

# APLICACIÓN DE LA ESPECTROSCOPIA DE REFLECTANCIA DIFUSA (TRR) LASER A LA MEDIDA DE PARÁMETROS DE CALIDAD EN FRUTAS

R. Cubeddu, A. Pifferi, P. Taroni,  
A. Torricelli, G. Valentini  
INFM - Dipartimento di Fisica,  
Politecnico di Milano - CEQSE-CNR  
Piazza Leonardo da Vinci 32,  
20133 Milano, Italia

C. Valero, M. Ruiz-Altisent  
Dpt. Ingeniería Rural, E.T.S.I. Agrónomos  
Universidad Politécnica de Madrid  
Av. Complutense,  
28040 Madrid. España  
labpropfis5@iru.etsia.upm.es

## Abstract

Laser diffuse reflectance spectroscopy applied to the measurement of fruit quality

The time resolved reflectance spectroscopy technique (TRR or TDRS), widely used in biomedical areas, is applied in this work to the detection of tissue optical properties related to fruit quality. Using single photon counting devices and laser light sources, the system measures absorption and scattering of the photons travelling through the tissue, independently and at the same time. Preliminary results show that the technique is sensible to changes of firmness, chemical contents and color in different fruit species, suggesting that this technique may be a new interesting possibility to develop non-destructive sensors for the fruit industry.

Keywords: fruit quality, absorption, transport scattering, photon counting, laser

## Resumen

La espectroscopía de reflectancia difusa (TRR o TDRS), técnica no destructiva ampliamente usada en aplicaciones biomédicas, se aplica por primera vez en este trabajo a la detección de propiedades ópticas relacionadas con parámetros de calidad en frutas. Mediante el uso de tecnologías de conteo de fotones y sistemas de iluminación láser, se ha desarrollado un procedimiento para registrar a la vez la cantidad de luz absorbida y la magnitud de dispersión de los fotones por el tejido atravesado. Los resultados previos indican adecuada sensibilidad del sistema a cambios en la fruta de firmeza, compuestos químicos y color, lo que sugiere un amplio potencial de desarrollo de sensores para la industria agroalimentaria.

Palabras clave: calidad de fruta, absorción, dispersión, conteo de fotones, laser

## 1. Introducción

### 1.1 Técnicas no invasivas y no destructivas

La medida de la calidad interna de las frutas es una tarea cada vez más importante en el mercado actual. Hay una demanda creciente de métodos no destructivos y no invasivos para medir la calidad interna de cada fruto, para controlar procesos de almacenamiento e incluso para determinar el mejor momento para la recolección.

Hasta ahora todavía hay pocas técnicas no invasivas disponibles para su uso en frutas.

Se han visto resultados interesantes aplicando distintos tipos de ondas electromagnéticas, como el uso de técnicas ultrasónicas, foto acústicas y la resonancia magnética nuclear (NMR), que está mostrándose cada vez más útil por su especificidad y resolución espacial, pero por ahora no es adecuada para aplicaciones en campo.

Ya se ha demostrado la efectividad de diferentes técnicas basadas en la medida de la luz total reflejada difusa a diferentes longitudes de onda. En la región visible del espectro la colorimetría se usa para determinar el color de la piel. En el infrarrojo, el espectro de la luz remitida ha sido correlacionado en algunos casos con contenido total en azúcares u otros parámetros de calidad de frutas (Bellon-Maurel et al. 1996).

La principal limitación de muchas técnicas que hacen uso de la interacción luz / materia se debe a que es inevitable el acoplamiento entre la absorción y dispersión de la luz en el interior de la muestra al determinar la intensidad de la luz difusa remitida. Es decir, resulta muy difícil medir la intensidad de luz absorbida sin que su valor se vea afectado por la dispersión de la misma, y viceversa. Además, la intensidad total reflejada depende fuertemente del color de la piel, lo que oculta la información de la zona interna. Por ello, no es fácil obtener a la vez, pero independientemente, información cuantitativa de las propiedades de dispersión y absorción del medio con una medida local de la reflectancia total.

En este artículo mostramos el uso, por primera vez, de la técnica de reflectancia difusa en el dominio del tiempo (TRR en inglés, de time resolved reflectance) para medidas de la absorción y dispersión de la luz en el interior de un medio. Esta técnica ha sido ya usada con éxito para la detección de propiedades ópticas en otros medios biológicos para aplicaciones biomédicas, como la detección y localización de tumores en humanos (Cubeddu et al. 1994b).

## 1.2. Fundamento de la técnica TRR.

Se basa en la medida del retardo y el ensanchamiento temporal experimentado por un corto pulso de luz que viaja a través de un medio turbio (fruta). La fuente de luz empleada es un láser, monocromática por tanto pero sintonizable a distintas longitudes de onda. Dicha luz laser es inyectada y recogida en el medio con dos fibras ópticas apoyadas directamente sobre su superficie, a una distancia relativa fijada. Si se usa un modelo físico teórico adecuado para el análisis experimental de los datos, y se sobreentienden varias hipótesis, es posible medir a la vez el coeficiente de absorción y el coeficiente de dispersión de transporte ("scattering") en el medio por el que ha viajado la luz, con buena precisión (Cubeddu et al. 1994a).

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Instrumentación.

El equipo TRR empleado es propiedad del Dpto. Física del Politécnico de Milán. Se ha usado como fuente de iluminación un laser modulado de pulsos sincronizados. El laser principal dye es excitado por otro laser de argón (Coherent). El laser es ajustado en el rango entre 610 y 700 nm. La luz es inyectada y recogida de la muestra mediante una fibra óptica de plástico 1 mm de grosor y 1 m de longitud, a una distancia relativa de 1,5 cm (figura 1). Un dispositivo de sujeción de las fibras las mantiene en contacto con la muestra, con sus terminaciones en paralelo, lo que evita la recogida de la reflexión especular directa. El otro extremo de la fibra colectora se sitúa a la entrada de un monocromador de barrido, acoplado a un fotomultiplicador de doble placa micro-canal (Hamamatsu). La señal es procesada por un contador de fotones individuales en el tiempo. Una pequeña fracción del haz incidente es también enviada a una fibra accesoria que llega directamente a la entrada del monocromador

para compensar cualquier retardo temporal de la cadena electrónica. El ancho temporal de la función de transferencia instrumental es medido como comprobación al inicializar el equipo, enfrentando directamente las fibras de entrada y salida. El control automatizado, desarrollado por el Politécnico de Milán e implementado en ordenador, permite adquirir en 1 minuto cada conjunto de curvas de reflectancia en el dominio del tiempo, entre 610 y 700 cada 5nm, registrando 100.000 puntos por curva (Cubeddu et al. 1999).

Para cotejar las medidas con medidas de parámetros estándar de calidad de frutas se empleó un texturómetro de sobremesa (Texture Analyser TAXT2) con el que se realizaron ensayos Magness-Taylor, carga / descarga confinada sobre una probeta de fruta, y punción con aguja a través de la piel. Así mismo se registraron los valores de color (con un espectrofotómetro Minolta 450), ácidos totales y sólidos solubles (Barreiro et al. 1998).

El material vegetal empleado fue adquirido durante distintos períodos de ensayo a lo largo de 1996 y 97, en mercados locales de Milán, realizando posteriormente a una clasificación de ejemplares para conformar lotes con distintos niveles de madurez. Se ensayaron 60 Golden Delicious, 45 Granny Smith, 20 Starking Delicious, 10 Jonagold y 28 Topred, con objeto de realizar un sondeo en diferentes variedades.

## 2.2. Análisis

Con este sistema se obtiene en tiempo real el número de fotones recuperados en cada instante, pudiendo construir entonces una nube de puntos similar a un histograma temporal, que se ajusta estadísticamente a una curva teórica usando una aproximación de difusión de la ecuación de transporte de Patterson para un medio homogéneo semi infinito, que tiene en cuenta el índice de refracción en la superficie. La curva experimental es ajustada con una convolución de la función teórica y con la función de transferencia instrumental. De esta forma se obtienen los coeficientes  $\mu_a$  (coef. de absorción) y  $\mu'_s$  (coef. de dispersión de transporte o scattering), (Cubeddu et al. 1994a).

En cuanto a parámetros de calidad de la fruta, de las curvas obtenidas con los ensayos antes citados se extrajeron las variables clásicas, como fuerza máxima, deformación en fuerza máxima, pendiente y área bajo la curva, para ser empleadas posteriormente en los análisis estadísticos realizados: análisis de componentes principales (PCA), regresión múltiple y clasificación no supervisada (clustering). (Ruiz-Altisent M. et al. 1998)

## 3. Resultados

### 3.1 Características de la medida TRR

La precisión de la medida para la detección de los coeficientes de absorción y dispersión en un medio turbio ya ha sido estudiada en trabajos previos por Cubeddu et al. En general, la precisión de la medida aumenta para valores más altos de la distancia entre fibras, siempre que puedan ser recogidos un número suficiente de fotones (unos  $10E5$ ). Para una distancia entre fibras de 1,4 cm la medida de absorción presenta una precisión del 10%, mientras que la de dispersión se sitúa en 20%. Para una distancia de 1,5 cm, según se ha usado en el estudio presente, y un valor de dispersión mayor de  $10 \text{ cm}^{-1}$ , se espera un resultado mejor.

También se investigó la profundidad de penetración de la medida con esta técnica. Según las teorías clásicas que definen el comportamiento de la luz en un medio turbio, el volumen invadido por la luz al dispersarse en el medio tiene más o menos "forma de plátano", esto es, un semitoroide estrechado hacia los extremos, desde el punto de inserción de la luz

hasta el punto en el que es recogida la luz saliente. Sin embargo no es fácil definir el volumen medido ya que el camino que siguen los fotones puede ser más o menos largo o coincidir en mayor o menor medida con la región "del plátano". Por ello se intentó determinar la profundidad máxima de penetración de la luz en la pulpa, con objeto de definir la parte del fruto que proporciona información detectable en la medida.

Se tomaron espectros de una manzana, quitando rebanadas sucesivas de pulpa del fruto desde el extremo opuesto a la luz. El valor de la absorción no cambia hasta eliminar porciones de fruta alejadas una distancia de 2,7 cm del punto de inserción de la luz. En 2,1 cm, la absorción empieza a desviarse de la medida en la manzana entera, con una discrepancia del 25% a 680 nm, mientras que para un espesor de 1,5 cm la discrepancia aumenta hasta el 50%. Las mayores variaciones se observaron en las colas del espectro, donde la absorción es menor. La dispersión mostró un comportamiento similar. Estos resultados muestran que la medida con esta técnica está proporcionando una profundidad de unos 2 cm en la pulpa. Por supuesto, la profundidad de penetración depende de alguna forma de las propiedades ópticas de las frutas, y se espera un valor más bajo para medidas de mayor absorción y/o dispersión.

La técnica ha sido aplicada por primera vez hasta lo que conocemos a la medida no invasiva de absorción y dispersión en frutas. Por ello se intentó, en una primera aproximación, realizar una caracterización de variedades de una especie. La figura 2 muestra los resultados de la medida de una manzana Golden, una Granny (en el medio), y una manzana Starking (dcha.). Para cada fruto se hicieron dos medidas antes y después de retirar la piel. En ambos casos las fibras fueron puestas exactamente en el mismo punto. Los espectros obtenidos (con pico principal en 680 nm; clorofila b) para las manzanas enteras (cuadros llenos) son bastante similares a los espectros de las manzanas peladas (cuadros vacíos) tanto para la absorción como para la dispersión. Por tanto, es posible inferir que la técnica mide las propiedades ópticas de la fruta sin ser afectada por el color de la piel.

En cuanto a las variaciones detectables entre diferentes posiciones en el mismo fruto, la cara menos coloreada de la manzana normalmente muestra mayor absorción en esta zona del espectro (600-700 nm), aunque las diferencias son bastante bajas para frutas poco absorbentes (con poco contenido en clorofila). En cuanto a la dispersión, para las manzanas rojas se observan los mayores valores, intermedios para las amarillas, y los más bajos para las verdes, aunque se dan variaciones internas también entre frutos diferentes de la misma variedad, o entre posiciones diferentes dentro de la misma muestra.

Para comprobar la sensibilidad de la técnica a cambios durante la maduración, se midieron frutas almacenadas a temperatura ambiente durante cierto tiempo. Dos manzanas Golden con diferente grado de madurez fueron medidas en dos momentos, y los resultados se muestran en la figura 3. Hay una clara disminución del coeficiente de absorción, en relación con la disminución del contenido en clorofila, como evidencian las dos manzanas. Bajo las condiciones experimentales propuestas en este estudio, la técnica es capaz de seguir el cambio relativo del coeficiente de absorción con una precisión del 2%. Por tanto, se espera una alta sensibilidad en la monitorización de los procesos internos de la fruta con relación a los cambios en el coeficiente de absorción.

Se han realizado nuevos ensayos ampliando la región espectral hacia la zona del infrarrojo, con prometedores indicios que habrá que validar. Sin embargo esta zona presenta problemas técnicos importantes (en monocromadores, detectores, etc.) y por su mayor coste.

### 3.2 Aplicación a diferentes especies de frutas

Los primeros resultados obtenidos de analizar los datos de manzana, muestran que la técnica es capaz, efectivamente, de detectar cambios en los parámetros de calidad de la fruta. Tras un análisis PCA, mediante regresión múltiple se han obtenido modelos de estimación de firmeza, de ácidos y de azúcares, para diferentes variedades de manzana. Por ejemplo, en Jonagold, usando las variables TRR  $\mu$  en 800nm,  $\mu$  en 675nm,  $\mu$ 's en 675nm y dos variables de color, se estima el módulo de elasticidad (pendiente de la curva Magness-Taylor) con  $R^2=0,71$ . En Starking, combinando  $\mu$  en 800nm,  $\mu$ 's en 675nm y dos variables de color, se estima al contenido en ácidos con  $R^2=0,82$ . El contenido en azúcares puede ser estimado en Starking con  $\mu$  en 800nm y  $\mu$ 's en 800nm, dando un  $R^2=0,60$ .

Hasta ahora, hemos mostrado espectros y resultados tomados de manzanas. Sin embargo la técnica es aplicable a otras frutas o verduras de piel fina. En nuestros laboratorios se están ensayando tomates, melocotones, nectarinas, melones, peras y kiwis, cuyos resultados esperamos publicar en breve.

### 4. Discusión

Se necesitan más estudios para correlacionar las medidas ópticas con otros parámetros físicos o químicos de la fruta, como el contenido en azúcar, la acidez, o la firmeza. Seguramente esta técnica puede ser usada en la detección de sustancias absorbentes como la clorofila o los carotenoides en el rango visible, o el azúcar y el agua en la región infrarroja. También, esta técnica puede ser aplicada en el futuro en los procesos de maduración o durante el almacenamiento según se van desarrollando los cambios en los compuestos absorbentes. Por otro lado la dispersión en el interior de la fruta es principalmente debida a las variaciones en el índice de refracción entre líquidos y membranas. Por ello el coeficiente medio de dispersión puede proporcionar información útil sobre la estructura interna de la fruta, según se sugirió en un estudio reciente en kiwis (McGlone, Abe, and Kawano 1997).

Los modelos de regresión obtenidos son pobres, hasta el momento, y en muchos casos no llegan a un ajuste mínimo  $R^2>0.6$ . Sin embargo son suficientes para mostrar la viabilidad de la técnica y la posibilidad de creación de sistemas de medición no destructiva de parámetros de calidad. Con una profundización en el análisis de datos y un mejor entendimiento de los fenómenos ópticos en la fruta, prevemos que será factible obtener modelos de estimación más ajustados, y para distintas especies vegetales.

Un posible inconveniente en el uso de esta técnica para aplicaciones reales en agricultura es que el coste y complejidad de la instrumentación son muy altos, especialmente cuando se necesitan dos o más longitudes de onda. Aún así, el rápido progreso de la electrónica óptica y de las telecomunicaciones ha llevado a un rápido crecimiento de los dispositivos instrumentales para las medidas en el dominio del tiempo y a un desarrollo de dispositivos compactos y de bajo coste a corto plazo.

### 5. Conclusiones

En conclusión, se ha mostrado por primera vez la posibilidad de aplicación en manzanas de esta técnica no invasiva de detección de los coeficientes de absorción y dispersión de transporte. Usando una distancia entre fibras de 1,5 cm, la medida es sensible a las propiedades ópticas de la pulpa hasta una profundidad de aproximadamente 2 cm, y no se ve influida por la piel. En el rango de longitudes de onda entre 610 y 700 el espectro de absorción de la clorofila y por tanto cuantificar el contenido en clorofila de la pulpa: en longitudes de onda

mayores se puede obtener información interesante para crear modelos de estimación de otros parámetros de calidad. La técnica es aplicable a otras frutas y hortalizas turbias de piel fina, así como en otras zonas del espectro. Se están realizando más investigaciones para relacionar estas propiedades ópticas de la pulpa con la medida de la calidad de la fruta y su grado de madurez.

## 6. Agradecimientos

Los autores desean agradecer a la Comunidad de Madrid la financiación aportada (beca FPI), así como a la DG XII (Ciencia, Investigación y Desarrollo) de la Comisión Europea por el proyecto de investigación FAIR nº CT96-1060 en el que se desarrolla este trabajo.

## 7. Bibliografía

Bellon-Maurel, V., V. Steinmetz, L. Dusserre-Bresson, J. C. Jacques, and G. Rannou. 1996. Real-Time NIR Sensors to Sort Fruit and Vegetables According to Their Sugar Content. GIQUAL - Sensors and Information Engineering for Food Quality and Agriculture.

Cubeddu, R., M. Musolino, A. Pifferi, P. Taroni, and G. Valentini. 1994a. Time-Resolved Reflectance: A Systematic Study for Application to the Optical Characterization of Tissues. IEEE Journal Of Quantum Electronics 30, no. 10: 2421-30.

Cubeddu, R., M. Musolino, A. Pifferi, P. Taroni, G. Valentini, and Conti G. 1994b. Absorption Spectrum of Hematoporphyrin Derivative in vivo in a Murine Tumor Model. Photochemistry and Photobiology 60, no. 6, 582-85.

Cubeddu, R., A. Pifferi, P. Taroni, G. Valentini, A. Torricelli, C. Valero, M. Ruiz-Altisent, and C. Ortiz. 1999. Non-destructive measurements of the optical properties of fruits by means of time-resolved reflectance. International Biomedical Optics Symposium (BIOS).

Barreiro P., C. Ortiz, M. Ruiz-Altisent, V. De Smedt, S. Schotte, Z. Bhanji, J. Wakeling, P.K. Beyts. 1998. Comparison between sensorial and instrumental measurements for meakness assessment in apples. A collaborative study. Journal Of Texture Studies, Vol 29 (5): 509-525.

Ruiz-Altisent M. y P. Barreiro. 1998. Medida instrumental de la harinosidad en manzana. Fruticultura Profesional nº 94:52-56.

McGlone, V. A., H. Abe, and S. Kawano. 1997. Kiwifruit firmness by near infrared light scattering. J. Near Infrared Spectroscopy 5: 83-89.

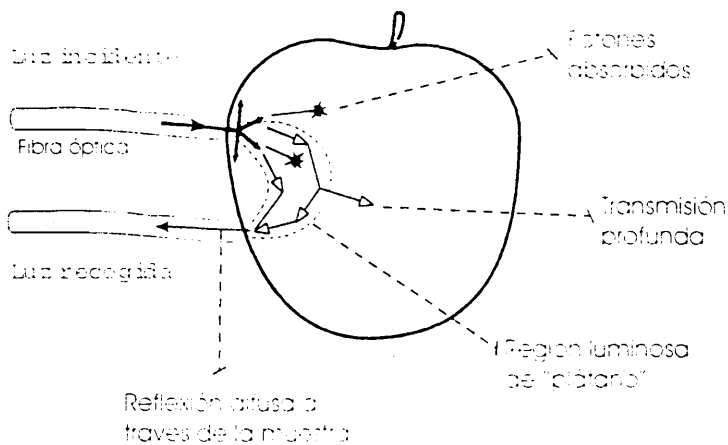


Figura 1. Comportamiento del haz de luz en el interior de la muestra. El haz de fotones láser es inyectado en el fruto mediante la fibra óptica superior, produciendo una inmediata dispersión de los mismos en todas direcciones dentro del tejido. Los fotones recogidos en la fibra óptica de retorno son los que, con mayor probabilidad, viajan por la pulpa describiendo en su conjunto una región con forma de semicírculo achatado (o "plátano").

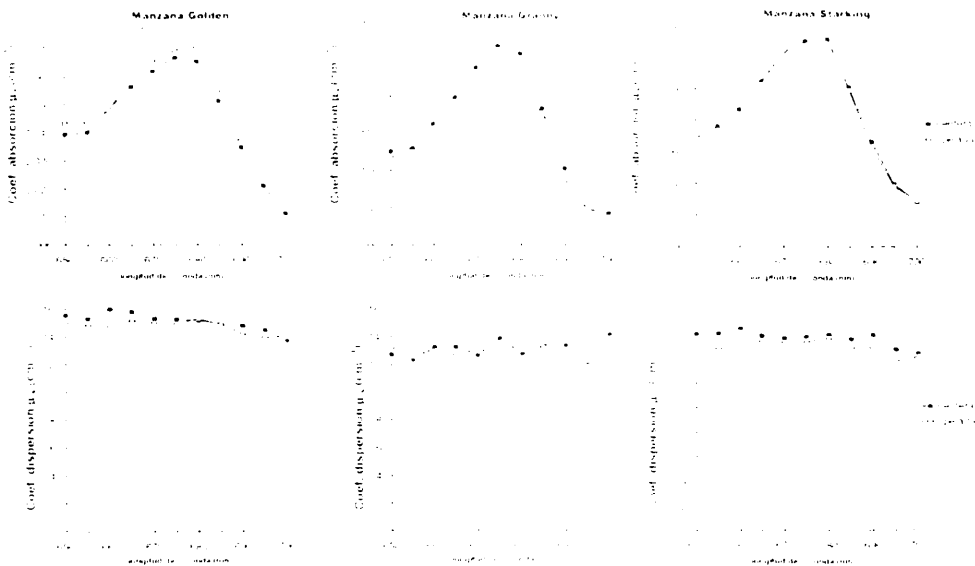


Figura 2. Espectros de absorción ( $\mu_a$ ) y dispersión de transporte ("scattering",  $\mu'_s$ ) de manzanas de tres variedades. Las medidas fueron realizadas en el mismo punto de cada fruto, antes y después de retirar la piel, observando mínimas diferencias entre los frutos pelados y enteros.

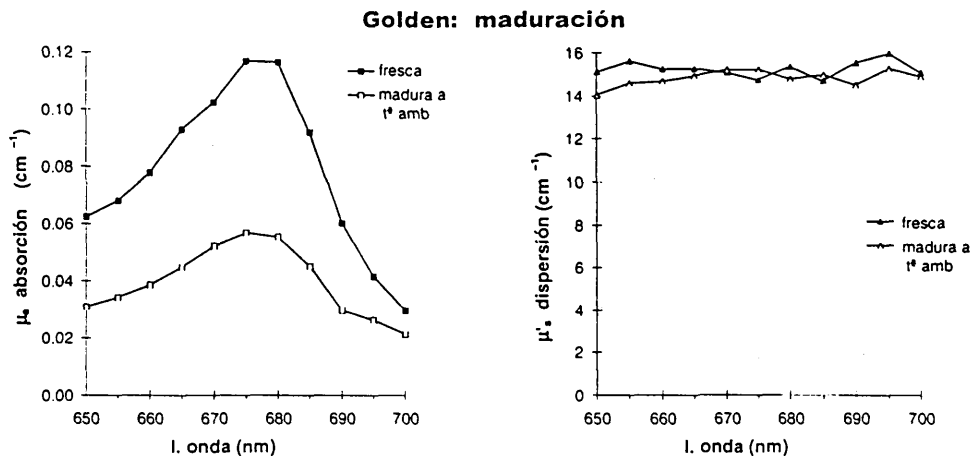


Figura 3. Seguimiento de la maduración de una manzana Golden, tras permanecer 12h a temperatura ambiente. Las variaciones en absorción son más significativas que las observadas en los valores de dispersión.