar un método de preprocesamiento adecuado, se estudia el impacto del preprocesamiento de datos en la obtención de un modelo de calibración final mejorado, con una mayor capacidad de predicción y robustez (Jiang *et al.*, 2011).

Para la calibración del espectrofotómetro de infrarrojo cercano, se relaciona mediante un algoritmo la información espectral (óptica) con la información de la composición físico-química (método de referencia) a través del empleo de modelos estadísticos como los componentes principales (PCA) y los cuadrados mínimos parciales (PLS).

1.6 Análisis multivariante de los espectros NIR

La disciplina que aplica estos métodos matemáticos para calcular a partir de datos instrumentales diferentes propiedades de una muestra es la quimiometría. Ésta tiene un amplio campo de aplicación, destacando en la industria alimentaria, química, de procesos y en estudios ambientales (Alciaturi *et al.*, 2003).

Los métodos instrumentales de análisis utilizados en la actualidad facilitan la recopilación de un considerable número de datos, dando resultados a partir de las relaciones entre la señal obtenida y una propiedad del sistema estudiado. A partir de una serie de técnicas y métodos en los que se utiliza la espectroscopía y la cromatografía podemos obtener un gran número de datos analíticos acerca de diferentes componentes de una muestra y estudiar en conjunto las diferentes variables medidas u observadas en un grupo de individuos. Estas variables pueden ser de carácter cualitativo, cuantitativo, o al mismo tiempo de ambos tipos (Miller y Miller, 2000; Remis y García, 2001; Alciaturi *et al.*, 2003).

Los datos multivariantes presentan un inconveniente, y es que su volumen total puede dificultar la identificación de pautas y relaciones. Es por ello, que el objetivo de algunos de los métodos de análisis multivariante es la disminución del número de datos. A menudo se presenta correlación entre las variables, de forma que parte de la información resulta redundante (Miller y Miller, 2000).

El análisis de componentes principales, conocido por sus iniciales en inglés PCA, es una técnica que permite disminuir el número de datos cuando existe correlación entre ellos. Es por ello, que no es una técnica apropiada cuando no aparece correlación entre las variables (Miller y Miller, 2000).

El objetivo que persigue el PCA es buscar combinaciones lineales de las variables origen que explican cada muestra permitiendo así conocer las componentes principales. Las variables obtenidas, a diferencia de las variables originales, no tendrán correlación entre ellas. El número de componentes principales se definirá de forma que la mayor parte de la variación existente en el conjunto de datos vendrá explicada por la primera componente principal (CP1), la segunda (CP2) explicará la siguiente mayor parte de la variación presente en el conjunto de datos, y así sucesivamente. Cuando exista alta correlación entre las variables, el número de componentes principales útiles será menor respecto al número de variables que teníamos en un principio (Miller y Miller, 2000). Para conocer el número de componentes principales que son necesarias para valorar que los parámetros han sido correctamente ajustados, es apropiado tener unos principios en los que apoyarse. La evaluación del número correcto de componentes principales se puede realizar en base a estas pautas (Remis-Ramos y García-Álvarez-Coque, 2001):

- Por la cantidad de fuentes con importancia de varianza. El número de componentes que hace falta para sostener el modelo es menor que el número de fuentes significativas de varianza existente en los datos originales.

- Por el porcentaje positivo de varianza explicada acumulada, que debe ser como mínimo del 65%. Este número cambiará según el tipo de problema planteado, pero es una herramienta práctica cuando se trabaja con problemas en los que esta cantidad se ha definido con anterioridad.

- A partir del estudio gráfico de las varianzas explicadas. Normalmente, este tipo de gráficos vienen representados por una zona en la que aparece un pronunciado descenso, y a partir de entonces se atenúa. El número óptimo de componentes es el correspondiente al punto en el que el gráfico cambia del descenso brusco al gradual. El problema que aparece en este método es que, en ocasiones, este punto no es muy pronunciado y la decisión resulta poco objetiva.

Otro de los métodos más utilizados en quimiometría es el método de mínimos cuadrados parciales, conocido por sus siglas en inglés PLS (“partial least squares”). Este método trata de determinar las combinaciones lineales de las variables independientes que mejor configuran las variables dependientes. A partir de este método es posible trabajar con un gran número de datos cuando existen variables correlacionadas (Alciaturi *et al.*, 2003).

Este método está muy conectado con el análisis de componentes principales (PCA). Ambos tienen la ventaja de incluir todas las variables significativas en el modelo partiendo de la hipótesis de que los sistemas estudiados están basados en un número reducido de variables latentes, es decir, de componentes principales, lo que supone una ventaja frente a otros métodos multivariantes (Alciaturi *et al.*, 2003).

El método adquiere a partir de variables independientes una matriz de variables latentes, cuyos vectores son linealmente independientes. Cuando se den situaciones en las que exista un alto grado de variables independientes se obtendrá un modelo simplificado. La información más significativa es explicada por las primeras componentes principales, y las últimas explicarán el “ruido”. Cuando aparezca exceso de información entre las variables, este método conseguirá reducir el ruido expuesto (Alciaturi *et al.*, 2003).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo general del trabajo es identificar y cuantificar la adulteración del cacao con harina de algarroba mediante el empleo de espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para lograr el objetivo general se plantearon distintos objetivos específicos durante la realización de este trabajo:

- Seleccionar una colección de muestras de cacao en polvo y algarroba que recojan la variabilidad habitual en cuanto a procesado de muestras (grado de tostado, grado de alcalinización...)
- Adulterar el cacao puro con harinas de algarroba a diferentes niveles.
- Realizar las mediciones del espectro NIR.
- Analizar el espectro mediante estadística multivariante utilizando componentes principales (PCA), regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) y mínimos cuadrados parciales discriminante (PLS-DA).

2.3 PLAN DE TRABAJO

Para la consecución de los objetivos se llevó a cabo una planificación del trabajo con tareas específicas:

- Seleccionar doce muestras diversas y significativas de cacao en polvo donado por una empresa y conseguir seis muestras diferentes de harina de algarroba habituales en el mercado.
- Definir el tamaño de muestra a analizar
- Realizar la adulteración del cacao
- Obtención de los espectros de infrarrojo de las muestras mediante un espectrofotómetro NIR (Foss 5000)
- Realizar un análisis estadístico multivariante utilizando componentes principales y regresión de mínimos cuadrados lineales para clasificar y cuantificar el nivel de adulteración.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MATERIA PRIMA

Las muestras de cacao utilizadas para este estudio fueron adquiridas directamente de un proveedor que garantiza que el producto no ha sufrido adulteración (Olam Food Ingredients Spain, Cheste, España). En el conjunto de las doce muestras se diferencian cuatro grupos según su grado de alcalinización (tabla 2): tres muestras de cacao natural (CN), tres muestras de cacao alcalinizado suave (CAS), tres muestras de cacao alcalinizado medio (CAM) y tres muestras de cacao alcalinizado fuerte (CAF). La información referente a otros datos de procesado y características de la materia prima no está disponible por ser confidencial de la empresa.

Tabla 2. Características de procesado de las distintas muestras de cacao incluidas en este estudio

CÓDIGO	GRADO ALCALINIZACIÓN	CARACTERÍSTICAS PROCESADO
CN1, CN2, CN3	Natural	Muestras no alcalinizadas
CAS1, CAS2, CAS3	Alcalino Suave	Concentración de álcali 1-3 %
CAM1, CAM2, CAM3	Alcalino Medio	Concentración de álcali 3-5 %
CAF1, CAF2, CAF3	Alcalino fuerte	Concentración de álcali 5-7 %

Como adulterante se utilizaron seis muestras de harina de algarroba con diferentes grados de tostado. Las diferentes muestras fueron adquiridas en mercados especializados en este tipo de productos. En tres de las muestras la etiqueta del producto indicaba el grado de tostado: harina de algarroba con grado de tostado bajo (ATB), harina de algarroba con grado de tostado medio (ATM) y harina de algarroba con grado de tostado alto (ATA). Del resto de las muestras se desconoce su grado de tostado, ya que es una información que no es obligatoria incluir en la etiqueta del producto. La tabla 3 muestra la información disponible de muestras a partir de su etiqueta.

Tabla 3. Características de las distintas muestras de algarroba incluidas en el estudio.

CÓDIGO	MARCA	CARACTERÍSTICAS PROCESADO	ORIGEN
ATA	CAROCHOC	Alto grado de tostado	Turis-Silla, s/n 46389 TURIS (Valencia-España)
ATM	CAROCHOC	Medio grado de tostado	Turis-Silla, s/n 46389 TURIS (Valencia-España)
ATB	CAROCHOC	Bajo grado de tostado	Turis-Silla, s/n 46389 TURIS (Valencia-España)
AN1	Rincón de Segura		Villares, Elche de la Sierra (Albacete)
AN2	Ecorganic ecomarket vive Bio	Tostada	Comunidad Valenciana
AN3	Biogoret	Light	Biosan SCCL Pol. Ind. Camins Nous 3. 43740 Mora de Ebre

3.2 DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE LAS MUESTRAS PURAS

3.2.1 Determinación del pH

Para la determinación del pH extractable se utilizó el método descrito en el manual de Zaan para análisis del cacao (ADM Cocoa, 1999) con algunas modificaciones. Se pesaron 5 g de cada muestra a los cuales se les añadieron 50 mL de agua a 80°C y se agitó. A continuación, la temperatura se redujo hasta 20-25 °C con un baño de agua fría y se realizaron las mediciones con un pH-metro digital micro pH 2001 (Crison Instruments, S.A., Barcelona, Spain). Todas las muestras se analizaron por triplicado.

3.2.2 Determinación del color extrínseco

La determinación del color se realizó del producto seco en polvo. La muestra a analizar se introdujo dentro de una cubeta de cuarzo de 1mm de espesor y se compactó mediante sucesivos golpes suaves. La medida se realizó con el espectrocolorímetro CM-3600d (Konica Minolta, Tokio, Japón) utilizando como referencia el iluminante estándar D65 y el observador 10°. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado.

A partir de las coordenadas $L^*a^*b^*$ obtenidas midiendo el espectro de reflexión se calcularon el tono (h_{ab}^*) y el croma (C_{ab}^*) aplicando las siguientes ecuaciones (Chiralt *et al.*, 2007):

$$h_{ab}^* = \arctg \frac{b^*}{a^*}$$

$$C_{ab}^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$$

3.3 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS ADULTERADAS

Partiendo de un total de 12 muestras puras de cacao con diferentes grados de alcalinización y 6 muestras puras de harina de algarroba con diferentes grados de tostado se prepararon un total de doscientas dieciséis muestras adulteradas en una escala entre 0 y 60%, diferenciando tres niveles dentro de los cuales el porcentaje exacto de adulteración era aleatorio con una distribución uniforme: grado alto de adulteración (40-60% de harina de algarroba), grado medio de adulteración (20-40% de harina de algarroba) y grado bajo de adulteración (0-20% de harina de algarroba).

Para seleccionar el conjunto de muestras de nuestro modelo se utilizó el método de hipercubo latino, que a partir de un número relativamente pequeño de muestras seleccionadas al azar dentro de un rango de probabilidad establecido, captura la mayor parte de la variabilidad de datos sin necesidad de medir todas las posibles variaciones (Xu *et al.*, 2005).

Para pesar las muestras y realizar las mezclas se utilizó una balanza analítica de cuatro dígitos modelo KERN EG220-3NM (Kern & Sohn GmbH, D-72336 Balingen, Germany). Se realizaron muestras de 15 gramos que fueron introducidas en botes de plástico cerrados herméticamente y etiquetados según la categoría perteneciente. Las muestras se conservaron en un ambiente oscuro, fresco y seco hasta su análisis por espectroscopía NIR.

3.4 DETERMINACIÓN DEL ESPECTO NIR

Se introdujeron 5 gramos de la muestra dentro de una cápsula circular de plástico de 5 cm de diámetro con una ventana de cuarzo de 3,8 cm de diámetro. A continuación, se deposita en el dispositivo y después de 20 segundos se obtienen las medidas espectrales. Se obtiene valores cada 2 nm de intervalo lo que hace un total de 700 datos por muestra. Los datos de reflectancia (R), el equipo los transforma automáticamente en valores de absorbancia

(logaritmo de $1/R$), para obtener una correlación lineal con la concentración de los constituyentes químicos del producto (Hernández *et al.*, 2006; Shao *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009).

Cada preparación se midió por duplicado en dos cápsulas diferentes para aumentar la representatividad. Obteniendo un total de 468 espectros, 36 de las muestras puras y 432 de las muestras adulteradas.

3.5 ANALISIS ESTADÍSTICO

El tratamiento estadístico de la base de datos se realizó mediante el software estadístico Unscramber v10.4 (CAMO Software AS, OSLO, Noruega).

Los espectros obtenidos para las distintas muestras en los análisis se estructuraron en una matriz en la que las filas representan las 264 muestras y las columnas representan las 700 longitudes de onda a las que se realizó la medida.

Previo al análisis estadístico, los datos obtenidos fueron pretratados mediante una segunda derivada, con el objetivo de reducir y eliminar ruido de los espectros.

Con el objetivo de conocer cuáles eran las variables que más influencia tenían en el modelo, se realizó un análisis de componentes principales (PCA).

Para la evaluación cualitativa, se realizó un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA). La validación cruzada se realizó para seleccionar el número óptimo de factores y evitar el sobreajuste. Las ecuaciones de regresión se obtuvieron usando varios tratamientos matemáticos utilizando la segunda derivada, diferente número de datos en el segmento utilizado para calcular la derivada. La mejor ecuación se seleccionó atendiendo al coeficiente de determinación (R^2) y la raíz media del error cuadrado de la validación cruzada (RMSECV) y el porcentaje de precisión de la clasificación mediante un conjunto de validación externa (Zomeño *et al.*, 2011).

Para la evaluación cuantitativa se realizó un análisis de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) utilizando los datos espectrales como variables predictoras y el grado de adulteración como variable respuesta. El modelo se ajustó separando aleatoriamente las muestras en dos poblaciones, una población con el 70% de las muestras (N=334) se utilizó para la creación y evaluación del modelo mediante validación cruzada, mientras que la otra

población, con el 30% de las muestras restantes (N=134) se utilizó como conjunto de predicción.

Se evaluó el rendimiento de los modelos a partir de los valores obtenidos del error de la raíz cuadrada de la media de calibración (RMSEC), la raíz media del error cuadrado de la validación cruzada (RMSECV), el error de la raíz cuadrada de la media de la predicción (RMSEP), el coeficiente de determinación (R^2) y el número de variables latentes requeridas (#LV).

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA

Las 12 muestras de cacao y las 6 muestras de harina de algarroba fueron caracterizadas de acuerdo a su valor de pH y coordenadas de color (L^* , C^* y h^*) con el objetivo de esclarecer las similitudes/diferencias entre ambos tipos de materias primas.

Los valores de pH obtenidos (Tabla 4) oscilaron entre 5,3 (CN1) y 7,9 (CAF3). Como puede observarse, el valor de pH aumenta en proporción al grado de álcali de la muestra. Por ello, los valores de pH pueden utilizarse como un indicador del grado de alcalinización ocurrido en la producción debido a que el valor de pH del polvo de cacao está relacionado con la cantidad y el tipo de álcali utilizado en el proceso (De Zaan Cocoa, 2013). Atendiendo a estos valores y siguiendo la clasificación de Miller *et al.* (2008) las muestras fueron clasificadas en cuatro categorías: cacao natural (pH 5-6), cacao alcalinizado suave (pH 6-7,2), cacao alcalinizado medio (pH 7,2-7,6) y cacao alcalinizado fuerte (pH >7,6). Estos valores confirman que, durante la selección de materias primas, se seleccionaron cacaos en todo el rango posible de alcalinización y por tanto en todo el rango posible de colores. Por otra parte, la clasificación definida en el laboratorio se ajusta con la clasificación explicada en el etiquetado de los productos.

Los valores de luminosidad (L^*) medidos en las muestras de cacao oscilan entre 31 (CAF1) y 50 (CN3). El valor máximo de luminosidad aparece en una muestra de cacao natural (CN3). El valor de L^* disminuye progresivamente en función del grado de alcalinización hasta alcanzar el valor mínimo en las muestras fuertemente alcalinizadas (CAF) que presentan color muy oscuro. Las diferencias observadas en la luminosidad en las muestras de cacao natural (CN1, CN2 y CN3) podrían ser debidas a un origen geográfico diferente, a un distinto procesado en las etapas de fermentación o tostado (Afoakwa *et al.*, 2014) o por tener diferente contenido en grasa, debido a que la grasa absorbe luz.

Los valores de pureza, C^* , varían entre 11 (CAF1) y 22 (CN2). A medida que el cacao es sometido al proceso de alcalinización la pureza de color disminuye.

El tono (h^*), a diferencia del resto de parámetros, no sigue una relación lineal con el incremento en el valor de pH. Las muestras de cacao evolucionan desde un tono más amarillo-naranja ($h^*=60$), hasta tonos más naranja-rojizos ($h^*=43$) en las muestras alcalinizadas.

Tabla 4. Parámetros del color y pH (media±DS) para las muestras de cacao.

Producto	Parámetros del color					
	L*	a*	b*	C*	h*	pH
CN1	48,7±0,2 ^e	10,41±0,13 ^{cd}	17,2±0,5 ^c	20,1±0,5 ^{de}	58,8±0,4 ^c	5,39±0,01 ^a
CN2	48,33±0,13 ^e	11,35±0,13 ^{cd}	19,2±0,4 ^c	22,3±0,4 ^{de}	59,5±0,3 ^c	5,46±0,01 ^b
CN3	50,3±0,6 ^e	11,1±0,4 ^{cd}	19,22±0,96 ^c	22,19±1,02 ^{de}	60,0±0,4 ^c	5,70±0,01 ^b
CAS1	42,3±0,6 ^c	13,1±0,3 ^{cd}	18,2±0,6 ^b	22,4±0,7 ^{cd}	54,3±0,4 ^c	6,90±0,01 ^c
CAS2	44,2±0,5 ^c	10,7±0,3 ^{cd}	15,27±1,01 ^b	18,63±1,02 ^{cd}	55,0±0,9 ^c	6,96±0,01 ^c
CAS3	41,7±0,5 ^b	11,5±0,2 ^{cd}	16,13±0,11 ^a	19,80±0,13 ^{bc}	54,5±0,5 ^c	6,98±0,01 ^d
CAM1	44,9±1,5 ^c	10,2±0,8 ^{cd}	14,9±1,6 ^b	18±2 ^{cd}	55,7±0,6 ^c	7,24±0,01 ^c
CAM2	41,9±0,7 ^b	10,6±0,2 ^{cd}	14,6±0,6 ^a	18,0±0,6 ^{bc}	54,2±0,5 ^c	7,34±0,01 ^d
CAM3	35,85±1,05 ^b	11,7±0,5 ^{cd}	10,9±0,7 ^a	16,0±0,8 ^{bc}	43,0±0,6 ^c	7,43±0,01 ^d
CAF1	32,1±0,8 ^a	8,0±0,5 ^c	8,4±0,8 ^a	11,6±0,9 ^b	46,5±0,6 ^c	7,81±0,01 ^e
CAF2	39,4±0,5 ^a	12,3±0,4 ^c	15,4±0,9 ^a	19,76±0,99 ^b	51,4±0,8 ^c	7,84±0,01 ^e
CAF3	40,1±0,2 ^a	10,3±0,3 ^c	13,8±0,8 ^a	17,3±0,8 ^b	53,2±0,6 ^c	7,92±0,01 ^e
α	***	***	***	***	***	***

* Letras iguales en una misma columna indican que pertenecen a grupos homogéneos. Nivel de significación (α): ***: $p < 0.001$. Cacao Natural (CN), Cacao alcalino suave (CAS), Cacao alcalino medio (CAM), cacao alcalino fuerte (CAF).

De igual manera que se caracterizaron las muestras de cacao, se caracterizó las muestras de harina de algarroba. Los valores del color y pH extractable del análisis del conjunto de muestras de algarroba se muestran en la tabla 5.

El valor del pH medido en las muestras de algarroba oscila entre 4,5 y 5,1, no distinguiéndose una tendencia entre valor de pH y grado de tostado las muestras. Atendiendo al valor de pH, las muestras de algarroba podrían añadirse a cacaos naturales en altas proporciones sin cambiar significativamente el valor de pH de la mezcla.

La tabla 5 también muestra los valores de las coordenadas de color Cie L*, a* y b*. Los valores de la coordenada L* oscilaron entre 34 (ATF) y 49 (ATB), mostrando que el valor de la luminosidad disminuye progresivamente conforme aumenta el grado de tostado. Comparando estos valores con los del cacao, puede confirmarse que atendiendo a la luminosidad no existe

diferencia entre muestras de cacao naturales y harinas de algarroba naturales. Tampoco existe diferencia entre cacaos alcalinos medios y fuertes y algarrobas tostadas. Estas escasas diferencias en cuanto a luminosidad favorecen la adulteración del cacao con harinas de algarroba.

Al igual que ocurre con la luminosidad, la pureza de color (C^*) de las muestras también disminuye a medida que aumenta el grado de tostado de la algarroba, alcanzándose valores de 21 para las algarrobas naturales y reduciéndose hasta 12 para las algarrobas tostadas fuertes. Comparando los valores de C^* entre cacao y algarroba puede verse que existe una similitud entre ambas. De esta manera, los valores de C^* serían equivalentes entre cacao naturales y harinas de algarroba naturales y entre cacaos alcalinos medios/fuertes y algarrobas tostadas.

Los valores de tono (h^*) no parecen mostrar diferencias significativas con el aumento del grado de tostado, tan solo una ligera disminución. Los valores obtenidos para las muestras de harina de algarroba natural tienen un promedio de 61, valor que se reduce hasta 58 en las muestras de algarroba con alto grado de tostado. Estos valores coinciden con los observados en las muestras de cacao natural y cacaos alcalinos suaves.

Tabla 5. Parámetros del color y pH (valor \pm DS) para las muestras de algarroba.

Producto	Parámetros del color					
	L*	a*	b*	C*	h*	pH
AN1	48,6 \pm 0,4 ^{de}	11,44 \pm 0,09 ^{cd}	20,6 \pm 0,3 ^{cd}	23,6 \pm 0,3 ^e	61,0 \pm 0,3 ^b	5,03 \pm 0,01 ^a
AN2	47,70 \pm 0,06 ^{de}	11,68 \pm 0,11 ^{cd}	21,05 \pm 0,17 ^{cd}	24,1 \pm 0,2 ^e	60,98 \pm 0,11 ^b	5,12 \pm 0,01 ^a
AN3	46,1 \pm 0,2 ^{de}	12,5 \pm 0,2 ^{cd}	23,1 \pm 0,7 ^{cd}	26,3 \pm 0,7 ^e	61,5 \pm 0,3 ^b	4,67 \pm 0,01 ^a
AN4	44,17 \pm 0,3 ^{de}	10,027 \pm 0,011 ^{cd}	18,2 \pm 0,2 ^{cd}	20,7 \pm 0,2 ^e	61,1 \pm 0,3 ^b	4,91 \pm 0,01 ^a
ATM	37,6 \pm 0,4 ^{ab}	8,4 \pm 0,2 ^b	14,7 \pm 0,7 ^{ab}	16,9 \pm 0,7 ^{bc}	60,2 \pm 0,5 ^a	4,85 \pm 0,01 ^a
ATF	34,5 \pm 1,5 ^a	6,39 \pm 0,04 ^a	11,23 \pm 1,03 ^a	12,9 \pm 0,9 ^a	60 \pm 2 ^a	4,87 \pm 0,01 ^a
α	***	***	***	***	***	ns

* Letras iguales en una misma columna indican la pertenencia a grupos homogéneos. Nivel de significación (α): *** p <0.001; ns, no significativo. Algarroba natural (AN), Algarroba tostada media (ATM), algarroba tostada fuerte (ATF).

A partir de los datos obtenidos en la medida del color y pH de las muestras de cacao y algarroba y con el objetivo de conocer cuáles son las diferencias entre las muestras de cacao y algarroba atendiendo a los valores de pH y color se realizó un análisis multivariante PCA.

Como se observa en la Figura 1, los dos primeros componentes principales explican un 94% de la varianza de los datos. La primera componente principal, con un 78% de significancia, es la que nos da la mayor parte de la información y se relaciona con la diferencia de color entre las muestras debida al grado de alcalinización o de tostado. La segunda componente principal, con un 16% de significancia, se relaciona con la diferencia entre el cacao y la algarroba atribuida a las diferencias de pH.

Atendiendo a estos datos se puede concluir que muestras con baja luminosidad y alto pH son muestras de cacao alcalino; muestras con baja luminosidad y bajo pH son muestras de harina de algarroba tostadas. Sin embargo, muestras con alta luminosidad y alto pH, podrían ser tanto muestras de cacao natural o muestras de harina de algarroba no tostada. De esta manera, las mezclas entre ambos tipos de producto no tendrían por qué comportar cambios de color, pero una disminución de pH. No obstante, debido a que el pH puede oscilar en las muestras de cacao entre 5 y 8,6, cualquier mezcla de cacao y harina de algarroba daría como resultado valores de pH y de coordenadas de color propios del cacao en polvo.

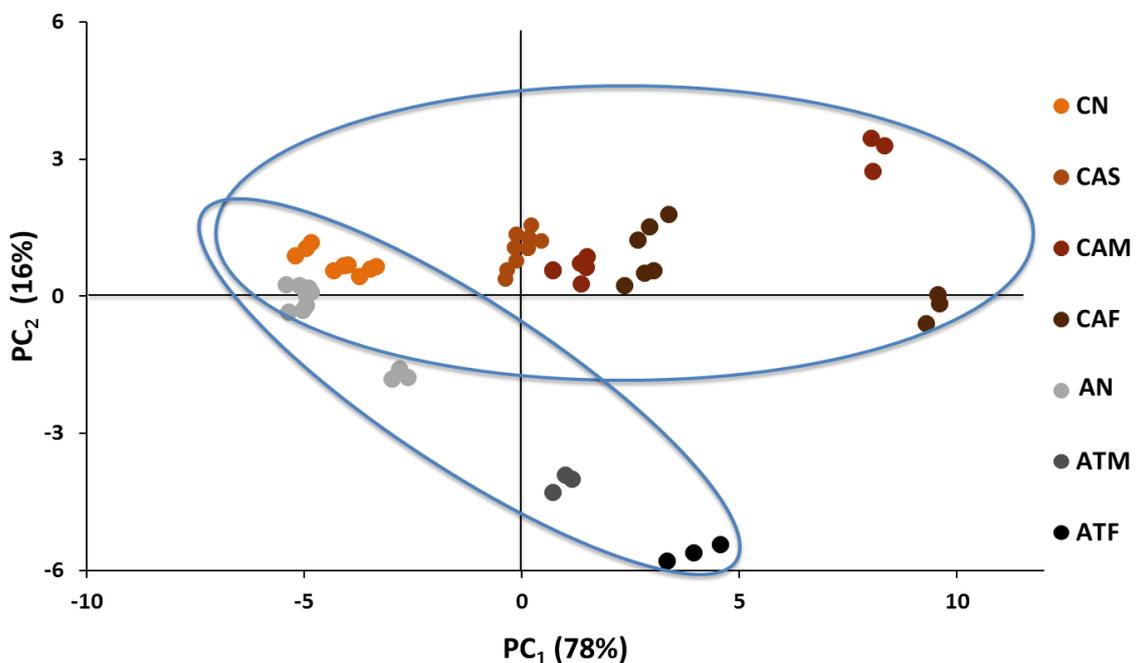


Figura 1. Análisis de componentes principales (PCA) de las muestras no modificadas de cacao en polvo y harina de algarroba.

4.2. ANÁLISIS DEL ESPECTRO NIR

La figura 2 presenta los espectros de absorción aparente ($\log_{10} 1/R$) obtenidos por el equipo NIR para las muestras de cacao en polvo puros (a) y la harina de algarroba (b). Tal y como se observa en la figura, todos los espectros tienen un patrón similar de absorbancia, aunque este patrón es diferente entre el cacao y la harina de algarroba.

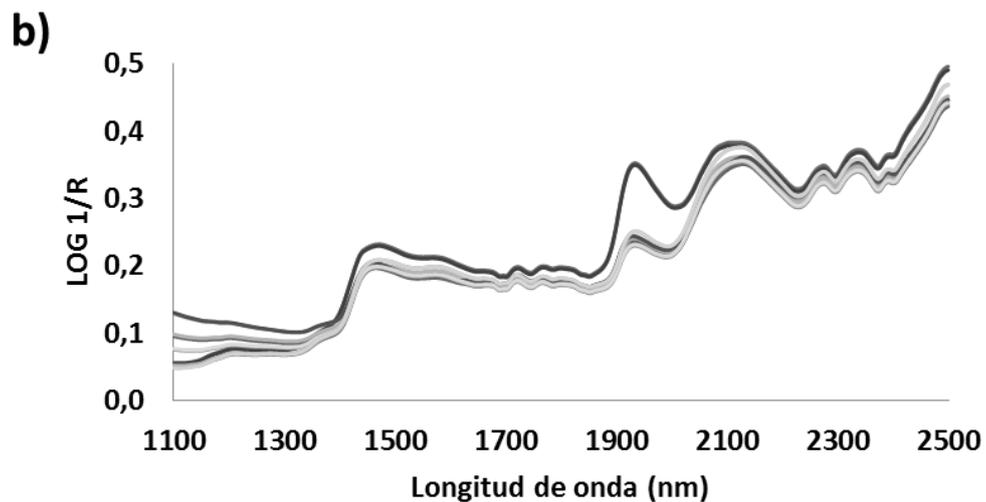
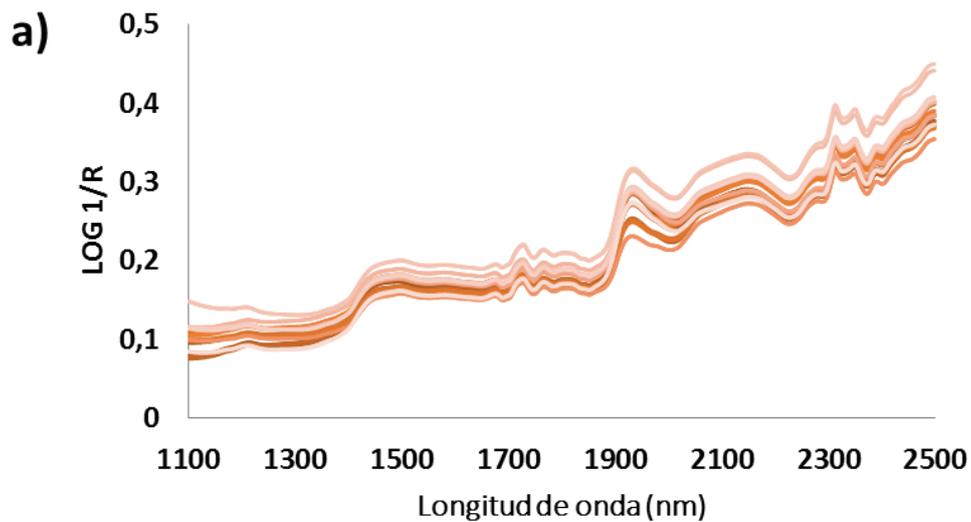


Figura 2. Espectros con datos brutos en el intervalo de 1100 a 2500 nm de cacaos en polvo (a) y harinas de algarroba (b).

Los espectros fueron pretratados con la segunda derivada y el resultado obtenido está representado en la Figura 3. En la figura 3 se observa de forma más sencilla las diferencias, relacionadas con la composición, que hay entre la harina y el cacao, ya que la segunda derivada permite mostrar los resultados de forma más clara que utilizando los datos originales. En la figura 3 se observan ciertas longitudes de onda en las que existen diferencias significativas entre la absorción del cacao y la algarroba. Estas longitudes de onda son 1402, 1436, 1900, 2310 y 2324 nm. A partir de la región abarcada por estas longitudes de onda se pueden relacionar las principales diferencias con el contenido en ácidos grasos y los polifenoles (Teye y Huang, 2015).

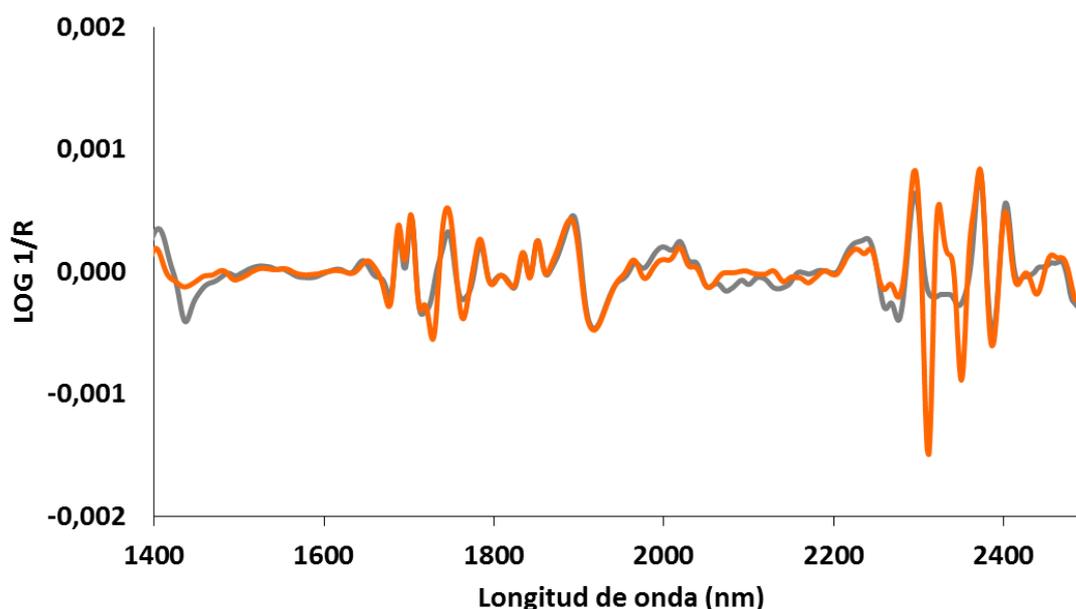


Figura 3. Espectros de cacao y algarroba tratados con la segunda derivada en el intervalo de 1400 a 2500 nm.

4.3. OBTENCIÓN DEL MODELO DE CLASIFICACIÓN

Con el objetivo de ver la relación entre las muestras se realizó un análisis de componentes principales (PCA) a los datos espectrales. El gráfico de la Figura 4 muestra el resultado de los dos primeros componentes principales que explican el 91% de la varianza total de los datos, y se aprecia la variación espectral de las muestras que indica los niveles de adulteración alto (40-60%), medio (20-40%) y bajo (0-20%). Las mezclas de cacao y algarroba se representan en

distintas tonalidades de azul oscureciéndose a medida que aumenta la proporción de adulterante que contienen. La primera componente principal (CP1) explica el 71% de la varianza total de los datos y se relaciona con la diferencia en las propiedades espectrales del cacao en polvo y la algarroba. Los cacaos naturales y la algarroba con bajo grado de tostado corresponden a los valores más bajos, y las puntuaciones más altas se relacionan con los cacaos con alto grado de alcalinización y la algarroba con alto grado de tostado. La segunda componente principal (CP2) explica que el 20% de la variabilidad está definida por el nivel de adulteración descrito inicialmente.

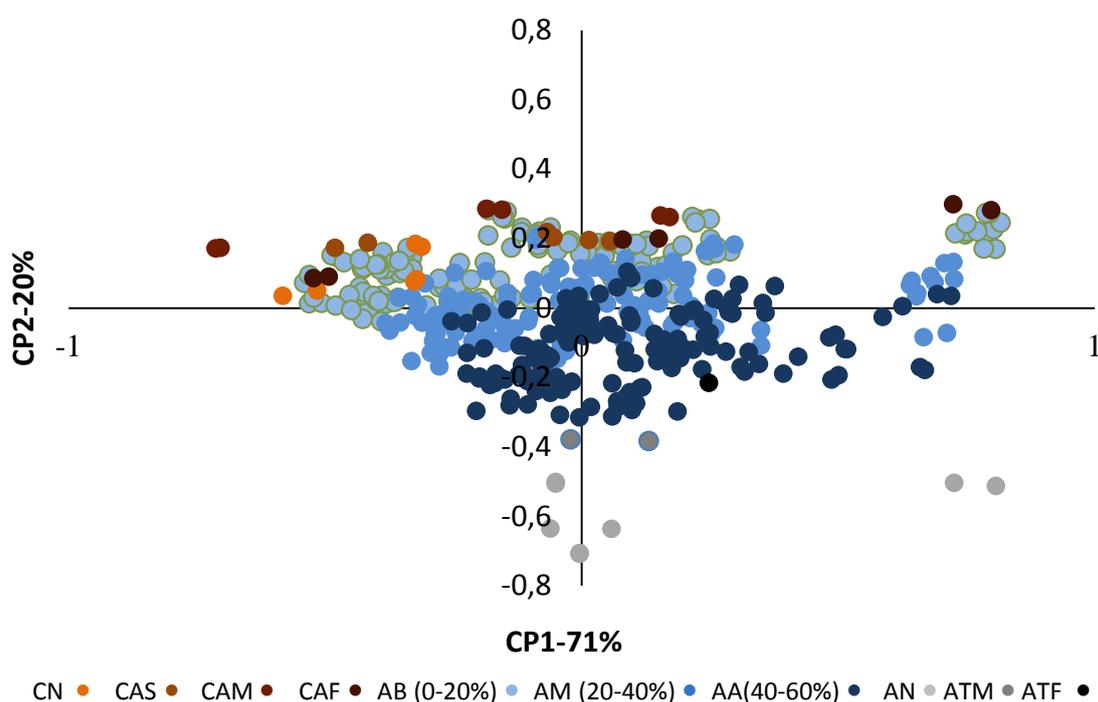


Figura 4. NIR-PCA gráfico de puntuaciones para la separación de polvo de cacao y diferentes niveles de adulteración con harina de algarroba, nivel de adulteración alto AA (40-60%), nivel medio AM (20-40%) y nivel bajo AB (0-20%).

La información de la primera componente permite conocer las características espectrales relacionadas con las muestras puras y las adulteradas. Las longitudes de onda correspondientes a los valores con mayor peso para la primera componente fueron 1100, 1464, 1936, 2108, 2276, 2330 y 2486 nm y para la segunda componente las longitudes de onda con mayor peso fueron 1116, 1324, 1460, 1576, 1728, 1914, 1976, 2106, 2262, 2310 y 2494 nm. Las longitudes de onda entre 971 y 1400 nm se relacionan con el primer sobretono de absorción de enlaces O-H, y a 1722 nm se representa el enlace C-H. Estos están asociados con el contenido de agua y azúcar (Álvarez *et al.*, 2012; Talens *et al.*, 2013; Bázár *et al.*, 2016),

mientras que las longitudes de onda a 1736 nm y en el rango de 2319-2328 nm están relacionadas con la absorción de los enlaces C-H, combinación CH₃ y enlace CC, estas longitudes de onda son características de ácidos grasos, proteínas y polisacáridos en el polvo de cacao (Veselá *et al.*, 2007; Westad *et al.*, 2008; Alomar *et al.*, 2013).

Las bandas de absorción a 1728, 2108 y 2494 nm coinciden aproximadamente con las bandas con las que se predice el contenido total de grasa en los granos de cacao (Cozzolino y Murray, 2004; Moros *et al.*, 2006; Teye & Huang, 2015). Las variaciones están relacionadas con las características de composición de las categorías de cacao en polvo y el adulterante, la harina de algarroba. Las señales de las longitudes de onda encontradas son similares al estudio realizado en los granos de cacao (Teye & Huang, 2015). Esto explica que existen componentes químicos específicos que ayudan a explicar las diferencias entre las muestras puras de cacao y algarroba y las diferentes proporciones de adulteración.

A partir de los espectros obtenidos de las determinaciones NIR no es posible tener categorías bien separadas debido a que el nivel de adulteración de las muestras es en escala continua. Por esta razón, es necesario aplicar un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), el cual permite generar un modelo para detectar diferentes niveles de adulteración. La Figura 5 muestra el gráfico de dispersión PLS-DA de la variable latente 1 y 2, para las muestras de cacao puro, algarroba pura y cacao adulterado con algarroba. Se observa que con un PLS-DA es posible distinguir rápidamente muestras adulteradas (10-60%) de muestras de polvo de cacao puros. Para el análisis, los espectros originales fueron pre-procesados utilizando la segunda derivada con el alisado Savitzky-Golay (ventana de 9 puntos, polinomio de segundo orden) y una corrección de señal ortogonal (OSC) (ver definición en la sección 1.6).

Para el PLS-DA, se generaron 3 variables latentes (VL) con la mayor parte de la variación explicada por la primera variable latente VL1 (72%) y (18%) para la segunda, VL2. De esta manera la agrupación se consigue utilizando la primera variable latente, con la mayoría de los resultados negativos relacionados con las muestras puras de cacao y los resultados positivos relacionados con las muestras adulteradas y la harina de algarroba. El coeficiente de determinación (R^2) de este modelo PLS-DA fue de 0,947 y el coeficiente de determinación de la validación (R^2_{CV}), basado en una validación cruzada completa, fue 0,875 indicando una buena calibración con buena predictibilidad.

En la figura 5 se puede distinguir claramente las muestras de cacao en polvo sin adulterar, las muestras de polvo de cacao adulterado y las muestras de harina de algarroba, lo que indica que es posible utilizar esta técnica para detectar rápidamente la adulteración.

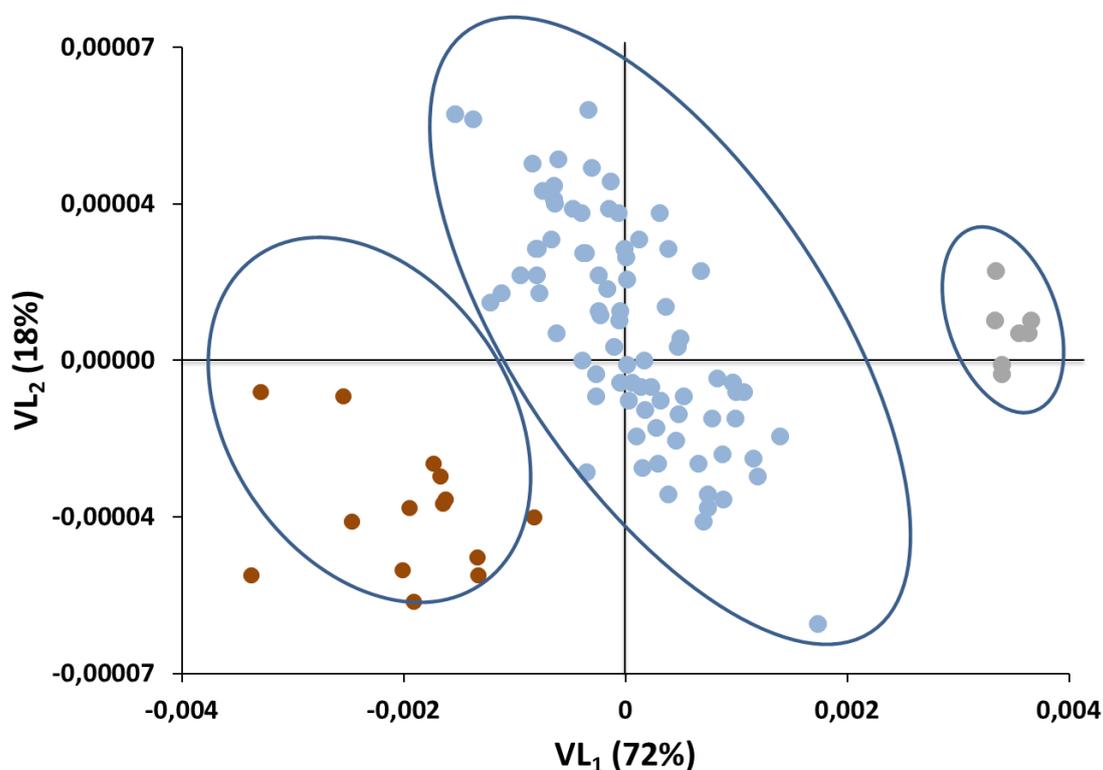


Figura 5. Gráfico de dispersión NIR PLS-DA de la variable latente 1 y 2, para las muestras de cacao puro (marrón), algarroba pura (gris) y cacao adulterado (azul).

Con el objetivo de medir la robustez del modelo PLS-DA, se realizó una validación con un conjunto externo de datos. La tabla 6 muestra cómo el modelo fue capaz de clasificar el 100% de las muestras en su grupo correspondiente (cacao, algarroba o muestras adulteradas).

Tabla 6. Precisión de la clasificación del modelo realizada con el modelo PLS-DA

	Cacao	Algarroba	Adulteradas	Precisión de Clasificación (%)
Cacao	4	0	0	100%
Algarroba	0	4	0	100%
Adulteradas	0	0	32	100%

4.4. OBTENCIÓN DEL MODELO DE PREDICCIÓN

Con el objetivo de buscar una relación cuantitativa entre los espectros y el porcentaje de adulteración se desarrolló un modelo de mínimos cuadrados parciales (PLS) con un conjunto de calibración (334 espectros) y un conjunto de validación (134 espectros). Durante este análisis se trabajó con los datos sin pretratamiento, así como con los datos pretratados con los algoritmos corrección del efecto multiplicativo de dispersión (EMSC), variable normal estándar (SNV), y Savitzky-Golay (segunda derivada) (ver definición en la sección 1.6).

Los métodos de pre-tratamiento utilizados y los indicadores estadísticos de bondad de ajuste para cada uno de los modelos se presentan en la Tabla 7. Los modelos obtenidos son buenos presentando alto valor para el coeficiente de correlación (R^2) entre 0,954 y 0,973. Los valores del error cuadrático medio de calibración (RMSEC) y el error cuadrático medio de predicción (RMSEP) fueron bajos oscilando entre 4,28 y 3,037 dependiendo del procesamiento de los datos espectrales.

Tabla 7. Resultados de los modelos PLS para predecir el porcentaje de adulteración usando datos sin pretratamiento y datos pretratados con los modelos EMSC, SNV, Savitzky-Golay, utilizando todos los datos divididos en un conjunto de calibración y uno de validación.

Pretratamiento	#VL	Calibración		Validación cruzada		Validación
		R^2	RMSEC	R^2	RMSECV	RMSEP
Sin tratamiento	6	0,942	5,005	0,938	5,147	-
EMSC	6	0,954	4,362	0,952	4,469	4,287
SNV	7	0,967	3,704	0,961	4,05	3,925
Savitzky-Golay	4	0,978	2,996	0,973	3,38	3,037

VL = Variables latentes; RMSEC = Raíz cuadrática media del error de calibración; RMSECV = Raíz cuadrática media del error de validación cruzada; RMSEP = Raíz cuadrática media del error de predicción; EMSC = corrección del efecto multiplicativo de dispersión; SNV = Variable Normal Estándar.

El modelo obtenido (Figura 6) representa el nivel observado de adulteración a lo largo del eje x y los resultados espectrales predichos a lo largo del eje y. Los resultados se consiguieron utilizando el algoritmo PLS, obteniendo buena correlación, con un coeficiente de determinación (R^2) de 0,978 con un porcentaje de RMSEC de 2,996 y un porcentaje de RMSEP 3,05 utilizando la segunda derivada el algoritmo de Savitzky-Golay (ventana de 9 puntos y polinomio de segundo orden). Como comprobación adicional para la validación del modelo, se realizaron una validación cruzada, eliminando cada vez una muestra tratando de predecirla y comparando a continuación el valor predicho con el valor real. El error de validación cruzada de la raíz cuadrática media (RMSECV) fue de 3,380 %. El modelo predictivo, con un grupo externo de validación, dio un error de predicción estándar bajo (SEP), de 3,037%, lo que confirma su buena capacidad de predicción.

Los resultados indicaron que el modelo PLS con la segunda derivada (Savitzky-Golay) es bueno, obteniendo valores bajos de RMSEC y RMSECV y altos valores de coeficientes de determinación (R^2), indicando buen rendimiento del modelo con una mejora en el error de validación cruzada (RMSECV). El límite de detección calculado para el modelo es de 4,28% (media + 3*desviación estándar).

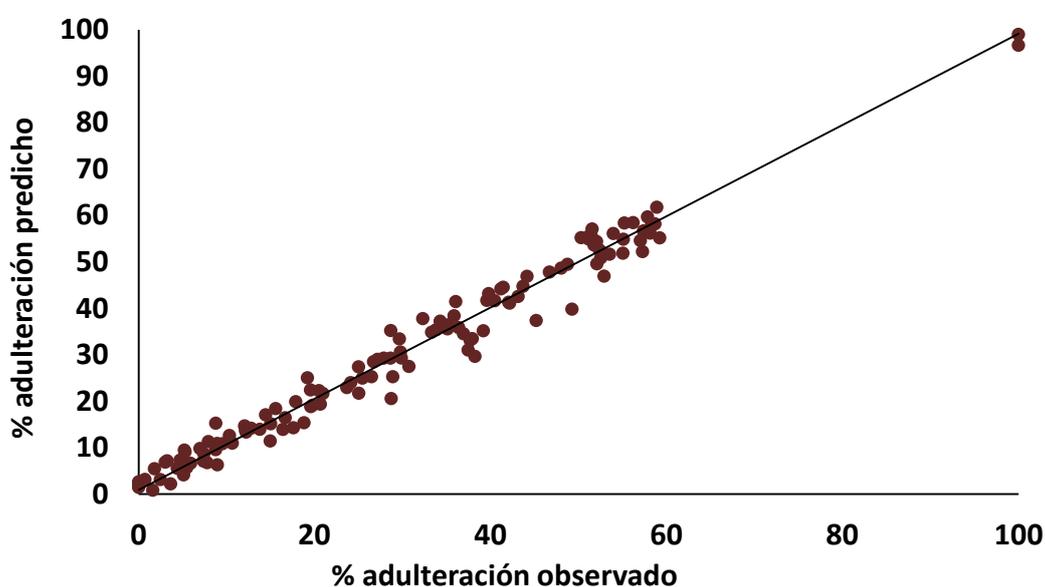


Figura 6. Valores predichos frente a valores medidos del porcentaje de adulterante (n = 134) para el cacao puro, la harina de algarroba y las muestras adulteradas.

5. CONCLUSIONES

Se ha demostrado que la espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR) en combinación con los modelos estadísticos de mínimos cuadrados parciales discriminante (PLS-DA) y de mínimos cuadrados parciales (PLS) constituyen un método rápido y efectivo para identificar adulteraciones de cacao en polvo con harinas de algarroba. Por el contrario, estas adulteraciones no serían fácilmente detectables mediante técnicas rutinarias como son la determinación del análisis de pH y la medida del color.

Mediante el análisis PLS-DA se ha podido clasificar correctamente el 100% de las muestras en tres grupos: cacao, harina de algarroba y mezclas de cacao y harina de algarroba. Por otra parte, mediante un análisis PLS se ha podido cuantificar el porcentaje de adulteración de las muestras. El modelo de predicción PLS se obtuvo con 4 factores a R^2 de 0,98 y 0,94 y un error cuadrático medio de 2,08 y 4,26 para los conjuntos de calibración y validación, respectivamente.

Esta tecnología supone por tanto una importante herramienta para los comerciantes de cacao, quienes podrán obtener un mayor control de la calidad del producto, evitando utilizar técnicas destructivas que necesitan una preparación compleja de la muestra o técnicas que suponen un importante gasto para la empresa. Debido a los óptimos resultados conseguidos podemos esperar que este método tenga cada vez más importancia en la industria del cacao, contribuyendo a la reducción del fraude alimentario.

6. BIBLIOGRAFÍA

ADM COCOA MANUAL. (2006). *The Zaan Cocoa manual*. The Netherlands: Archer Daniels Midland Company BV.

AFOAKWA, E. O.; BUDU, A. S.; MENSAH-BROWN, H.; FELIX, J. (2014). Effect of Roasting Conditions on the Browning Index and Appearance Properties of Pulp Pre-Conditioned and Fermented Cocoa (*Theobroma Cacao*) Beans. *J Nutrition Health Food Science*, 1(1), 5

AINÍA CENTRO TECNOLÓGICO. “¿Cómo influye el color en la percepción de sabor de un producto?” Visto el 30 de mayo de 2017. <http://tecnoalimentalia.ainia.es>

ALCIATURI, C. E.; ESCOBAR, M. E.; CRUZ, C. D. LA ; RINCÓN, C. (2003). Partial least squares (PLS) regression and its application to coal analysis. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería. Universidad del Zulia*, 26(3), 197–204.

ALOMAR, D. 1998. Fundamentos de la espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) como método de análisis de forrajes. *Agro Sur*, 26, 88- 104.

ALOMAR, D.; GALLO, C.; CASTAN, M.; FUCHSLOCHER, R. (2003). Chemical and discriminant analysis of bovine meat by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). *Meat Science*, 63, 441–450.

ÁLVAREZ, C.; PÉREZ, E.; CROS, E.; LARES, M.; ASSEMAT, S.; BOULANGER, R.; DAVRIEUX, F. (2012). The use of near infrared spectroscopy to determine fat, caffeine, theobromine and epicatechin contents in unfermented and sun-dried beans of Criollo Cocoa. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 20 (2), 307.

ARIAS, L.N.; ZAPATA, N. (2017). *Estudio de prefactibilidad para la instalación de una planta para la elaboración de galletas enriquecidas con harina de algarroba (Prosopis Pallida)*. Tesis Doctoral en Ingeniería Industrial. Universidad de Lima.

BARNES, R.J.; DHANOA, M. S.; LISTER, S. J.(1989) Standard normal variate transformation and de-trending of near-infrared diffuse reflectance spectra. *Applied Spectroscopy*, 43, 772.

BÁZÁR, G.; ROMVÁRI, R.; SZABÓ, A.; SOMOGYI, T.; ÉLES, V.; TSENKOVA, R. (2016). NIR detection of honey adulteration reveals differences in water spectral pattern. *Food Chemistry*, 194, 873-880.

BENGOECHEA, C.; ROMERO, A.; VILLANUEVA, A.; MORENO, G.; ALAIZ, M.; MILLÁN, F.; PUPPO, M. C. (2008). Composition and structure of carob (*Ceratonia siliqua* L.) germ proteins. *Food Chemistry*, 107(2), 675–683.

BULCA, S. (2016). Some Properties of Carob Pod and Its Use. *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*, Vol. XX, 142–147.

CAPUANO, E.; BOERRIGTER-EENLING, R.; KOOT, A.; RUTH, S. M. VAN. (2015). Targeted and Untargeted Detection of Skim Milk Powder Adulteration by Near-Infrared Spectroscopy. *Food analytical methods*, 8, 2125–2134.

COZZOLINO, D., & MURRAY, I. (2004). Identification of animal meat muscles by visible and near infrared reflectance spectroscopy. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*. 37, 447–452.

CHIRALT, A.; GONZALEZ, C.; MARTINEZ-NAVARETTE, N.; MORAGA, G.;TALENS, P. (2007). *Propiedades físicas de alimentos*. Servicio de Publicaciones de la Universidad Politecnica de Valencia. Valencia.

DE ZAAAN COCOA, 2013. *Cocoa & Chocolate manual*. ADM cocoa, Suiza, 171 pp.

DYER, B. (2003). *Alkalized cocoa powders*. 57 th PMCA Production Conference, 128-135

FADEL, H. H. M.; ABDEL, M. A.; KADER, A.; SAMAD, M. E. A.; & LOTFY, S. N. (2006). Cocoa substitute : Evaluation of sensory qualities and flavour stability, *European food and research technology*, 223, 125–131.

FAOSTAT, 2017. Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura. Visto el 22 de Abril de 2017. <http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>

GARRIDO A. (1997) Current and future applications of NIRS technology. *Options Méditerranéennes*, 26, 87-92

GARRIGUES, S.; GUARDIA, M. De. (2007). Near-infrared diffuse reflectance spectroscopy and neural networks for measuring nutritional parameters in chocolate samples, *Analytical chimica acta*, 584, 215–222.

GELADI, P.; McDOUGALL, D.; MARTENS, H. (1985) Linearization and Scatter-Correction for Near- Infrared Reflectance Spectra of Meat. *Applied Spectroscopy*, 39, 491.

GIVENS, D.I.; DEAVILLE E.R. (1999). The current and future role of near infrared reflectance spectroscopy in animal nutrition: a review. *Australian Journal of Agricultural Research*, 50, 1131 - 1145.

GONZÁLEZ, Y.; PÉREZ, E.; PALOMINO, C. (2012). Factores que inciden en la calidad sensorial del chocolate. *Actualización en nutrición*, 13(4), 321.

HERNÁNDEZ, Y.; LOBO, M.G.; GONZÁLEZ, M., 2006. Determination of vitamin C in tropical fruits: a comparative evaluation of methods. *Food Chemistry*, 96 (4), 654– 664.

HORLICK, G. Digital data handling of spectra utilizing Fourier transformations. (1972) *Analytical Chemistry*, 44, 943.

ICCO, 2017. International Cocoa Organization. Visto el 2 de Julio de 2017. <https://www.icco.org/statistics/cocoa-prices/daily-prices.html>

JIANG, B.; LI, W.; HUANG, Y. D. (2011). *Influence of Pretreatment Methods of the Spectra on the Calibration Model of the Precuring Degree*.

LIU, Y.; SUN, X.; OUYANG, A., 2009. Nondestructive measurement of soluble solid content of navel orange fruit by visible–NIR spectrometric technique with PLSR and PCA-BPNN. *LWT - Food Science and Technology*. 43 (4), 602–607.

LUKAS, B.; SUTER, M. (2012). *NIRS OF CHOCOLATE AND ITS CHEMOMETRIC ANALYSIS*, 15(6). *Newfood*, 15, 21-28.

MILLER, K. B.; HURST, W. J.; PAYNE, M. J.; STUART, D. A.; APGAR, J.; SWEIGART, D. S.; OU, B. (2008). Impact of alkalization on the antioxidant and flavanol content of commercial cocoa powders. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(18), 8527–8533.

MILLER, N.J.; MILLER, J.C. (2000). *Estadística y quimiometría para química analítica*. Ed. Pearson p.221-228

MOORE, J. C.; SPINK, J.; & LIPP, M. (2012). Development and Application of a Database of Food Ingredient Fraud and Economically Motivated Adulteration from 1980 to 2010. *Journal of Food Science*, 77(4), 118-126.

MOROS, J.; IÑÓN, F. A.; GARRIGUES, S.; DE LA GUARDIA, M. (2007). Near-infrared diffuse reflectance spectroscopy and neural networks for measuring nutritional parameters in chocolate samples. *Analytica Chimica Acta*, 584(1), 215–222.

OSBORNE, B.G. (2000). Near-infrared Spectroscopy in Food Analysis. Encyclopedia of Analytical Chemistry: *Applications, Theory and Instrumentation Volume 12: Electronic Absorption and Luminescence, Gas Chromatography, Infrared Spectroscopy, Kinetic Determinations*. John Wiley & Sons Inc, New York.

PARLAMENTO EUROPEO. DIRECTIVA 2000/36/CE de 23 de junio de 2000 relativa a los productos de cacao y de chocolate destinados a la alimentación humana (2000).

PEGUERO, A. (2010). *La espectroscopia NIR en la determinación de propiedades físicas y composición química de intermedios de producción y productos acabados*. Tesis Doctoral en Química. Universidad Autònoma de Barcelona.

PEIRIS K.H.S.; LEFFLER R.G.; DULL G.G., KAYS S.J. (1998) Nondestructive determination of soluble solids content of peach by Near Infrared Spectroscopy. In *Sensors for Nondestructive Testing*. Northeast Regional Agricultural Engineering Service (NRAES). Ithaca, New York, pp. 77-87.

PLAVINET, J. P.; JOLIVET, G. (2006). Fraudes alimentarios y métodos analíticos - Estructuración del campo jurídico, en: *Fraudes alimentarios legislación y metodología analítica*. Ed. Acribia. Zaragoza, 1-65.

PRABHAKARAN NAIR, K. (2010). *Cocoa (Theobroma cacao L.)*. In *The agronomy and economy of important tree crops of the developing world*. (pp. 131-180) Elsevier Inc.

REMIS RAMOS, G.; GARCÍA ÁLVAREZ-COQUE, C. (2001) *Quimiometría*. Síntesis. Madrid. España.

SHAO, Y.; HE, Y.; GÓMEZ, A.H.; PEREIR, A.G.; QIU, Z.; ZHANG, Y., 2007. Visible/near infrared spectrometric technique for nondestructive assessment of tomato 'Heatwave' (*Lycopersicon esculentum*) quality characteristics. *Journal of Food Engineering*. 81 (4), 672–678.

SSAFE (2015) Food Fraud Vulnerability Assessment Tool. (n.d.).

SUNOJ, S.; IGATHINATHANE, C.; VISVANATHAN, R. (2016). Nondestructive determination of cocoa bean quality using FT-NIR spectroscopy. *Computers and Electronics in Agriculture*, 124, 234–242.

TALENS, P.; MORA, L.; MORSY, N.; BARBIN, D. F.; ELMASRY, G.; SUN, D. W. (2013). Prediction of water and protein contents and quality classification of Spanish cooked ham using NIR hyperspectral imaging. *Journal of Food Engineering*, 117 (3), 272-280.

TEYE, E.; HUANG, X. (2015) Novel prediction of Total Fat Content in Cocoa Beans by FT-NIR Spectroscopy Based on Effective Spectral Selection Multivariate Regression. *Food Analytical Methods*, 8 (4), 945-953.

VALENTE M.; LEARDI R.; SELF G.; LUCIANO G.; PIERRE J. (2009) Multivariate calibration of mango firmness using vis/NIR spectroscopy and acoustic impulse method. *Journal of food Engineering*, 94, pp7-13.

VESELÁ, A.; BARROS, A. S.; SYNITSYA, A.; DELGADILLO, I.; COPÍKOVÁ, J.; COIMBRA, M.A. (2007). Infrared spectroscopy and other product analysis for quantification of fat, nitrogen, and moisture of cocoa powder. *Analytical Chemical Acta*, 601 (1), 77-86.

XU, C.; HE, H. S.; HU, Y.; CHANG, Y.; LI, X.; BU, R. (2005). Latin hypercube sampling and geostatistical modeling of spatial uncertainty in a spatially explicit forest landscape model simulation. *Ecological Modelling*, 185(2-4), 255-269.

ZIEGLER, G. (1998) In: Linskens H, Jackson JF. *Modern methods of plant analysis*. Springer, Berlin, pp 289-299.

ZOMEÑO, C.; HERNÁNDEZ, P.; BLASCO, A. (2011). Use of near infrared spectroscopy for intramuscular fat selection in rabbits. *World Rabbit Science*, 19(4), 203-208.