

Desarrollo de un espectrofotómetro de campo para su aplicación en un programa de mejora genética

Gracia, A²; Barreiro, P¹; Soto, D¹; León, L²; Hernández-Sánchez N¹.

¹) LPF-TAG. Dpo. Ingeniería Rural. Avda. Complutense s/n. 28040 Madrid.

E-mail : pilar.barreiro@upm.es

²) IFAPA – Centro “Alameda del Obispo”. Avda Menéndez Pidal s/n. 14004 Córdoba.

E-mail: aurelio.gracia@juntadeandalucia.es

Resumen(Abstract)

Se ha desarrollado un espectrofotómetro de campo para uso en programas de mejora del olivo en el marco de un proyecto INIA en el que trabajan conjuntamente el LPFTAG y el IFAPA de Córdoba. La robustez de los modelos en la configuración portátil es muy dependiente del número de variables latentes seleccionadas mediante modelos PLS. Se evalúa el procedimiento PDS de transferencia de calibración para mantener en uso las bases de datos acumuladas con un equipo de sobremesa a lo largo de los últimos cinco años.

A field spectrometer has been developed for use on olives under a breeding process. The system shows to behave properly for the estimation of total water and olive content. The robustness of models in the portable configuration shows a clear instability depending on the number of latent variables use in the adjustment of the estimation models under a PLS configuration. PDS calibration transfer is evaluated in order to be able to reuse the databases gathered with laptop spectrometers during the last five years.

Palabras Clave(Keywords)

Espectrofotómetro (Spectrophotometer), calidad (quality), humedad (moisture), modelos de predicción (prediction models), transferencia de calibración (calibration transfer).

1. Introducción. Objetivos

España es el principal productor de aceite de oliva del mundo con un volumen de 2.770.000 t en 2007 (IOOC, 2007), y la obtención de nuevas variedades con aceites de mayor calidad es uno de los objetivos prioritarios de los actuales programas de mejora genética de olivo (*Olea europaea* L.). En 1991 el Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria (IFAPA – Junta de Andalucía) junto con la Universidad de Córdoba comenzaron un programa para conseguir, entre otras prioridades, una mayor calidad de sus aceites. Debido al elevado número de genotipos a evaluar cada año y de las muestras que genera un programa de mejora, los métodos tradicionales para la determinación de humedad y aceite (Desecación en estufa, Resonancia Magnética Nuclear: RMN y/o extracción de aceite en Soxhlet con n-hexano), no satisfacen las necesidades de dicho programa. El poder disponer de una tecnología rápida, no destructiva que no genere

residuos químicos y ahorrando tiempo y dinero como la tecnología de absorción en el infrarrojo cercano (NIRS), hace mucho más viable dichos programas. La humedad y el contenido en aceite, que son dos de los principales parámetros a determinar en las aceitunas, han sido ya publicados con resultados muy satisfactorios con equipos de instrumentación NIRS de Laboratorio (*León et al., 2003, 2004*). La aplicación de equipos NIRS portátiles de campo serían muy útiles al poder realizar análisis con poca cantidad de muestra, cuando no es posible o conveniente llevar las muestras al laboratorio y sin interferir en el desarrollo ontogénico de la planta. Si bien estos equipos portátiles presentan estas ventajas frente a sus homólogos de laboratorio, han de ser mejorados en cuanto al desarrollo de modelos de calibración robustos comparados con los equipos de laboratorio (*Gracia et al., 2006*), así la posibilidad de realizar transferencias de calibraciones entre equipos NIRS resulta determinante para garantizar la fiabilidad de los mismos.

Existen distintos procedimientos de transferencia de calibración (*Nicolai y cols., 2007; Alamar y cols., 2007; Roger y cols., 2003; Zeaiter y cols., 2006*), entre los que destaca : PDS (Piecewise Direct Standardization), DOP (Direct Orthogonal Projection) y OSC (Orthogonal Signal Correction). La primera técnica es significativamente diferente de las otras dos. Así, ,mientras la primera se basa en distorsionar el espectro del equipo esclavo para adaptarse al maestro, las otras dos se orientan a la eliminación de fuentes de variación que no contribuyen a la capacidad predictiva pero que se ven afectadas por las condiciones de uso.

El objetivo de este trabajo ha sido el desarrollo de un equipo portátil NIRS para su uso directo sobre los árboles en campo entre investigadores del Dpto de Ingeniería Rural de la Universidad Politécnica de Madrid y el IFAPA, comparando la robustez de sus calibraciones para humedad y contenido en aceite con los equipos de laboratorio y proponer un método de transferencia de calibración entre ambos instrumentos.

2. Materiales y métodos

2.1 Características del Equipo NIRS portátil

El detector modelo C9913GC, TG-Cooled NIR I de la marca Hamamatsu es el alma del equipo de campo. Cubre un rango espectral comprendido entre los 900-1700nm, y se le ha adaptado una fibra óptica (Ocean Optics) con 7 fibras, una central de medida y 6 de transmisión de luz. La fuente de luz halógena de 12W tiene una autonomía de 10.000 horas con receptores InGaAs. La presentación de la muestra se ha desarrollado específicamente para este proyecto y es un pomo cónico donde se encaja la aceituna (en su variedad de tamaños) para la recogida de espectros y dispone de alojamiento para 4 termopares conectados a una tarjeta digitalizadora para computar los datos de temperatura. Para la

recogida de espectros es interesante la realización de un blanco de Referencia previo usando una superficie cerámica estándar WS-1-SL-Spectralon. Otro factor a tener en cuenta es el tamaño y peso total del equipo que debe de ser autónomo para su uso por una persona y caber en una mochila transportada fácilmente por el operario a la espalda (Fig. 1).

Figura 1. Distintos componentes que integran el espectrofotómetro NIRS - Hamamatsu de campo, y recogida de espectros sobre las aceitunas en el árbol:



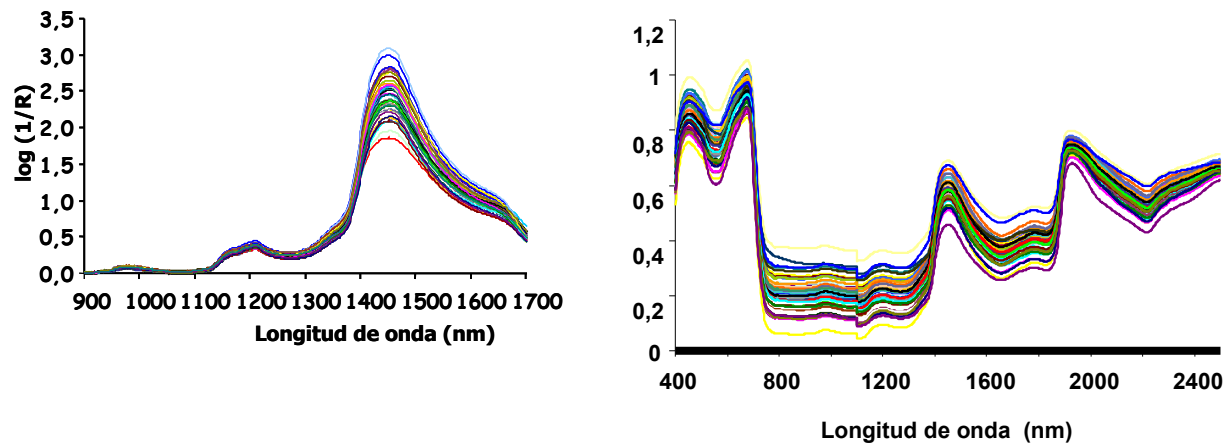
2.2 Material Vegetal y Recogida de Espectros

Se midieron 45 árboles (10 frutos por árbol) de un ensayo de plantas de semilla de olivo que el grupo del IFAPA tiene en su finca de Córdoba con este equipo portátil. Los espectros de un mismo árbol fueron promediados, para conseguir un dato lo más representativo posible. A su vez un total de 202 árboles (2 repeticiones por árbol, 25 aceitunas aproximadamente por repetición) procedentes de un ensayo de preselecciones y de olivar superintensivo en distintas localizaciones de la provincia de Córdoba fueron escaneados con un equipo de laboratorio FOSS-NIRSystem 6500 (400 – 2500 nm) (Fig. 2).

Los espectros se acondicionan con anterioridad al desarrollo de modelos mediante una corrección multiplicativa de la dispersión física de la luz (MSC). Toda la información espectral de los distintos equipos se registra en una estructura Matlab con 4 elementos: *master global* (conteniendo la información de los 202 arboles), *master común* (33 arboles), *slave común* (33 árboles idénticos a la anterior) y *slave global* (45 árboles registrados en esta campaña con el equipo de campo). Cada uno de dichos elementos es una matriz de

celdas que contiene las claves de identificación de los árboles, los valores de referencia (contenido en aceite y humedad), los espectros y las longitudes de onda.

Figura 2. Espectros adquiridos por el equipo NIR portátil de campo (izquierda) y espectros adquiridos por el equipo NIR de laboratorio (derecha):



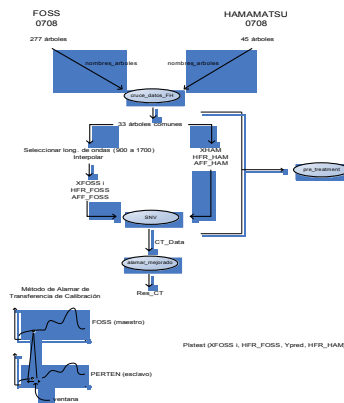
2.3 Método de Transferencia de Calibración

Como se ha indicado, son varios los métodos de transferencia de calibración que pueden resultar útiles y que son citados en la literatura (Nicolai *et al.*, 2007). Si bien el que mejores resultados está ofreciendo en este caso ha sido Piecewise Direct Standardization: PDS. Este método se basa en proyectar un intervalo de longitud de onda denominado ventana (cuya amplitud puede ser variable) desde los espectros adquiridos por un equipo “esclavo” (donde la robustez de las calibraciones es menor) sobre los espectros adquiridos por el equipo “maestro” (aquel donde la robustez es mayor) compensando las diferencias espectrales entre ambos instrumentos (Alamar *et al.*, 2007). (Fig. 3).

Figura 3. Esquema sobre el concepto de transferencia de calibración PDS entre dos equipos NIRS:

INSTRUMENTO
MAESTRO
(LABORATORIO)

INSTRUMENTO
ESCLAVO
(PORTÁTIL)



Todos los algoritmos se han programado específicamente en Matlab 7.0 sobre la base de funciones del toolbox PLS, rutinas cedidas por el CEMAGREF (Roger y cols., 2003) y otras desarrolladas por Barreiro y cols. en el marco del Taller de transferencia de calibración impartido en el Simposio Internacional MODEL IT 2008.

3. Resultados y discusión

Los modelos de estimación para humedad y aceite para ambos equipos fueron desarrollados en Matlab 7.0 (The Mahworks, Natick, USA) usando una regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS1), y se muestran a continuación en términos de coeficientes de Correlación (r^2) y Error Estándar de Predicción (SEP), seleccionando en cada caso el óptimo de variables latentes (LV' s) por validación cruzada (Tabla 1) .

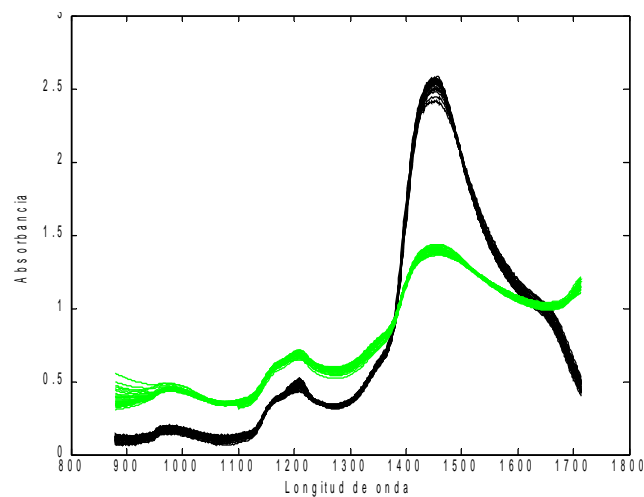
Tabla 1. Modelos de predicción para aceite y humedad para ambos instrumentos NIRS:

	ACEITE	HUMEDAD
NIR PORTÁTIL	$r^2 = 0.85$	$r^2 = 0.73$

N = 45	SEP = 2.50 LV' s = 3	SEP = 2.78 LV' s = 7
NIR LABORATORIO	ACEITE $r^2 = 0.87$ SEP = 2.12 LV' s = 8	HUMEDAD $r^2 = 0.85$ SEP = 1.88 LV' s = 8
N = 202		

Como se ha indicado al describir la estructura de datos, la transferencia de calibraciones entre ambos equipos requiere seleccionar el mismo grupo de árboles en ambos instrumentos (en nuestro caso un total de 33) y ajustar el equipo Foss a un rango espectral similar al del equipo portátil, esto es 900 – 1700 nm. Antes de aplicar PDS se usaron diferentes métodos de pre-tratamiento del dato espectral siendo el más interesante Multiplicative Scatter Correction (MSC) para mejorar la relación señal – ruido (Fig. 4):

Figura 4. Espectros en absorbancia del equipo Hamamatsu (negro) y del FOSS, después de aplicar el procedimiento MSC, correspondientes a los 33 árboles medidos en con ambos instrumentos:



En este trabajo se procedió a evaluar la transferencia de calibración entre los dos equipos con distintos intervalos de ventana (w) (Fig. 5 y Fig. 6), observándose que valores cercanos a 10 longitudes de onda son los que muestran mejores resultados. Así, el coeficiente de determinación para el contenido en aceite asciende de 0.34 a 0.66. Por otra parte el error

estándar de predicción (SEP) tras la transferencia de calibración (Tabla 2) se ve reducido a niveles sólo ligeramente superiores a los observados con un ajuste directo de modelos para cada equipo (Tabla 1). La Tabla 2. Resume los resultados de transferencia de calibración.

Tabla 2. Modelos de predicción para aceite y humedad para el equipo NIR de campo antes y después de aplicar PDS:

	ACEITE		HUMEDAD	
	Antes del PDS	Después del PDS	Antes del PDS	Después del PDS
NIR PORTÁTIL	r2 = 0.34	r2 = 0.66	r2 = 0.66	r2 = 0.69
N = 45	SEP = 112.8	SEP = 5.5	SEP = 95.2	SEP = 4.2

Figura 5. Evaluación de la mejor configuración a emplear en la transferencia de calibración para la estimación del contenido de aceite. R2_PDS es el coeficiente de determinación en los datos generales del equipo esclavo tras la aplicación del procedimiento PDS, R2_SPDS es el coeficiente de determinación en los datos generales del equipo esclavo antes de la aplicación del procedimiento PDS, R2_CAL_FOSS es el coeficiente de determinación en el modelo de calibración del equipo maestro, y R2_CAL_HAM es el coeficiente de determinación en el modelo de calibración usando el equipo esclavo:

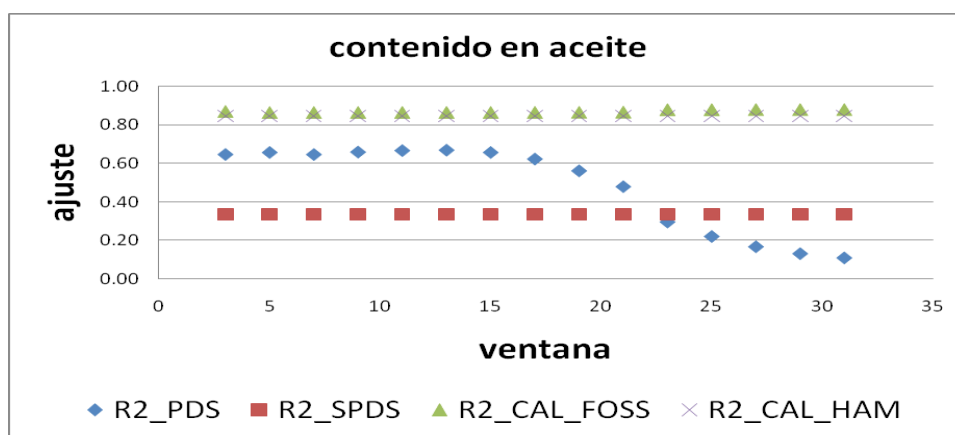
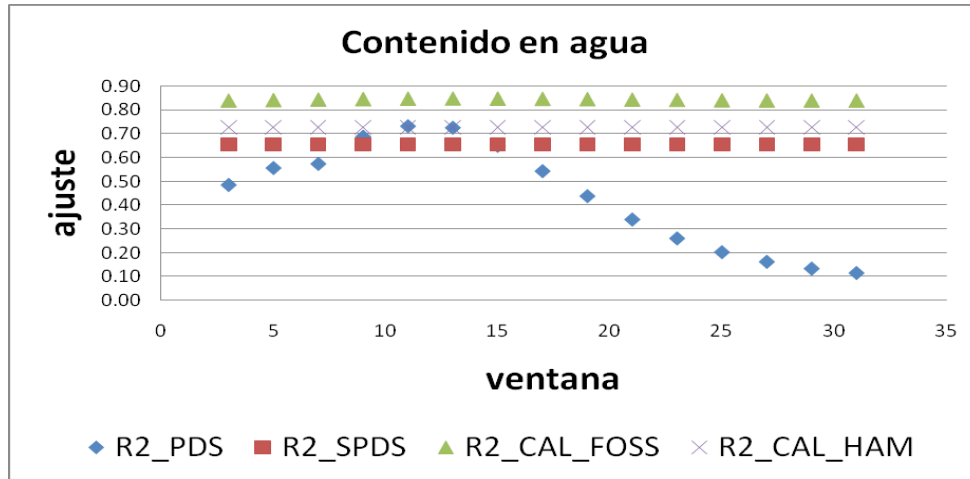


Figura 6. Evaluación de la mejor configuración a emplear en la transferencia de calibración para la estimación del contenido de agua. R2_PDS es el coeficiente de determinación en los datos generales del equipo esclavo tras la aplicación del procedimiento PDS, R2_SPDS es el coeficiente de determinación en los datos generales del equipo esclavo antes de la

aplicación del procedimiento PDS, $R2_CAL_FOSS$ es el coeficiente de determinación en el modelo de calibración del equipo maestro (*master*), y $R2_CAL_HAM$ es el coeficiente de determinación en el modelo de calibración usando el equipo esclavo (*slave*):



Las siguientes figuras (Fig.7 y Fig. 8) muestran los valores observados y predichos obtenidos con la mejor configuración de transferencia de calibración tanto en la estimación del contenido de aceite como de agua. Se observa claramente la reducción del efecto *Bias* debido a la diferencia inicial entre los espectros de ambos equipos.

- Figura 7. Comparación de los valores observados en contenido de aceite correspondientes al modelo de calibración global del maestro (*global*), a los 33 árboles seleccionados del maestro (*master*), y a los datos globales del esclavo antes y después de la transferencia de calibración (*slave* y *PDSslave* respectivamente).

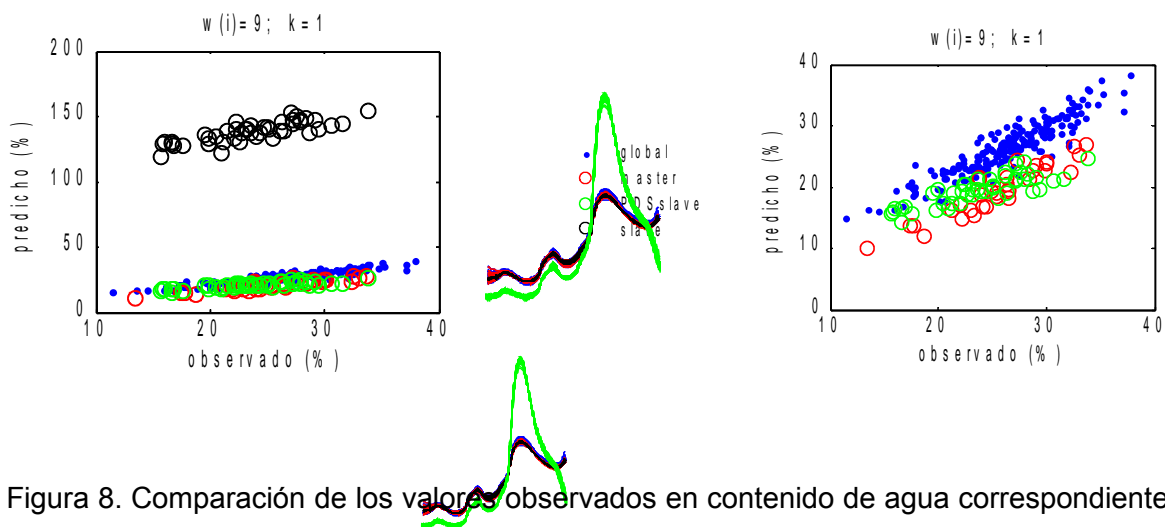
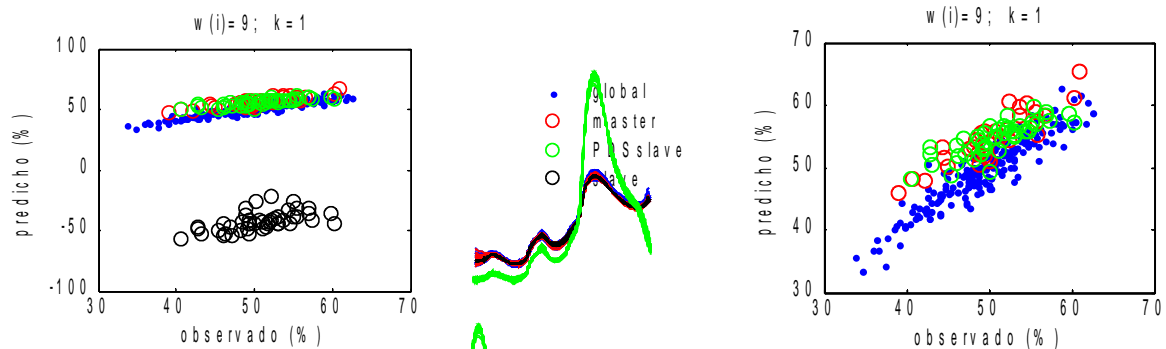


Figura 8. Comparación de los valores observados en contenido de agua correspondientes al modelo de calibración global del maestro (*global*), a los 33 árboles seleccionados del

maestro (*master*), y a los datos globales del esclavo antes y después de la transferencia de calibración (*slave* y *PDSslave* respectivamente).



En el momento actual se pretende seguir profundizando utilizando otros métodos de transferencia de calibración alternativos a PDS como Dynamic Orthogonal Projection: DOP (Zaiter et al., 2006) o External Parameter Orthogonalisation: EPO (Roger et al., 2003), para equipos de laboratorio y equipos portátiles comerciales basados en filtros acústicos ópticos (AOFT), habiéndose recogido para ello la información espectral durante el proceso de maduración de las aceitunas en la última campaña (Septiembre-Diciembre), y cuyos resultados más relevantes serán publicados en los próximos meses.

4. Conclusiones

Estos resultados confirman la importancia que los equipos de Espectroscopía de Infrarrojo Cercano pueden ofrecer a los investigadores en el desarrollo de sus programas de mejora genética para la determinación de dos de los principales constituyentes de las aceitunas (varianzas explicadas en los principales constituyentes superiores al 80%), y la posibilidad de realizar transferencias de calibración entre equipos NIRS que ayuden a mejorar la estimación de los modelos obtenidos con equipos portátiles (reducción entorno al 95% en el error típico de estimación) y a su vez reutilicen la información acumulada con distintos equipos de laboratorio a lo largo de los años.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por un proyecto del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA): RTA2006-00030-C02-01. El LPFTAG agradece al programa TAGRALIA de la Comunidad Autónoma de Madrid la financiación a grupos de investigación).

Referencias

Alamar, M.C.; Bobelyn, E.; Lammertyn, J.; Nicolaï, B. M. Moltó, E. (2007). Calibration transfer between NIR Diode array and FT-NIR Spectrophotometers for measuring the soluble solids contents of apple. *Postharvest Biol. and Technol.* 45: 38-45.

Gracia, A.; Mazarro, M.; León L. (2006). Determinación en campo de humedad y contenido graso en aceitunas mediante la técnica NIRS. I Jornadas del Grupo de Olivicultura de la Sociedad Española de Ciencias Hortícolas (SECH). 9 y 10 Octubre de 2006. Córdoba.

International Olive Oil Council (IOOC). 2007. World olive oil production. <http://www.internationaloliveoil.org/>.

León, L., Rallo, L, Garrido, A. (2003). Análisis de aceituna intacta mediante espectroscopia en el infrarrojo cercano (NIRS): una herramienta de utilidad en programas de mejora de olivo. *Grasas y Aceites*, 54: 41-47.

León, L., Garrido-Varo, A., Downey, G. (2004). Parent and harvest year effects on near-infrared reflectance spectroscopic analysis of olive (*Olea europaea* L.) fruit traits. *J. Agric. Food Chem.* 52: 4957-4962.

Nicolaï, B. M.; Beullens, K.; Bobelyn, E.; Peirs, A.; Saeys W.; Theron, K.I.; Lammertyn, J. (2007). Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review. *Postharvest and Biol. Technol.* 46: 99-118.

Roger J-M.; Chauchard F.; Bellon-Maurel V. (2003). EPO-PLS external parameter orthogonalisation of PLS application to temperature-independent measurement of sugar content of intact fruits. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 66: 191-204.

Zaiter, M.; Roger, J. M.; Bellon-Maurel V. (2006). Dynamic orthogonal projection. A new method to maintain the on-line robustness of multivariate calibrations. Application to NIR-based monitoring of wine fermentations. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 80: 227-235.