



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

PROGRAMA

CIENCIAS Y TECNOLOGÍA AGRARIAS, ALIMENTARIAS, DE LOS
RECURSOS NATURALES Y DEL DESARROLLO RURAL

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL

TESIS DOCTORAL

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN
DE LA ESPECIE EN HARINAS
PROTEICAS DE ORIGEN ANIMAL
MEDIANTE EL USO DE DE
SENSORES HIPERSPECTRALES

Cecilia Riccioli

Córdoba, Noviembre 2011

TÍTULO: *Detección y cuantificación de la especie en harinas protéicas de origen animal mediante el uso de sensores hiperspectrales.*

AUTOR: *Cecilia Riccioli*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2012
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

TÍTULO DE LA TESIS: **DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA ESPECIE EN HARINAS PROTEICAS DE ORIGEN ANIMAL MEDIANTE EL USO DE SENSORES HIPERSPECTRALES**

DOCTORANDO/A: Cecilia Riccioli

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

La doctoranda se incorporó en el año 2007, al Grupo de Investigación Zootecnia, como Becaria de Investigación, con cargo a proyectos. Todas las actividades de investigación, estancias de formación, asistencias a cursos y Congresos Nacionales e Internacionales, han sido financiadas, en su totalidad o en parte, por los siguientes Proyectos de I + D + I:

Tecnología NIR: la huella espectral como herramienta (at-line y on-line) para incorporar en sistemas de control de calidad, seguridad y trazabilidad en dietas completas y sus ingredientes a nivel de explotación. MCYT-INIA (2005-2007).

Seguridad y trazabilidad en la cadena alimentaria usando NIRS. P. Excelencia CICE-Junta de Andalucía (2006-2009).

Detection of presence of species-specific processed animal proteins in animal feed. SAFEFEEED VI PM (2006-2009).

Su trabajo de Tesis Doctoral, ha conllevado una amplia formación en múltiples aspectos, ligados al análisis NIR-imagen. En el primer año de Tesis realizó una selección de cursos de Doctorado, que permitieran ampliar su formación de Grado, y que incidieran en aspectos matemáticos, estadísticos, de tecnología NIRS, de sensores multi e hiperspectrales y de control, calidad y trazabilidad de productos agroalimentarios. Dado que el grueso de su trabajo de investigación debería realizarse con un instrumento NIR-imagen, cuya aparición en el mercado, fue muy reciente en relación al inicio de sus trabajos, se posibilitó una formación específica en dicha instrumentación, tanto mediante curso realizado por el fabricante de la instrumentación, como así como mediante una estancia de dos semanas en el Centre Wallon de Recherches Agronomiques, Gembloux, Bélgica, durante la cual se introdujo en el análisis NIR-Imagen y asimismo, en el tratamiento multivariante de datos utilizando diferentes software (ISys y MATLAB). Posteriormente durante el año 2008, comenzó el análisis NIR-imagen propiamente dicho del material objeto de estudio de su Tesis Doctoral, tras un riguroso trabajo de optimización y protocolización de dicho análisis, para el caso de harinas animales, ya que no existían trabajos científicos publicados, con este material e instrumentación. En el año 2009 y una vez que contaba con unas bases de datos de imágenes hiperspectrales de harinas, realizó una segunda estancia de investigación de tres meses, en el Departamento de Biosistemas de la Universidad de Leuven. Durante dicha estancia, continuó con los trabajos ya iniciados en la UCO, en lo referente a metodologías de selección de píxeles relevantes. Los años siguientes, se han dedicado íntegramente al análisis multivariante de grandes bases de datos hiperspectrales (aspecto este de gran complejidad, tanto por el elevado volumen de datos manejados, como por la sofisticación de los algoritmos a emplear). Esta actividad se ha simultaneado, con asistencias a Congresos y Seminarios, con la redacción y publicación de artículos y con la propia redacción del documento de Tesis. Independientemente de las estancias realizadas en el extranjero, la doctoranda ha tenido múltiples oportunidades de formación y discusión de resultados en Córdoba, durante las estancias y visitas que desde hace 4 años realiza anualmente el Prof. Dr. Tom Fearn, Director del Departamento de Estadística de la University College London, una de las figuras más relevantes del tratamiento estadístico y multi e hipervariante de datos espectrales.

La Tesis Doctoral realizada por Cecilia Riccioli es de una indudable novedad científica, tanto por la instrumentación utilizada, como por la metodología de tratamiento de datos. Asimismo tiene una importante repercusión socio-económica, ya que, básicamente, muestra la posibilidad de detección de la especie animal en subproductos proteícos de origen animal, aspecto éste de vital importancia para que la Comisión Europea levante la prohibición existente de alimentar una especie con harinas procedente de su misma especie, evitando así el canibalismo, y contribuyendo a la minimización del riesgo de EEB.

Publicaciones

Riccioli, C., Pérez-Marín, D., Guerrero-Ginel, J., Saeys, W., Garrido-Varo, A. (2011). Pixel selection for near-infrared chemical imaging (NIR-CI) discrimination between fish and terrestrial animal species in animal protein by-product meals. *Applied Spectroscopy* 65 (7), pp. 771-781.

Fearn, T., Riccioli, C., Garrido-Varo, A., Guerrero-Ginel, J.E. (2009). On the geometry of SNV and MSC. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 96 (1), pp. 22-26.

Contribuciones a Congresos

C. Riccioli*, D. Pérez-Marín, J.E. Guerrero-Ginel, Tom Fearn , and A. Garrido-Varo. Pure and mixed pixels analysis for the detection of MBM in animal by-products feeds. IIASIM-2010. DUBLIN, IRLANDA, 18 Y 19 NOVIEMBRE DE 2010.

Cecilia Riccioli. Análisis de imágenes híperespectrales basada en la tecnología NIRS para el control de harinas animales. 1ER CONGRESO CIENTÍFICO DE INVESTIGADORES EN FORMACIÓN. CÓRDOBA, ESPAÑA, 15 Y 16 DE OCTUBRE DE 2009.

Riccioli, C., Saeys, W., Pérez-Marín, D., Vallesquino-Laguna, P., Guerrero-Ginel, J., Garrido-Varo, A. Hyperspectral Imaging for the discrimination of ruminant and non-ruminant animal by-products: statistical parameters to evaluate the reliability of pixel selection method. INTERNATIONAL WORKSHOP ON MULTIVARIATE IMAGE ANALYSIS. VALENCIA, ESPAÑA, 28 Y 29 SEPTIEMBRE DE 2009.

C. Riccioli, W. Saeys , P. Vallesquino-Laguna, D. Pérez-Marín, J.E. Guerrero-Ginel and A. Garrido-Varo. Calibration pixel selection for hyperspectral discrimination of ruminant and fish animal by-products. THE 14TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON NEAR INFRARED SPECTROSCOPY (NIR-2009). BANGKOK, THAILAND. 7-13 NOVIEMBRE DE 2009.

C. Riccioli, P. Vallesquino-Laguna, D. Pérez-Marín, A. Garrido-Varo and J.E. Guerrero-Ginel. Evaluation of methods for section of relevant pixels from near-infrared chemical images of very heterogeneous samples and high number of similar particles: bovine and porcine meat and bone meals. EASIM – 09 (HYPER SPECTRAL IMAGING). GEMBLOUX, BÉLGICA, 3 Y 4 MARZO DE 2009

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 5 de Noviembre de 2011

Firma de las directoras

Fdo.: _Ana Garrido Varo

Fdo.: Dolores C. Pérez Marín

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS _____	IV
LISTA DE FIGURAS _____	VII
LISTA DE TABLAS _____	XIII
INTRODUCCIÓN _____	1
Bibliografía _____	7
OBJETIVOS _____	9
CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA _____	11
1.1. Los subproductos de origen animal y la encefalopatía espongiforme bovina _____	11
1.2. Estado actual del conocimiento en el uso de métodos de identificación de ingredientes de origen animal en piensos y mezclas _____	19
1.3. Análisis NIRS _____	26
1.4. De la espectroscopía clásica al análisis de imagen _____	32
1.5. Ventajas e inconvenientes de la tecnología NIR-CI _____	41
1.6. Variables que influyen sobre la calidad durante la adquisición de imágenes hiperespectrales _____	42
1.7. Influencia de la repetibilidad espectral en el análisis NIR-CI _____	45
1.8. Métodos para la selección de píxeles representativos _____	47
1.9. Herramientas para el análisis cuantitativo y cualitativo de imágenes hiperespectrales _____	49
1.10. Algoritmos discriminantes _____	58
1.11. Aplicación de modelos cuantitativos en NIR-CI _____	67
1.12. Aplicaciones de la tecnología NIR-CI en la industria agroalimentaria _____	70
1.13. Bibliografía _____	82
CAPÍTULO 2. OPTIMIZACIÓN DE PARAMETROS PARA EL ANALISIS HIPERESPECTRAL DE HARINAS ANIMALES _____	107
2.1. Objetivos _____	107
2.2. Metodología _____	107
2.3. Resultados _____	116

2.4. Consideraciones finales _____	128
2.5. Bibliografía _____	130
CAPÍTULO 3. EVALUACION DE LA REPETIBILIDAD ESPECTRAL DE LAS IMÁGENES HIPERESPECTRALES _____	133
3.1. Objetivos _____	133
3.2. Metodología _____	133
3.3. Resultados _____	140
3.4. Consideraciones finales _____	166
3.5. Bibliografía _____	168
CAPÍTULO 4. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE COMPRESIÓN Y REDUCCIÓN DE DATOS PARA LA DISCRIMINACIÓN DE ESPECIES ANIMALES _____	170
4.1. Objetivos _____	170
4.2. Metodología _____	170
4.3. Resultados y discusión _____	176
4.4. Consideraciones Finales _____	190
4.5. Bibliografía _____	191
CAPÍTULO 5. COMPARACIÓN DE MÉTODOS MULTIVARIANTES PARA LA DETECCIÓN DE COMPOSICIÓN DE HARINAS DE ORIGEN ANIMAL__	193
5.1. Objetivos _____	193
5.2. Metodología _____	193
5.3. Resultados _____	198
5.4. Aplicación de PLSDA para la discriminación entre harinas de ave, cerdo y rumiante _____	223
5.5. Consideraciones finales _____	240
5.6. Bibliografía _____	242
CAPÍTULO 6. PUESTA A PUNTO DE UN PROTOCOLO PARA ANÁLISIS CUANTITATIVO _____	245
6.1. OBJETIVOS _____	245
6.2. Metodología _____	245

6.3. Resultados	250
6.4. Consideraciones finales	276
6.5. Bibliografía	277
CAPÍTULO 7. COMPARACIÓN ENTRE NIR-CI Y NIRS CLASICA	278
7.1. Objetivos	278
7.2. Metodología	280
7.3. Resultados	286
7.4. Consideraciones finales	298
7.5. Bibliografía	299
CONCLUSIONES E INVESTIGACIÓN FUTURA	300
ANEXOS	303

LISTA DE ABREVIATURAS

3 D:	Tres dimensiones
A/D:	Analog-to-digital converter
AAFCO:	Association Of American Feed Control Officials
ANN:	Artificial Neural Network
ANOVA:	Analysis of variance
AOTF:	Acousto-optic tunable filter
Bin:	Binning
BPNN:	Backpropagation Feedforward Neural Network
BSE:	Bovine Spongiform Encephalopathy
CA:	Correlation Analysis
CAL:	Colectivo de calibración
CART:	Classification and Regression Tree
CCD:	Charge coupled device
CI:	Chemical Imaging
CLS:	Classical Least Squares
DCA:	Discriminant Cluster Analysis
DNA:	Deoxyribonucleic acid
DT:	Detrend
EC:	European Commission
ELISA:	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FAO:	Food and Agriculture Organization
FDA:	Factorial Discriminant Analysis
FPA:	Focal Plane Array
FOV:	Field Of View
FT:	Fourier Transform
FTIR:	Fourier Transform Infrared
FWHM:	Full width at half maximum
GA:	Genetic Algorithms
GaAr:	Arseniuro de Galio
Ge:	Germanio
HgCdTe:	Telururo de mercurio-cadmio
HSA:	Harina de subproductos avícolas
HP:	Harina de pescado
HT:	Harina de animales terrestres
InGaAs:	Arseniuro de Indio-Galio
InSb:	Antimoniuro de Indio
Km:	K-means
LCTF:	Liquid Crystal Tunable Filter
LDA:	Linear Discriminant Analysis
LV:	Latent Variable
ME:	Material estándar

MIA:	Multivariate Image Analysis
MBM:	Meat and Bone Meal
MCR-ALS:	Multivariate Curve Resolution–Alternating Least Squares
MD:	Mahalanobis Distance
ME:	Material estándar
MIA:	Multivariate Image Analysis
MIR:	Mid infrared
MLR:	Multiple Linear Regression
MO:	Microscopía Óptica
MSC:	Multiplicative Signal Correction
MSI:	Multispectral Image Analysis
OIE:	World Organisation for Animal Health
NIR-CI:	Near-Infrared Chemical Imaging
NIRM:	Near Infrared Microscopy
NIST:	National Institute of Standards and Technology
PAPs:	Processed Animal Proteins
PARAFAC:	Parallel Factor
PAT:	Process Analytical Technology
PC:	Principal Component
PCA:	Principal Component Analysis
PCR:	Principal Component Regression
PDA:	Penalized Discriminant Analysis
PET/ALU/PE:	Poliéster film aluminium foil and poliéster film lamination
PIXEL:	Picture Element
PLS:	Partial Least Squares
PLSDA:	Partial Least Squares Discriminant Analysis
PRED:	Colectivo de Validación Externa (también VAL)
R:	Reflectance
RD%:	Índice de diferencia relativa
RFN:	Reddish, Firm, Non-exudative
RGB:	Red-Green-Blue
RMSE:	Root Mean Square Error (Error Cuadrático Medio)
RMSEC:	Root Mean Square Error of Calibration
RMSECV:	Root Mean Square Error of Cross Validation
RMSEP:	Root Mean Square Error of Prediction
ROI:	Region of Interest
RSE:	Reddish, Soft and Exudative
SAM:	Spectral Angle Mapper
Si:	Silicio
SID:	Spectral Information Divergence
SIH:	Sensores de Imagen Hiperspectral
SIMCA:	Soft Independent Modeling of Class Analogy
SIMPLISMA:	Simple-to-use interactive Self-modeling Mixture Analysis
S/R:	Señal/Ruido
SNV:	Standard Normal Variate

SPOAs:	Subproductos Proteicos de Origen animal
SRM:	Material de riesgo especificado
STD:	Standard Deviation
SVM:	Support Vector Machine
TI:	Tiempo de integración
TSE:	Transmissible Spongiform Encephalopathies
UE:	Unión Europea
USDA:	United States Department of Agriculture
VAL:	Colectivo de Validación Externa
VIP:	Variable Importance Projection
Vis/Nir:	Visible e infrarrojo cercano
WHO:	World Health Organization
λ :	Longitud de Onda

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Proceso básico de producción del reciclaje de subproductos de origen animal. Adaptado de [5].	12
Figura 2.	Representación esquemática y simplificada de las disposiciones de prohibición de piensos de animales de granja de acuerdo con la UE [18].	19
Figura 3.	Esquema del proceso de análisis por MO para detección de harinas animales. Adaptado de [24].	21
Figura 4.	Representación de la radiación electromagnética polarizada. E = campo eléctrico y B = campo magnético. λ = longitud de onda, A_E = amplitud para el componente eléctrico de la radiación.	27
Figura 5.	Representación gráfica de las zonas del espectro NIR donde se manifiestan los principales grupos funcionales. Imagen extraída de [82].	29
Figura 6.	Absorción (P_A), transmisión (P_T) y reflexión (P_R) de la radiación electromagnética al interactuar con la materia.	30
Figura 7.	Cubo de datos (o hipercubo) generado durante un análisis NIR-CI. Dos dimensiones representan la distribución de los compuestos. La tercera representa la distribución espectral y permite su identificación.	36
Figura 8.	Desdoblamiento del cubo hiperespectral para facilitar el análisis multivariante.	37
Figura 9.	Esquema de las tres técnicas existentes para la adquisición del cubo de datos: (a) escaneo de puntos, (b) escaneo de línea (c) escaneo de plano. Adaptada de [93].	38
Figura 10.	Las tres configuraciones comunes en los dispositivos utilizados en NIR-CI y la estructura final del cubo de datos ($X \times Y \times \lambda$). Adaptada de [94].	39
Figura 11.	Métodos de extracción para crear mapas de distribución.	52
Figura 12.	Descomposición PCA de la matriz de datos \mathbf{D} siguiendo un modelo lineal por un número de componentes $N = 3$.	54
Figura 13.	Pasos para transformación de datos y calibración para obtener el mapa de distribución. Adaptada de [136].	57
Figura 14.	Obtención del modelo PLSDA. Adaptado de [162].	60
Figura 15.	Modelado individual para cada clase en SIMCA.	61
Figura 16.	Esquema de los 3 pasos de un análisis CART.	63
Figura 17.	Clasificación general de los Métodos de Calibración Multivariantes. Adaptado de [183].	68

Figura 18. a: Muestras de harinas animales selladas. b: Apertura de la muestra para su análisis. c: Colocación de 1 g. de muestra en el espejo de acero inoxidable. d: Adquisición de referencia negra tapando el objetivo. e: Adquisición de la referencia blanca con la cerámica blanca. f: Colocación de la muestra para su análisis.	111
Figura 19. Representación de diferentes tratamientos de binning (1 x 1, 2 x 2, 3 x 3) y del efecto en la resolución de la imagen.	113
Figura 20. Niveles de saturación (de 0 a 2^{12}) para los tres materiales. a= tapa, b=espejo de acero inoxidable, c= papel de lija.	117
Figura 21. Espectros de 4 píxeles por cada uno de los materiales candidatos: papel de lija, espejo de acero inoxidable y tapa. Valores de intensidad.	118
Figura 22. Mapa topológico de las distancias MD de los píxeles al centro de las imágenes de: a) tapa, b) espejo de acero y c) papel de lija.	119
Figura 23. Imagen topológica de los valores de absorbancia ($\log 1/R$) a 1520 nm de las imágenes concatenadas de los diez análisis del ME.	121
Figura 24. MD desde cada análisis al centro de la población para cada una de las modalidades de frecuencia de referencia.	123
Figura 25. Valores promedios de MD desde cada imagen analizada en las tres condiciones de iluminación al centro de la población.	125
Figura 26. a) Imágenes de los valores de absorbancia ($\log 1/R$) de la muestra de MBM en los diferentes porta muestras: 1. Porcelana, 2. Espejo de acero, 3. Papel de lija y 4. Teflón. b) histogramas de las imágenes con los valores de absorbancia de muestra y porta muestras.	127
Figura 27. Presentación de una muestra de harina de carne en forma molida para el análisis NIR-CI.	134
Figura 28. Diagrama de dispersión de los valores de absorbancia de dos replicas del ME (ME1 y ME 2) a la longitud de onda de 1110 nm.	141
Figura 29. a) Imagen en escala de grises del ME a 1260 nm. b) espectros de reflectancia correspondientes a tres diferentes zonas de la imagen.	142
Figura 30. a: mapa de las distancias de Mahalanobis de los píxeles de r1 al centro de su población. b: mapa de las distancias de Mahalanobis de r1 al centro de la población de r2.	143
Figura 31. Mapa de RD% entre los píxeles de r1 y r2.	144
Figura 32. a: Mapa de las distancias de Mahalanobis de la imagen de la muestra 1a al centro de su población. b: Mapa de las distancias de Mahalanobis de la imagen de la muestra 1b a 1a.	145
Figura 33. Representación de los <i>scores</i> de los PCs 1 y 2 correspondientes a las distancias MD de los píxeles de cada muestra. a: distancias MD a los píxeles de las muestras de la especie cerdo. b: distancias MD a los píxeles de las muestras de la especie ave. c: distancias MD a los píxeles de las	

muestras de la especie mezcla. d= distancias MD a a los píxeles de las muestras de la especie rumiante.	151
Figura 34. Loadings para las PCs 2 y 6 de los datos relativos a las 24 imágenes.	160
Figura 35. PCs 1, 2 y 5, 6 de las dos réplicas de las tres muestras de SPOA de rumiante. El color caracteriza la muestra y la forma de los símbolos indica las replicas.	161
Figura 36. PCs 5 y 6 de las dos réplicas de las 3 muestras de SPOA de cerdo.	162
Figura 37. Izquierda: mapas de <i>clusters</i> . Derecha: histogramas de frecuencias relativos a los píxeles pertenecientes a cada grupo.	164
Figura 38. Izquierda: mapas de <i>clusters</i> en una muestra formada por valores aleatorios. Derecha: histogramas de píxeles pertenecientes a cada grupo.	165
Figura 39. Izquierda: Imágenes concatenadas de 18 muestras [(a) valor de absorbancia a 1190 nm, (b) valor de absorbancia a 1190 nm después de los pretratamientos espectrales, (c) <i>scores</i> para el PC2]. Derecha: Histogramas de frecuencia de intensidad.	177
Figura 40. Espectros medios de harinas de pescado y de terrestres después de los pretratamientos DT, SNV y Mean Center.	178
Figura 41. Representación grafica de los valores de la variable discriminatoria para cada muestra del colectivo CAL para la discriminación entre pescado y rumiante.	179
Figura 42. PC1 vs. PC2 de una muestra de HP. Píxeles seleccionados utilizando 4 diferentes métodos de selección de píxeles.	182
Figura 43. Peso de las variables par alas primeras tres variables latentes (LVs) en el modelo PLSDA.	184
Figura 44. Diagrama de los <i>scores</i> de las dos primeras LVs para los cuatros colectivo de calibración (píxeles seleccionados utilizando cuatro diferentes métodos).	185
Figura 45. Izquierda: muestras CAL vs. predichas (clase pescado=0, clase terrestre=1) y muestra VAL HT. 20. Derecha: mapa de predicciones de la muestra Terr. 20 (en negro: píxeles predichos como clase HP, en blanco: píxeles predichos como clase HT).	187
Figura 46. Muestras de harinas de ave (a, b, c), cerdo (d, e, f) y rumiante (g, h, i) a la longitud de onda de 1200 nm. Valores de absorbancia.	199
Figura 47. Error de clasificación 1 (cerdo), 2 (ave) y 3 (rumiante) y valores medios en función del número de LVs.	200
Figura 48. Detección de <i>outliers</i> . Limite de confianza 95%	202
Figura 49. Valores VIP de las variables espectrales para las tres clases.	204
Figura 50. Mapa de predicciones de los pixeles de las muestras Cerdo Val 6 (arriba) y Ave Val 4 (abajo). En azul: píxeles pertenecientes a la especie cerdo. En verde: píxeles pertenecientes a la especie ave. En rojo oscuro: píxeles pertenecientes a la especie rumiante.	208

Figura 51. Izquierda: Curvas ROC estimadas (azul) y validadas (verde). El círculo rojo indica la posición del umbral. Derecha: Respuestas estimadas (línea discontinua) y validada (línea continua) para el modelo PLSDA2. Rojo: sensibilidad. Azul: Especificidad.	210
Figura 52. Mapa de predicciones de los píxeles de las muestras Cerdo Val 6 (izquierda) y Ave Val 4 (derecha) con SIMCA. En azul: píxeles pertenecientes a la especie cerdo. En verde: píxeles pertenecientes a la especie ave. En rojo oscuro: píxeles pertenecientes a la especie rumiante.	214
Figura 53. Árbol de clasificación (primeros 11 niveles) de las muestras del colectivo CAL. Triángulos azules: nodos. Círculos rojos: nodos terminales o hojas. C=clase cerdo. A= clase ave. R= clase rumiante. En el árbol se indican las λ y los valores límites asignados.	216
Figura 54. Coste por cada tamaño del árbol de clasificación utilizando el índice de Gini.	218
Figura 55. Mapa de predicciones de los píxeles de las muestras Cerdo Val 6 (arriba) y Ave Val 4 (abajo) con CART y los índices Gini, Towing y Deviance. En azul: píxeles pertenecientes a la especie cerdo. En verde: píxeles pertenecientes a la especie ave. En rojo oscuro: píxeles pertenecientes a la especie rumiante.	222
Figura 56. Representación grafica de los valores de la variable discriminatoria para cada muestra del colectivo CAL para la discriminación entre cerdo (Swine) y ave (Poultry).	225
Figura 57. Mapa de predicciones de los píxeles de las muestras Cerdo Val 6 (izquierda) y Ave Val 4 (derecha). Arriba: píxeles clasificados con el modelo "Solo <i>Mean Center</i> ". Abajo: píxeles clasificados con el modelo "SNV, DT, <i>Mean Center</i> ". En azul: píxeles pertenecientes a la especie cerdo. En verde: píxeles pertenecientes a la especie ave.	228
Figura 58. Representación gráfica de los valores de la variable discriminatoria para cada muestra del colectivo CAL para la discriminación entre ave y rumiante.	229
Figura 59. Mapa de predicciones de los píxeles de la muestra Ave Val 4. En verde: píxeles pertenecientes a la especie ave. En rojo oscuro: píxeles pertenecientes a la especie rumiante.	231
Figura 60. Representación gráfica de los valores de la variable discriminatoria para cada muestra del colectivo CAL para la discriminación entre cerdo y rumiante.	233
Figura 61. Mapa de predicciones de los píxeles de la muestra Cerdo Val6. En azul: píxeles correspondientes a la especie cerdo. En rojo: píxeles correspondientes a la especie rumiante.	235
Figura 62. Representación grafica de los valores de la variable discriminatoria para cada muestra del colectivo CAL para la discriminación entre no-rumiante y rumiante.	237
Figura 63. Representación gráfica de los valores de las variables discriminatorias para cada muestra y para las cuatro clases.	252
Figura 64. Clasificación de las muestras 15218, 15242 y 15248. Mapa de los píxeles predichos por cada clase. Azul marino= clase 1 (0.25-4%), turquesa=clase 2 (4.25-8%), amarillo=clase 3 (8.25-12%), marrón: clase 4 (12.25-16%).	255

Figura 65.	Porcentajes de MBM en las 32 muestras concatenadas del colectivo VAL. (N = 4480).	
		261
Figura 66.	Mapa de los pixeles predichos de las muestras del colectivo VAL. En azul: clase 1. En turquesa: clase 2. En amarillo: clase 3. En rojo oscuro: clase 4.	262
Figura 67.	Relación entre la predicción NIR-CI y los valores reales para el colectivo CAL (círculos negros) y VAL (triángulos rojos) obtenidos mediante PLS.	264
Figura 68.	Relación entre la predicción NIR-CI y los valores reales para el colectivo CAL (círculos negros) y VAL (triángulos rojos) obtenidos mediante PCR.	266
Figura 69.	Clasificación de las muestras del colectivo VAL. Mapa de los pixeles predichos en el rango 0 – 20% MBM.	267
Figura 70.	Mapa de predicciones de la muestra 15248 (8.95%), tanto en su forma original como tras tratamiento de Bin. Se indican los porcentajes de MBM predichos en cada formato de la muestra.	268
Figura 71.	Error de predicción de los píxeles de la muestra 15248 en función del nivel de Bin aplicado.	269
Figura 72.	Representación gráfica del colectivo CAL formado por los pixeles resultantes del tratamiento Bin 40x40: Hotelling T ² frente a Q residuals. En rojo: pixeles outliers.	271
Figura 73.	Representación gráfica del colectivo CAL formado por los pixeles resultantes del tratamiento Bin 40x40: Leverage frente a valores residuales de la STD. En rojo: pixeles outliers.	271
Figura 74.	Representación gráfica del colectivo CAL formado por los pixeles resultantes del tratamiento Bin 40x40: Valores predichos frente a valores medidos. En rojo: pixeles outliers.	272
Figura 75.	Valores predichos frente a medidos para el colectivo CAL (círculos negros) y VAL (triángulos rojos). Tratamiento colectivo CAL: Bin 40x40. Tratamiento colectivo VAL: Bin 40x40.	273
Figura 76.	Erorres de predicción para las muestras del colectivo VAL. En azul: errores de las muestras tratadas con Bin. En rojo: errores de las muestras tratadas con el uso del espectro medio.	275
Figura 77.	Escaneos de las cápsulas circulares. A. posición inicial. B: posición después de rotación de 90 grados.	281
Figura 78.	Espectros medios (log 1/R) del colectivo CAL en NIRS y NIR-CI	286
Figura 79.	Clasificación de las muestras en calibración y validación externa en la discriminación NIRS y NIR-CI entre dos grupos.	288
Figura 80.	VIP de las variables espectrales en NIRS y NIR-CI para la discriminación entre harinas puras y mezclas.	290

Figura 81. Valores predichos NIRS y NIR-CI <i>vs.</i> valores de referencia de los colectivos CAL (cuadrados azules) y VAL (triángulos naranjas) para la predicción del contenido de harina de rumiante.	292
Figura 82. VIP de las variables espectrales en NIRS y NIR-CI para la cuantificación de la harina de rumiante en mezclas.	295
Figura 83. Izquierda: “superespectros” QS (arriba) y EMIC (abajo) de las muestras del colectivo CAL. Derecha: valores predichos NIR-CI <i>vs.</i> valores de referencia de los colectivos CAL (cuadrados azules) y VAL (triángulos naranjas).	296
Figura 84. Izquierda: “superespectros” 3PCS de las muestras del colectivo CAL. Derecha: valores predichos NIR-CI <i>vs.</i> valores de referencia de los colectivos CAL (cuadrados azules) y VAL (triángulos naranjas).	297

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Composición de nutrientes de proteínas animales (National Research Council, 1994). 15	
Tabla 2.	Legislación para el uso de proteínas animales específicas en EU. _____	18
Tabla 3.	Comparación entre análisis de imagen RGB, NIRS, análisis multiespectral (MSI) y NIR-CI 32	
Tabla 4.	Principales aplicaciones de NIR-CI en fruta y verdura (página siguiente). _____	73
Tabla 5.	Principales aplicaciones de NIR-CI en calidad de piensos y productos de origen animal 77	
Tabla 6.	Principales aplicaciones de NIR-CI en seguridad y trazabilidad de alimentos. _____	80
Tabla 7.	Valores de RMSE, MD y STD para las tres modalidades de frecuencia de referencia. 122	
Tabla 8.	RMSE y MD para las tres modalidades de condiciones lumínicas. _____	124
Tabla 9.	Distancias de Mahalanobis medias de los píxeles de cada muestra al centro de población de cada muestra (página siguiente). _____	146
Tabla 10.	Desviaciones estándar de las distancias de Mahalanobis de cada muestra al centro de población de cada muestra. _____	148
Tabla 11.	Media y STD de las distancias de Mahalanobis dentro de cada especie. _____	152
Tabla 12.	Promedio y STD de las distancias de Mahalanobis de cada especie a las demás. ____	153
Tabla 13.	Coefficientes de determinación (r^2), pendientes (S), error de $r^2 = \sqrt{1-r^2}$ y error de $S = \sqrt{1-S}$ resultantes de la regresión entre las matrices de covarianza de muestras y submuestras dentro de cada especie (página siguiente). _____	154
Tabla 14.	Indices de diferencia relativa (RD%). _____	158
Tabla 15.	ANOVA de un diseño completo anidado de cuatro factores. _____	159
Tabla 16.	Porcentaje de píxeles correctamente clasificados utilizando el modelo PLSDA. En negrita las predicciones con valores de exactitud inferiores al 90%. _____	179
Tabla 17.	Valores de Wilk's Lambda values for pixels selected with four different methods. _	183
Tabla 18.	Estadísticos para la discriminación de harinas de pescado y terrestres usando PLSDA. 185	
Tabla 19.	Resultados de la predicción del colectivo CAL, espresado como % de píxeles correctamente clasificados. Comparación entre modelos contruidos utilizando diferentes colectivos CAL. 188	
Tabla 20.	Número de píxeles por cada especie de los colectivos CAL y VAL. _____	194

Tabla 21.	Estadísticos del modelo PLSDA1 (N=22932).	201
Tabla 22.	Estadísticos del modelo PLSDA2 (N=22269).	203
Tabla 23.	Matriz de clasificación de la validación de los modelos PLSDA1 y PLSDA2 de la especie CERDO.	205
Tabla 24.	Matriz de clasificación de la validación de los modelos PLSDA1 y PLSDA2 de la especie AVE.	206
Tabla 25.	Matriz de clasificación de la validación de los modelos PLSDA1 y PLSDA2 de la especie rumiante.	207
Tabla 26.	Matriz de clasificación de validación del modelo SIMCA en cerdo (N= 22269).	212
Tabla 27.	Matriz de clasificación de validación del modelo SIMCA en ave(N= 22269).	212
Tabla 28.	Matriz de clasificación de validación del modelo SIMCA en ave(N= 22269).	213
Tabla 29.	Matriz de clasificación del modelo CART para el colectivo VAL de la especie cerdo.	219
Tabla 30.	Matriz de clasificación del modelo CART para el colectivo VAL de la especie ave.	219
Tabla 31.	Matriz de clasificación del modelo CART para el colectivo VAL de la especie rumiante.	220
Tabla 32.	Estadísticos para el modelo PLSDA (N=18552) para la discriminación de cerdo vs. ave utilizando <i>Mean Center</i> como pretratamiento	224
Tabla 33.	Estadísticos para el modelo PLSDA (N=18552) para la discriminación de cerdo vs. ave utilizando SNV, DT y <i>Mean Center</i> como pretratamientos.	224
Tabla 34.	Matriz de clasificación de las muestras del colectivo VAL de cerdo tras la aplicación del modelo PLSDA generados con diferentes pretratamientos espectrales del modelo cerdo vs. ave PLSDA.	225
Tabla 35.	Matriz de clasificación de las muestras del colectivo VAL de ave tras la aplicación del modelo PLSDA generados con diferentes pretratamientos espectrales del modelo cerdo vs. ave PLSDA.	226
Tabla 36.	Estadísticos del modelo PLSDA Ave vs. Rumiante (N=12914).	229
Tabla 37.	Matriz de clasificación de las muestras de ave del colectivo VAL para el modelo ave vs. rumiante PLSDA.	230
Tabla 38.	Matriz de clasificación de las muestras de ave del colectivo VAL para el modelo ave vs. rumiante PLSDA.	231
Tabla 39.	Estadísticos del modelo PLSDA Cerdo vs. Rumiante (N=13072).	232
Tabla 40.	Matriz de clasificación de las muestras de cerdo del colectivo VAL para el modelo cerdo vs. rumiante PLSDA.	233

Tabla 41.	Matriz de clasificación de las muestras de rumiante del colectivo VAL para el modelo cerdo <i>vs.</i> rumiante PLSDA.	234
Tabla 42.	Estadísticos del modelo PLSDA Rumiante <i>vs.</i> Rumiante (N=22269).	236
Tabla 43.	Matriz de clasificación del modelo rumiante <i>vs.</i> no-rumiante PLSDA para las muestras de harina de cerdo del colectivo VAL	237
Tabla 44.	Matriz de clasificación del modelo rumiante <i>vs.</i> rumiante PLSDA para las muestras de HSA del colectivo VAL	238
Tabla 45.	Matriz de clasificación del modelo rumiante <i>vs.</i> rumiante PLSDA para las muestras de harina de rumiante del colectivo VAL	239
Tabla 46.	Estadísticos del modelo PLSDA de 4 clases utilizando el espectro medio (N=94).	253
Tabla 47.	Valores predichos de cada muestra considerando la imagen entera y los tres tratamientos de Bin.	256
Tabla 48.	Estima de los porcentajes de MBM% (o contaminación) en cada muestra considerando la imagen entera y los tres tratamientos de Bin.	258
Tabla 49.	Detalles del modelo PLSDA de 4 clases utilizando Bin 40 (N=3290).	260
Tabla 50.	Porcentajes de píxeles de las muestras 15218, 15242 y 15240 asignados a cada clase.	261
Tabla 51.	Estadísticos del modelo para la predicción PLS de diferentes porcentajes de MBM en mezclas binarias.	263
Tabla 52.	Estadísticos de calibración para la predicción PCR de diferentes porcentajes de MBM en mezclas binarias.	265
Tabla 53.	Estadísticos de calibración para la predicción PLS de diferentes porcentajes de MBM en mezclas binarias de pescado y vacuno.	270
Tabla 54.	Estadísticos del modelo PLS creado a partir de las muestras del colectivo CAL después de tratamiento de Bin 40x40 y validando con el colectivo VAL	272
Tabla 55.	Valores de referencia (medidos), valores predichos y RMSEP de cada muestra del colectivo VAL.	274
Tabla 56.	Distribución de las muestras para el análisis discriminante	280
Tabla 57.	Detalles de los modelos cualitativos creados con datos NIRS utilizando la cápsula de giro, datos NIRS utilizando la cápsula de 1/4 y datos NIR-CI.	288
Tabla 58.	Estadísticas de calibración para la de diferentes porcentajes de MBM en harinas de pescado. utilizando la cápsula de giro, cápsula de 1/4 y datos NIR-CI con espectro medio, espectro mediano, espectros del 1°,2° y 3° cuartil, espectros mediano+espectros intercuartiles y espectros de los primeros 3 loadings. (Página siguiente)	292

INTRODUCCIÓN

El uso de suplementos proteicos en la alimentación animal se remonta a tiempos antiguos. Las primeras referencias sobre la utilización de subproductos animales como fuente de proteínas se remontan al siglo XIX: Liebig recomienda su uso en la alimentación de cerdo en 1865 [1]. Años después, en 1909, un estudio realizado por Kellner sobre la alimentación científica de animales describe una forma primitiva de procesamiento industrial para la producción de harina de carne y huesos (MBM, del inglés *Meat and Bone Meals*) [2].

La producción industrial de subproductos de origen animal (SPOAs) lleva desarrollándose desde el comienzo del siglo XX, inicialmente con el suministro de piensos exclusivos para rumiantes y más tarde, debido al incremento de la demanda, también para cerdos y aves de corral.

La necesidad de control en la industria de pienso remonta a la época en la que las fábricas de piensos se construían generalmente en los principales puertos o cerca de vías navegables interiores para que la recepción de las materias primas importadas fuera más directa. Muchas de las materias primas venían importadas, incluyendo cereales como trigo, cebada, maíz, proteínas de cacahuets, semillas de lino, algodón y harina de pescado (de ahora en adelante HP). También se utilizaban algunos materiales de producción nacional generalmente subproductos de la industria alimentaria como trigo procedente de la fabricación de harina, restos de semillas oleaginosas procedentes de la fabricación de margarina, aceites de cocina y algunos MBM procedentes de la industria de procesamiento [3]. Más recientemente se empezó con el uso de mezclas entre subproductos y otras materiales para proporcionar una dieta completa. El proceso de elaboración de estas mezclas da lugar a los “piensos compuestos”.

Tras la aparición de la Encefalopatía Espongiforme Bovina (BSE, del inglés *Bovine Spongiform Encephalopathy*), los científicos británicos albergaron rápidamente sospechas de que la causa de la propagación de la epizootia fuera el consumo por los animales bovinos de MBM. Desde julio de 1988, Reino Unido prohibió la utilización de

proteínas derivadas de mamíferos en la alimentación de los rumiantes. Esta prohibición entró en vigor en la Unión Europea en junio de 1994, fecha de la adopción de la primera decisión comunitaria a tal efecto [4].

El Reglamento (CE) nº 999/2001 [5] estableció las medidas relativas a la alimentación de los animales y recogió la prohibición de utilizar proteínas animales y piensos en la alimentación de rumiantes, como son las proteínas animales transformadas, la gelatina proveniente de rumiantes, los productos sanguíneos, las proteínas hidrolizadas, el fosfato dicálcico y el fosfato tricálcico de origen animal en la alimentación de animales de cría.

Sin embargo existieron excepciones de uso en el caso algunas materias primas de origen animal y determinados piensos:

- Piensos para animales distintos de los rumiantes: harinas de pescado, proteínas hidrolizadas derivadas de animales distintos de los rumiantes y de los cueros, pieles de rumiantes, fosfato dicálcico y fosfato tricálcico.
- Piensos para rumiantes: leche, productos a base de leche y calostro, huevos y sus productos derivados, gelatina derivada de animales distintos de los rumiantes.
- Piensos para los peces: productos sanguíneos y harinas de sangre derivadas de animales distintos de los rumiantes.

Hoy en día, los SPOAs se elaboran de conformidad con lo dispuesto en el Reglamento (CE) nº 1774/2002 [6], por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales no destinados al consumo humano. Dicho Reglamento establece medidas estrictas de control para la recogida, el transporte, el almacenamiento, el tratamiento y la eliminación de los 16 millones de toneladas de materias no aptas para el consumo producidas cada año. Prevé igualmente la prohibición del reciclado intraespecies con el fin de excluir el “canibalismo”.

En marzo del 2011, la preocupación creciente por el déficit proteico, que afecta al sector de fabricación de piensos compuestos, provocó que la Dirección General SANCO aprobara una propuesta para suavizar las restricciones que se aplican en la UE, y actualmente existe un borrador de enmiendas a la Directiva (EC) N. 999/2001 [7]. Entre

las medidas que Bruselas quiere suavizar destaca la de la prohibición que la UE impuso a la utilización de proteínas animales en la fabricación de piensos, para todas las especies de animales de producción. En este caso, Bruselas propone admitir, por lo menos a partir de 2011, cierta "tolerancia" para que pueda emplearse de nuevo una pequeña cantidad de harinas procedentes de animales no-rumiantes, como alimento de animales no-hervívoros (no rumiantes). No obstante, la UE en dicha propuesta, sigue con el planteamiento de evitar el "canibalismo", es decir, evitar que el ganado consuma los reciclados de su misma especie, y sí permitiendo que los residuos de cerdos sirvan para alimentar pollos, pero no a cerdos. De todo esto, ahora solamente está permitido el empleo de proteínas de pescado para algunos casos.

A pesar de los esfuerzos realizados por la Comisión, para financiar proyectos (STRATFEED, SAFEED-PAP) orientados a la puesta a punto de métodos, que puedan reemplazar al método oficial (microscopía óptica, MO), para la inspección de harinas y piensos, con el objetivo de cumplir las mencionadas Directivas, en la actualidad, la MO es el único método autorizado para la realización de inspecciones oficiales. De ahí, que el borrador de nueva propuesta, solo indique que "previamente a la puesta en circulación de Proteínas de Origen Animal (PAPs), es obligado el realizar muestreos suficientes y análisis de verificación de la presencia de proteínas de rumiantes, según el método oficial recogido en el Anexo VI de la Directiva (EC) No 152/2009, esto es, el protocolo puesto a punto por el proyecto STRATFEED. Sin embargo y como veremos en mayor detalle, en el Capítulo 1 de esta Tesis, la MO presenta numerosas limitaciones para ser utilizada, en el control e inspección rutinaria de grandes volúmenes de PAPs. El Grupo de Investigación Zootecnia, en el seno del cual se ha realizado la presente Tesis Doctoral, a través de su participación activa en los Proyectos STRATFEED y SAFEED-PAP mencionados, ha centrado una gran parte de su actividad investigadora, en el estudio de la Espectroscopia de Infrarrojo Cercano (NIRS), sola o combinada con otras técnicas (microscopía e imagen), para complementar y / o reemplazar a la MO, en el objetivo de detección y cuantificación de la especie animal en harinas y piensos.

En este contexto se enmarca la presente tesis doctoral, la cual trata de aportar conocimiento en el uso de la combinación NIR-imagen para la inspección de PAPs. En los últimos 10 años han habido muchos avances en el desarrollo de nuevas tecnologías

que combinan el uso de la imagen y la espectroscopia, tanto utilizando sensores con un número limitado de bandas (multiespectrales) como utilizando cientos de bandas (hiperspectrales). Estos últimos, combinan las ventajas del análisis clásico de imagen (RGB) y de la espectroscopía para la obtención de información tanto espacial como espectral de una muestra u objeto. Esta tecnología fue desarrollada en un primer momento para aplicaciones militares y en el campo de la teledetección [8, 9].

La investigación de los sensores de imagen hiperspectral (SIH) para la inspección de calidad y seguridad de alimentos, no se inicia hasta hace poco más de 10 años. El desarrollo de conocimiento científico en este terreno ha estado limitado por numerosos factores, tales como el limitado rango de las cámaras para cubrir todo el rango espectral NIR (780-2500 nm), los niveles de ruido elevados, la necesidad de uso de ordenadores de gran capacidad de computación, el desarrollo de algoritmos matemáticos, la ausencia de conocimientos, el elevado precio, etc. La universidad de Córdoba adquirió hace 5 años, la primera cámara que apareció en el mercado para lo que se ha denominado *NIR Chemical Imaging* (NIR-CI), es la denominada Matrix que realiza medidas en el rango de los 900 a 1700 nm. Se trata de un sistema hiperespectral de altas prestaciones. Su uso está limitado a aplicaciones de laboratorio, debido a su no portabilidad y alto coste. La espectroscopia NIR-CI tiene la capacidad de obtener información cuantitativa junto con información espacial, combinando las ventajas de los SIH y NIRS [10, 11].

La tecnología NIR-CI requiere una alta velocidad de hardware para la adquisición y recopilación rápida de una enorme cantidad de datos. Como consecuencia, la tecnología NIR-CI fue, en un principio, utilizada exclusivamente como herramienta para la identificación de longitudes de onda claves para la aplicación en tiempo real de análisis multiespectrales (MSI) [12].

En los últimos años, sin embargo, se ha asistido a un incremento en el interés hacia esta tecnología por parte de investigadores de todo el mundo. Esta ha evolucionado rápidamente con equipos cada vez más rápidos y ha entrado en una nueva etapa de aplicaciones industriales para la inspección en tiempo real de productos agrícolas. Durante la última década, se ha asistido a un incremento significativo en el número de artículos de revistas y documentos procedentes de conferencias.

La investigación actual puede clasificarse atendiendo a dos líneas diferentes de trabajo: por un lado, un grupo se centra en la evaluación de la calidad y la clasificación de productos agroalimentarios y, por otro, un segundo grupo está encaminado hacia la inspección en la seguridad de los alimentos. De esta manera, algunos de los estudios se centran en el desarrollo de algoritmos, mientras que otros tratan sobre hardware y software para la aplicación efectiva del NIR-CI. En este marco se ha planteado la presente tesis doctoral cuyos objetivos se enumeran en el siguiente capítulo.

Esta memoria incluye una revisión del estado actual de las normativas que regulan el uso de harinas animales y de las principales aplicaciones de la tecnología NIR-CI en el campo agroalimentario. Sigue una breve descripción de las actuales herramientas disponibles para la detección de la especie animal en harinas animales, con la enumeración de ventajas y desventajas de cada método analítico en relación con el objetivo de la UE de minimizar la incidencia de animales afectados por BSE.

La segunda parte de la memoria se compone de seis estudios desarrollados a lo largo del periodo de investigación de la doctoranda, basado en el uso de la tecnología NIR-CI en harinas animales.

En el capítulo 2 se describe el estudio de distintos parámetros para la optimización del protocolo de análisis NIR-CI de muestras pulverulentas como son las harinas animales.

El Capítulo 3 es la continuación del anterior, centrándose en un aspecto específico de la optimización como es la repetibilidad espectral. En esta parte del documento se analizan las fuentes de variabilidad y las relaciones que hay entre una muestra y su imagen hiperespectral.

Se centra el capítulo 4 en la selección de información relevante a partir de una imagen hiperespectral abordando el problema del exceso de volumen de datos propio de la tecnología NIR-CI.

El siguiente capítulo (nº 5) introduce el análisis cualitativo de los datos para la detección de posibles contaminaciones o fraudes en harinas animales. A fin de conseguir este

propósito se comparan diferentes herramientas quimiométricas entre las más actuales y relevantes encontradas en la bibliografía.

En cuanto al capítulo 6, en este se plantea la viabilidad del uso de la tecnología NIR-CI para cuantificar partículas procedentes de distintas especies animales en una harina mezcla.

El capítulo séptimo, finalmente, muestra los resultados de un estudio comparativo entre la tecnología NIRS y la NIR-CI.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Johnson, D. E. Ferrell C. L., Jenkins T. G. (2003). The history of energetic efficiency research: Where have we been and where are we going? *J Anim Sci*.
- [2] Kellner, O. (1909). *The Scientific Feeding of Animals*. McMillan Company, New York.
- [3] Cooke, B.C. (1998). A brief history on the use of meat products, especially meat and bone meal in the feeds for ruminant animals. *The BSE Inquiry / Statement No 27*.
- [4] Decisión 94/381/CE derogada por el Reglamento (CE) nº 1326/2001.
- [5] Reglamento (CE) nº 999/2001 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de mayo 2001, por el que se establecen disposiciones para la prevención, el control y la erradicación de determinadas encefalopatías espongiforme transmisibles. *Diario Oficial No L 147 de 31.05.2001*, pp. 0001 – 0040.
- [6] Reglamento (CE) nº 1774/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo de 3 de octubre de 2002 por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales no destinados al consumo humano. *Diario Oficial No L273 de 10.10.2002*, pp. 0001 – 0095.
- [7] Draft COMMISSION REGULATION of amending Annex IV to Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council as regards prohibitions concerning animal feeding of processed animal proteins derived from non-ruminant animals (2011).
<http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/committee/acaf1107a3.pdf>. Visitado el 30 de junio de 2011
- [8] Camps-Valls, G., Bruzzone, L. (2005). Kernel-based methods for hyperspectral image classification. *IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing*, 43 (6), 1351-1362.
- [9] Cochrane, M.A. (2000). Using vegetation reflectance variability for species level classification of hyperspectral data. *International Journal of Remote Sensing*, 21 (10), 2075-2087.
- [10] Baeten V. & Dardenne P. (2005). Applications of near infrared imaging for monitoring agricultural food and feed products. In: Bhargava R. & Levin I.W.,

- eds. Spectrochemical analysis using infrared multichannel detectors. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 283-302.
- [11] Baeten V., Fernández Pierna J.A. & Dardenne P. (2007). Hyperspectral imaging techniques: an attractive solution for the analysis of biological and agricultural materials. In: Grahn H.F. & Geladi P., eds. Techniques and applications of hyperspectral image analysis. Chichester, UK: Wiley, 289-312.
- [12] Park, B., Lawrence, K.C., Windham, W.R., Smith, D.P. (2004). Multispectral imaging system for fecal and ingesta detection on poultry carcasses. Journal of Food Process Engineering Volume 27, Issue 5, 311-327.

OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis es el desarrollo y la evaluación de una metodología de control analítico basada en la combinación de la tecnología NIRS con el análisis de imagen hiperspectral, a partir de ahora llamada NIR-CI, para la identificación de diferentes especies en harina proteicas de origen animal y la discriminación de rumiantes frente no rumiantes.

En concreto, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

1. Diseñar y evaluar un protocolo para la creación y el almacenamiento de una base de datos formada por imágenes de harinas puras y mezclas.
2. Establecer una metodología de reducción y compresión de datos para optimizar el tiempo de computación sin perder información hiperespectral relevante relativa a las harinas de las distintas especies animales.
3. Sistematizar un sistema de selección de píxeles útiles y representativos para la creación de bibliotecas espectrales utilizables en estudios futuros, a través de estrategias para la detección rápida de datos anómalos en la λ espectral y superficial.
4. Explorar diferentes algoritmos matemáticos y estadísticos para el desarrollo de modelos multivariantes capaces de discriminar harinas de distintas especies animales con el menor error posible.
5. Investigar el potencial de la tecnología NIR-CI para cuantificar el porcentaje de una determinada harina en una mezcla.
6. Evaluar la capacidad discriminatoria de la tecnología NIR-CI y comprobar su aptitud comparándola con otros métodos basados en la espectroscopia NIR clásica.

7. Comparar la capacidad de la tecnología NIRS y NIR-CI para detección y cuantificación de la especie en harinas de origen animal.

CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. LOS SUBPRODUCTOS DE ORIGEN ANIMAL Y LA ENCEFALOPATÍA ESPONGIFORME BOVINA

Durante el procesamiento de la carne en un matadero, el 33 - 43% del peso de un animal es descartado como desecho incomible [1]. El material descartado está sometido a un proceso de reciclado que da como resultado muchos productos útiles, como son las harinas de carne y de huesos, carne de aves, pluma hidrolizada, sangre, pescado y grasas animales. El uso más importante y valioso de estos SPOAs es como ingrediente en alimentos para ganado, aves, acuicultura y animales de compañía. Asimismo, la industria de reciclado (denominada también *render*) se ocupa de transformar el material en productos que puedan ser utilizados para cosmética, en la empresa farmacéutica, como fertilizantes, etc. [2]. Solamente en EE.UU., en la actualidad, se producen, sacrifican y procesan aproximadamente 100 millones de cerdos, 35 millones de cabezas de ganado y ocho mil millones de pollos al año. Entre los subproductos generados, se incluyen los cueros, pieles, pelo, plumas, pezuñas, cuernos, patas, cabezas, huesos, uñas, sangre, órganos, glándulas, intestinos, tejido muscular y adiposo, cascarones y canales completas.

Los productos fabricados a partir de materias primas incomedibles (no aptas para el consumo humano) contribuyen de manera importante al crecimiento económico de las industrias relacionadas y de la sociedad. Además, el proceso de reciclado y la utilización de estos subproductos ayudan a mejorar la calidad ambiental, la salud animal y humana. Las plantas de reciclaje de subproductos de origen animal procesan alrededor de 16 millones de toneladas en la UE. Por otro lado, Argentina, Brasil, Australia y Nueva Zelanda producen otros 10 millones de toneladas. Por lo que el valor total de los subproductos a nivel mundial se estima entre 6 y 8 billones de dólares por año [3].

Algunas tendencias modernas, como los productos cárnicos preempacados listos para servir, aumentan la cantidad de materia prima para el proceso de reciclado. Las materias

primas varían, pero una aproximación general de contenido sería del 60% de agua, 20% de proteína y minerales y 20% de grasa antes del proceso de reciclado. Estos materiales orgánicos son altamente perecederos y cargados de microorganismos, muchos de los cuales son patógenos tanto para el ser humano como para los animales. El proceso de reciclado ofrece un sistema seguro e integral de manejo y procesamiento de materia prima animal que cumple con todos los requisitos básicos de calidad ambiental y control de enfermedades [4]. El reciclaje de subproductos de origen animal (conocido como *rendering*) es un proceso de transformación física y química que utiliza una gran variedad de equipo y procesos. La palabra *rendering* en inglés significa el reciclaje de tejidos crudos provenientes de animales destinados al consumo humano, así como de grasas y aceites residuales de cocinar de todos los tipos de restaurantes para producir una gran variedad de productos con valor agregado. Durante el proceso de reciclaje se aplican calor, tecnología de separación y filtrado al material para destruir la población microbiana, eliminar la humedad, extraer la grasa de la proteína y eliminar la humedad y el material proteínico de la grasa. Los métodos para lograr esto se ilustran esquemáticamente en la Figura 1.

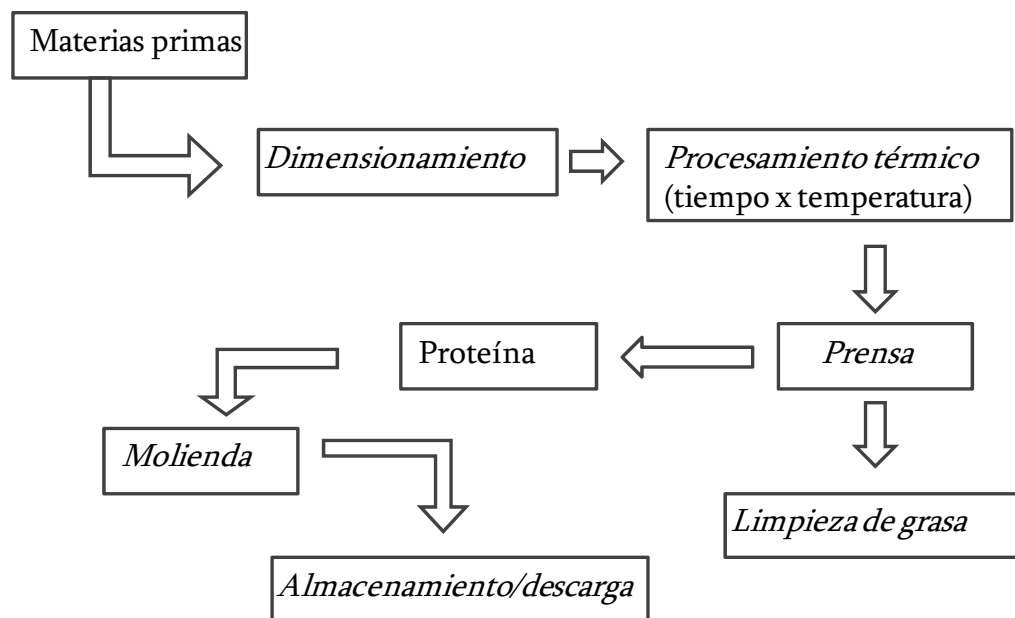


Figura 1. Proceso básico de producción del reciclaje de subproductos de origen animal. Adaptado de [5].

El proceso de reciclado convierte el tejido animal crudo en diversos productos de proteína, grasa y minerales: harinas ricas de tipo granular y grasas líquidas con componentes nutricionales específicos [6].

Las proteínas se encuentran en concentraciones más altas en los órganos y tejidos musculares; varían desde los tipos muy insolubles en las plumas, pelo, lana y pezuñas a las altamente solubles como las que se encuentran en el suero o plasma.

Los alimentos derivados de los animales son fuentes importantes de proteína y otros nutrientes en las dietas del ser humano. De la misma forma, los tejidos de la producción y procesamiento animal que no se utilizan en los alimentos para consumo humano se procesan en una selección de harinas de proteínas que se usan en alimentos para animales.

La AAFCO (Asociación de Agentes Estadounidenses de Control de Alimentos Balanceados) define la composición de todos los ingredientes para alimentos que legalmente se usan, entre los que se incluyen los productos reciclados de origen animal. El Manual de Materias Primas de la AAFCO de 2006 [7] hace referencia a 125 subproductos animales individuales que anualmente se actualizan. Los principales subproductos de proteína animal son la harina de carne y huesos (MBM), harina de carne, harina de sangre, harina de subproductos avícolas, harina avícola, harina de plumas y HP. La AAFCO define la harina MBM como un producto reciclado de tejidos de mamíferos, que incluye hueso pero no sangre, pelo, pezuñas, cuernos, recortes de pieles, heces y el contenido del estómago y rumen. Los MBM, como la define la AAFCO, deben contener un mínimo del cuatro por ciento de fósforo con un nivel de calcio que no exceda 2.2 veces el nivel real de fósforo. Los ingredientes de contenido de fósforo más bajo deben etiquetarse como harina de carne. Además de la anterior descripción de la AAFCO, la harina MBM no debe contener más del 12% de residuos y del 9% de proteína cruda indigestibles La pepsina es una enzima proteolítica que se secreta en el estómago donde hidroliza proteínas para dar polipéptidos y oligopéptidos. Si una proteína no puede ser digerida por la pepsina, los animales no podrán digerirla. Los MBM pueden ser utilizados en todas las especies de ganado, aves y alimento acuícola, pero solamente

deben usarse materiales de fuentes no rumiantes en alimentos para rumiantes (de acuerdo con la reglamentación de la FDA).

La harina de subproductos avícolas (HSA) se constituye de partes limpias, molidas y recicladas de canales de las aves sacrificadas como los pescuezos, patas, huevos no desarrollados e intestinos, pero no de plumas, excepto en las cantidades en las que inevitablemente ocurra en las buenas prácticas de procesamiento. La etiqueta debe incluir las garantías para un mínimo de proteína cruda, un mínimo de fibra cruda, un mínimo de fósforo y un mínimo y un máximo de calcio. El nivel de calcio no debe exceder el nivel real de fósforo en más de 2.2 veces. La calidad de la HSA, que incluye a aminoácidos críticos, ácidos grasos esenciales, vitaminas y minerales, junto con su palatabilidad, ha llevado a una mayor demanda para uso en alimento para mascotas y para la acuicultura.

En cuanto a la HP, generalmente se considera parte de la clase de ingredientes de proteína animal, aunque se describe en la sección de productos marinos de la AAFCO. La HP es el tejido limpio, molido y seco de pescado completo no descompuesto o cortes de pescado con o sin la extracción de la parte del aceite. No debe contener más de 10 por ciento de humedad. Si contiene más del 3% de sal, la cantidad de sal debe formar parte de la marca, a condición de que en ningún caso exceda el siete por ciento. La *Ethmidium Maculatum* y la *Engraulis Ringens* son las principales especies de pescado usadas para la fabricación de la harina, junto con cantidades menores de la especie *Clupea*. Con el incremento en la acuicultura dirigida a la industria de alimentos para consumo humano, se han estado utilizando más los subproductos de estas plantas de procesamiento. Por lo general, la HP es una excelente fuente de aminoácidos esenciales y de vitaminas liposolubles. La digestibilidad de sus aminoácidos es excelente pero, como ocurre con otros ingredientes, están altamente correlacionados al procesamiento. Las harinas de pescado pueden usarse en todo tipo de alimentos para animales. En algunos productos, tales como los alimentos de animales de compañía, los factores de palatabilidad así como el olor y sabor a pescado son benéficos. Cuando se usa para otras especies los sabores y olores fuertes a pescado en los huevos, leche o carne pueden llegar a representar una desventaja.

Los principales ingredientes de las Proteínas Animales Procesadas (PAPs) son materias primas importantes para las dietas de ganado, aves, acuicultura y para animales de compañía en todo el mundo. En la Tabla 1 se encuentra la composición de nutrientes típica de las cuatro proteínas animales más comunes.

Tabla 1. Composición de nutrientes de proteínas animales (National Research Council, 1994).

Variable	MBM	Harina de sangre	Harina de pluma	HSA
Proteína cruda, %	50.40	88.90	81.00	60.00
Grasa, %	10.00	1.00	7.00	13.00
Calcio, %	10.30	0.40	0.30	3.00
Fósforo, %	5.10	0.30	0.50	1.70
EMVN, kcal/kg	2.67	3.63	3.28	3.12
Aminoácidos				
Metionina, %	0.70	0.60	0.60	1.00
Cistina, %	0.70	0.50	4.30	1.00
Lisina, %	2.60	7.10	2.30	3.10
Treonina, %	1.70	3.20	3.80	2.20
Isoleucina, %	1.50	1.00	3.90	2.20
Valina, %	2.40	7.30	5.90	2.90
Triptófano, %	0.30	1.30	0.60	0.40
Arginina, %	3.30	3.60	5.60	3.90
Histidina, %	1.00	3.50	0.90	1.10
Leucina, %	3.30	10.50	6.90	4.00
Fenilalanina, %	1.80	5.70	3.90	2.30
Tirosina, %	1.20	2.10	2.50	1.70
Glicina, %	6.70	4.60	6.10	6.20
Serina, %	2.20	4.30	8.50	2.70

EMVN = energía metabolizable verdadera corregida por nitrógeno.

Todos los ingredientes indicados en la Tabla 1 son más altos en proteína que la harina de soja y otras proteínas vegetales. Además, la HCH es más alta en fósforo, energía, hierro y zinc que la harina de soja. El nivel de fósforo en la harina de carne y huesos (MBM) es

siete veces mayor que el que se encuentra en la harina de soya, además de que se encuentra en una forma que es altamente disponible para el ganado y las aves.

La preocupación acerca de la BSE ha sido una de las cuestiones más serias que ha afectado el uso de los productos reciclados de origen animal en los últimos diez años.

Como una de las industrias más legisladas antes y después del advenimiento de la BSE y, después de observar la debacle europea, la industria ha sobrevivido continuando con el trabajo intenso con todas las agencias legislativas.

La BSE es una enfermedad neurológica mortal del ganado vacuno que fue reconocida por primera vez en Gran Bretaña en 1986. Los signos clínicos, la propagación y la transmisión de esta enfermedad indican que se debe a un agente transmisible poco común denominado prión, para expresar que se trata de una proteína infecciosa. El agente causante es similar al que provoca el prurigo lumbar (o scrapie) en el ganado ovino y caprino [8]. La BSE está inscrita en la lista del Código Sanitario para los Animales Terrestres en 2009, en la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (capítulo 1. 2; artículo 1.2.3) y debe ser declarada a la OIE (capítulo 1.1– Notificación de enfermedades y datos epidemiológicos). La OIE ha establecido para esta enfermedad el reconocimiento oficial del estatus sanitario de los países y zonas.

Desde el momento en el que se diagnosticó la BSE en 1986, se indicó que la MBM producida de ovejas infectadas por tembladera había sido la fuente del origen de la enfermedad. Ya que las ovejas eran reservorios conocidos del agente infeccioso (prión) parecía razonable dar por sentado que la BSE estuvo causada por la infección de tembladera de ganado a través de alimento contaminado [9].

En 1996 la Organización Mundial de la salud (WHO), la OIE y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) acordaron cinco recomendaciones para adoptar medidas contra la BSE. Las especificaciones fueron las siguientes: 1) Ninguna parte o producto de cualquier animal que ha manifestado síntomas de las encefalopatías espongiformes transmisibles (TSE) ni los tejidos que puedan ser agente de la TSE, deben entrar en la cadena alimentaria (humana y animal); 2) Todos los países deben establecer vigilancia y notificación obligatoria de casos de TSE;

3) Todos los países deberían prohibir el uso de tejidos procedentes de rumiantes en la alimentación de rumiantes; 4) La leche y el sebo son considerados como seguros; 5) La gelatina y grasa animal son considerados como seguros siempre que se utilicen procedimientos de procesamiento eficaz [10].

La primera prohibición en la UE hizo alusión al uso de proteínas animales en la alimentación de rumiantes y de piensos que las contuviesen [11]. Esta prohibición fue ampliada en la Regulación general 999/2001 [12], extendiéndola al uso de proteínas animales transformadas, de gelatina proveniente de rumiantes, de productos sanguíneos, de proteínas hidrolizadas, de fosfato dicálcico y de fosfato tricálcico de origen animal en la alimentación de animales de cría, con excepción de los carnívoros destinados al aprovechamiento de su piel.

Desde la publicación del reglamento en 2001 más de 61 millones de vacunos adultos han sido analizados en la UE de los que han sido detectados cerca de 7400 casos positivos. Las medidas de prevención y erradicación de la BSE están surtiendo efecto, ya que se ha registrado un descenso de aproximadamente un 30% al año en el número de casos, descendiendo el número de caso desde 2167 en 2001 a 320 casos en 2006, 125 en 2008 y solamente 45 en 2009 en la UE [13].

En 2002 la Comisión Europea publicó la Regulación EC/1774/2002 [14] relativa al uso de harinas animales de una especie para su uso en piensos para la misma especie. Después el Reglamento CE/1234/2003 [15] extendió la prohibición: se prohibieron nuevamente todas las proteínas animales para la alimentación de animales de granja. En 2005 otro Reglamento fue publicado en la UE (CE/1292/2005) [16], que proporcionó una ulterior prohibición para el uso de productos sanguíneos, hidrolizados de proteínas y para el procesamiento de subproductos de raíces y tubérculos. Se ha establecido recientemente en el Reglamento CE/956/2008 [17] el permiso del uso de la HP como sustitutivo de leche para animales jóvenes de especies rumiantes. La actual situación del uso de proteínas animales de acuerdo con la legislación en la UE es resumida en la Tabla 2.

Tabla 2. Legislación para el uso de proteínas animales específicas en EU.

PROTEINAS	ANIMALES VIVOS				
	Rumiante	Cerdo	Ave	Pescado	Mascotas y animales para peletería
Rumiante	PP (EC/999/2001)	TP (EC/1234/2003)	TP (EC/1234/2003)	TP (EC/1234/2003)	P
Cerdo	PP (EC/999/2001)	TP (EC/1774/2002)	TP (EC/1234/2003)	TP (EC/1234/2003)	P
Ave	TP (EC/1234/2003)	TP (EC/1234/2003)	TP (EC/1774/2002)	TP (EC/1234/2003)	P
Pescado	TP* (EC/956/2008)	P	P	PP* (EC/1774/2002)	P

TP: temporalmente prohibido, PP: permanentemente prohibido, P: prohibido.

*: Excepto como sustitutivo de leche para rumiantes jóvenes.

** : Para peces de piscifactoría.

Aunque los programas de control de procesos se dirigen hacia riesgos conocidos que se pueden eliminar o controlar a través del proceso de reciclaje, también incluyen el cumplimiento de políticas en la planta que aplican para la aceptación o rechazo de materia prima. En la Figura 2 se representa, a modo de resumen, un esquema que relaciona las especies animales y las harinas cárnicas prohibidas según la especie animal de procedencia.

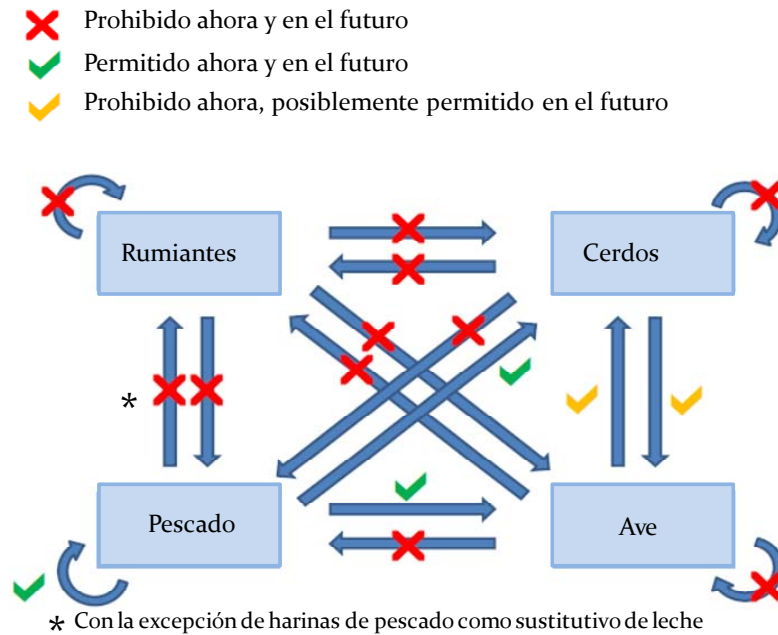


Figura 2. Representación esquemática y simplificada de las disposiciones de prohibición de piensos de animales de granja de acuerdo con la UE [18].

La aplicación generalizada de esta medida orientada a evitar el canibalismo, factor que parece incrementar el riesgo de BSE, solo será posible si existe un método analítico que permita la distinción entre harinas provenientes de diferentes especies.

1.2. ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO EN EL USO DE MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE INGREDIENTES DE ORIGEN ANIMAL EN PIENSOS Y MEZCLAS

Las medidas reglamentarias de prohibir ciertas proteínas derivadas de rumiantes en los alimentos usados en animales rumiantes, las numerosas demandas de países de exportación y las preocupaciones recientes con respecto a la enfermedad de pérdida crónica de peso en cérvidos, así como las reglamentaciones pendientes del material de riesgo especificado (SRM) han creado la necesidad de procedimientos analíticos rápidos. Aún se requiere de ensayos para detectar e identificar tejidos derivados de especies de animales específicos. Los asuntos sobre SRM crean ahora también la necesidad de identificar tejidos específicos dentro de las mismas especies. Estas capacidades no están

disponibles con la especificidad y la precisión de especies que se requieren, que sean consistentes con el costo y los resultados oportunos que se necesitan.

La legislación es continuamente revisada a la luz de nuevas evidencias científicas, de la evolución de la situación de la BSE, de técnicas de detección, etc. Numerosas directivas y decisiones comunitarias hacen referencia a normativas relativas a la circulación de materias primas y piensos. Algunas de ellas señalan la importancia de la descripción detallada de los productos utilizados en alimentación animal fijando normas para la declaración de ingredientes en mezclas. Para dar cumplimiento a las exigencias impuestas por las normativas mencionadas, el sector agroalimentario demanda el disponer de herramientas analíticas económicas, rápidas y precisas, que realmente posibiliten la trazabilidad de los ingredientes que forman parte de los piensos, particularmente los de origen animal, y que permita la detección de posibles fraudes y adulteraciones en este ámbito.

1.2.1. MÉTODO OFICIAL: MICROSCOPÍA ÓPTICA

El método de microscopia óptica (MO) se basa en el análisis de restos de tejidos para la detección de PAPs en piensos. Este incluye tanto la observación de conformaciones morfológicas de fragmentos con estéreamicroscopio como el examen de las estructuras histológicas de partículas finas con un microscopio óptico [19]. La determinación cualitativa por MO se realiza en diferentes submuestras: la materia prima y la fracción concentrada. La fracción de concentrada, también conocida como sedimentos, se obtiene a través de un proceso de sedimentación con tetracloroetileno que reúne partículas con una densidad bien definida. Materias primas y concentrados tienen que ser tamizados y las fracciones obtenidas examinadas por medios de microscopios compuesto. Las directrices para la identificación de los componentes de origen animal por MO fueron enunciadas por primera vez por la Directiva de la Comisión Europea CE/88/1998 [20] para hacer cumplir la prohibición y, más tarde, este método fue modificado por el anexo VI de Regulación de la CE / 2003/126 [21]. Recientemente, el texto de la CE / 2003/126 fue sustituido por el anexo VI del Reglamento CE/152/2009 [22].

La Figura 3 muestra el diagrama de flujo del procedimiento de análisis según la Regulación EC/152/2009 y STRATFEED (uno de los proyectos FP5 puestos en marcha para desarrollar nuevas tecnologías para la detección y cuantificación de adiciones ilegales de tejidos animales en piensos) [23].

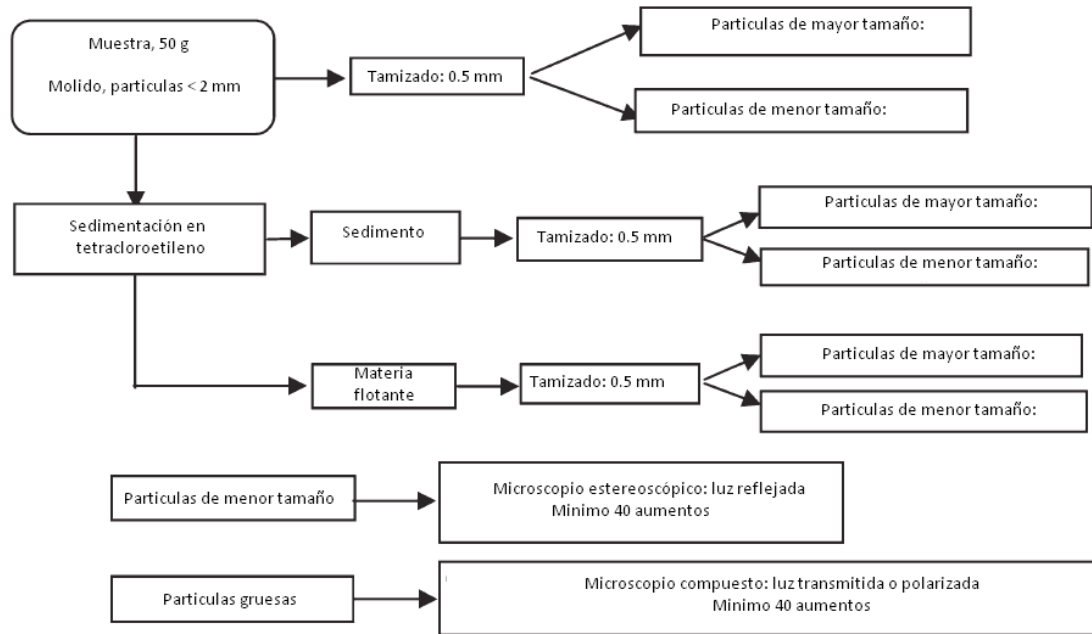


Figura 3. Esquema del proceso de análisis por MO para detección de harinas animales. Adaptado de [24].

La microscopía óptica es el único método oficial validado y aceptado de la UE para detectar la presencia de proteínas animales. Existen otros métodos que pueden ser utilizados exclusivamente como apoyo a la microscopía. El análisis microscópico puede detectar proteínas animales en forma de harinas (MBM) en niveles suficientemente bajos ($< 0.1\%$) y con una baja incidencia de falsos negativos [25]. Pruebas realizadas recientemente [26, 27] han demostrado, sin embargo, que el método requiere analistas con alta experiencia en el examen microscópico y una formación continua de los operadores. Además, la MO presenta ulteriores problemas tales como la elevada incidencia de errores intra e interlaboratorios y el alto tiempo de análisis (2 muestras/día/analista), que se incrementa de forma importante cuando se trata de detectar niveles del $0,1\%$. Otro inconveniente de esta técnica es el que no permite distinguir a nivel de clases vertebradas (mamíferos *vs.* aves) [28, 29, 30] y el elevado nivel de residuos producidos por las sustancias utilizadas como solventes en el pre-tratamiento de la muestra.

1.2.2. MÉTODOS ALTERNATIVOS

Las mencionadas limitaciones han provocado que la Comisión Europea esté financiando proyectos de I+D, cuyo objetivo es demostrar científicamente las ventajas e inconvenientes de varios métodos (técnicas de inmunoanálisis, análisis de DNA, NIRS, microscopía NIR, estudios de imágenes hiperespectrales, etc.), tanto para la detección y cuantificación de PAPs en piensos [31], como para la detección y cuantificación de la especie animal de la cual una determinada PAP procede [32, 33].

Detección de proteínas animales con análisis basadas en inmunoensayos

Las técnicas inmunoquímicas están basadas en la reacción específica entre una proteína y los anticuerpos específicos obtenidos frente a ella. Estas técnicas presentan una elevada sensibilidad y especificidad permitiendo la cuantificación de analitos incluso a niveles de trazas sin la necesidad de laboriosos procedimientos de purificación y concentración de la muestra. La elevada especificidad de los anticuerpos para unirse a los antígenos determinan que los anticuerpos se conviertan en reactivos muy útiles para la detección, purificación y cuantificación de una gran cantidad de analitos. Ansfield [34] desarrolló un método basado en la técnica ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) para detectar proteínas procesadas de rumiante y cerdo en piensos compuestos. Otro método estudiado fue el *Reveal for ruminant* proporcionado por la compañía americana Neogen Corporation (Lansing, MI, USA). Este test se basa en ensayos de flujo lateral de la proteína muscular rumiante Troponina I estable al calor. Otro test desarrollado fue el *Feedcheck*, creado por Strategic Diagnostics Inc. (SDI – Newark, DE, USA), capaz de discriminar PAP de mamíferos de PAP procedentes de otras especies. Este método utiliza tejido conectivo como muestra a diferencia del “revelador de rumiantes”, que detecta las proteínas de los músculos esqueléticos. Los dos métodos fueron sometidos a varios estudios [35, 36, 37, 38].

Como resultados del test *Reveal for ruminant*, se obtuvo una sensibilidad adecuada en muestras con niveles de PAP procedentes de rumiantes del 0.5%, pero insuficientes con niveles de 0.1%. Los resultados para la prueba *Feedcheck* indicaron una buena sensibilidad con respecto a muestras positivas (que contenían PAP). Solamente una

muestra con PAP sin tejido conectivo fue erróneamente clasificada como negativa. Analizando una muestra de mamífero, sin embargo, se encontró un alto número de falsos negativos (50%) evidenciando una falta de sensibilidad y un límite de detección por encima del 0.1%.

Métodos basados en el análisis de DNA

El proceso de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consiste en una serie de 20 a 35 cambios de temperatura repetidos llamados ciclos. Cada ciclo suele consistir en 2-3 pasos a diferentes temperaturas. La técnica PCR común se realiza con ciclos que tienen tres pasos de temperatura. Los pasos de ciclos a menudo están precedidos por un choque térmico (llamado *hold*) a alta temperatura (> 90 C), y seguido por otro *hold* al final del proceso para la extensión de producto final o el breve almacenaje. Las temperaturas usadas y el tiempo aplicado en cada ciclo dependen de gran variedad de parámetros. Estos incluyen la enzima usada para la síntesis de DNA, la concentración de iones divalentes y la temperatura de unión de los cebadores, así como la longitud del DNA que se desea amplificar [39]. La PCR convencional se emplea como base para multitud de técnicas en el laboratorio debido a su robustez y rapidez.

Recientemente se han desarrollado técnicas de PCR en tiempo real para la detección cuantitativa de harinas de carne y hueso en piensos animales [40, 41, 42, 43]. La técnica de PCR permite detectar y cuantificar la incorporación de pequeñas cantidades de DNA de pescado (0,2-25%) en mezclas experimentales incluso en aquellas sometidas a tratamientos térmicos muy intensos que pueden degradar su DNA. No obstante, los resultados obtenidos indican que el tipo de tratamiento térmico de la muestra influye en las ecuaciones de cuantificación del porcentaje de pescado.

Las técnicas basadas en análisis de DNA tienen la desventaja de ser largas, laboriosas y de requerir personal cualificado para su realización. Además precisan de una considerable inversión económica en reactivos y equipos.

Técnicas basadas en la espectroscopía NIR

Garrido-Varo y Fernández [28] mostraban, por vez primera, el potencial de la tecnología NIRS para la detección y cuantificación de MBM. Trabajos posteriores [44, 45] confirman dicho estudio mostrando la posibilidad de de detección de MBM en piensos compuestos incluso a niveles inferiores al 1 %. Asimismo, Murray et. al., [46] indica que esta tecnología permite detectar la adicción de MBM a la HP a niveles de adicción del 3% y que el error de los modelos es aproximadamente del 1%.

Estudios realizados en el marco del Proyecto STRATFEED, antes mencionado, han permitido concluir que el error de los modelos predictivos, de predicción de harina de carne en piensos molidos e intactos, se sitúa alrededor del 0,8-0,9 % [47, 48, 49, 50], lo que no resulta suficiente para cumplir con las exigencias normativas actuales, que obligan a detectar niveles del 0,1 % ya que el método oficial (MO) ha mostrado su capacidad para detección a ese nivel [30]. Sin embargo, este nivel parece ser poco realista y en el ámbito de la Comisión se está debatiendo [51] el admitir ciertas tolerancias mínimas, sobre todo, teniendo en cuenta que es prácticamente imposible eliminar ciertas contaminaciones cruzadas (excretas, plumas de pájaros, etc.) En este contexto, la tecnología *NIRS* podría ser utilizada como una técnica de *screening*, que permitiría detectar muestras sospechosas de contener MBM, las cuales podrían ser luego confirmadas por métodos específicos. Con respecto a la detección de la especie animal, la Comisión considera que no podrá levantar la prohibición, hasta que cada una de las especies pueda ser identificada, sin embargo la MO no permite la detección de la especie [52, 53, 54].

Pérez Marín et al. [55] han mostrado que la tecnología NIRS permite predecir el porcentaje de ingredientes de origen animal (ave, porcino, rumiante, pescado, suero y grasa) en piensos intactos, y que los modelos predictivos pueden ser transferidos a un segundo equipo, sin pérdida significativa de la capacidad predictiva de las ecuaciones transferidas. Sin embargo, al igual que con el ingrediente MBM, los errores predictivos no parecen ser lo suficientemente bajos como para que la tecnología NIRS pueda ser utilizada como método oficial de detección de la especie a niveles del 0,1 %.

En el terreno de la detección de la especie en una determinada mezcla de PAPs diversos trabajos realizados en la UCO [56, 57] han mostrado que la tecnología NIRS permite no solo identificar la especie o especies de la cual una determinada PAP procede, sino, asimismo, detectar el porcentaje que existe de cada especie en la mezcla. Al igual que en piensos, los errores no son los suficientemente bajos para identificar niveles de trazas de contaminación de una especie por otra.

A pesar de ello, entre las conclusiones del proyecto STRATFEED se encuentra que la tecnología NIRS podría actuar como técnica de exploración, con un enorme potencial de muestreo (cientos de muestras al día). Una vez que una muestra sea detectada como sospechosa, de acuerdo a los niveles de incertidumbre de los modelos predictivos, dicha muestra sería sometida a un análisis confirmatorio por otros métodos y, entre estos, ocupan un lugar relevante la combinación microscopía NIRS (NIRM) y el análisis NIR-CI como métodos no subjetivos y que podrían reemplazar a la MO clásica. [58].

La tecnología NIRM permite recopilar información espectral de partículas microscópicas y comparar los resultados inequívocamente con librerías espectrales que constan de modelos con composición conocida [59]. NIRM es una técnica objetiva, rápida, sensible y altamente selectiva para el control del MBM en piensos compuestos. Esta se basa en los datos espectrales de cientos de partículas contenidas en piensos. En este caso el espectrofotómetro se acopla a un microscopio, cuyo sistema óptico está diseñado para focalizar suficientemente las partículas y aumentar la eficiencia de la transmisión de la radiación; los espectros pueden ser recogidos a partir de partículas muy pequeñas ($\leq 50 \mu\text{m}$). Las partículas presentes en el pienso pueden ser identificadas comparándolas con librerías espectrales de referencia desarrollando previamente un análisis discriminante con una apropiada herramienta quimiométrica.

Varios estudios [30, 59, 60, 61, 62] han demostrado que la tecnología NIRM es capaz de detectar harinas animales en piensos. Sin embargo, el tiempo de análisis es muy elevado (entre 2-5 horas por muestra dependiendo del número de partículas por muestra) en relación a la tecnología NIRS sola (1-2 minutos).

La tecnología NIRM puede ser considerada como una técnica de imagen de las denominadas de “un solo punto”, es decir, en la que solo se obtiene un espectro por muestra, siendo necesario el desplazamiento de la muestra en un plano para obtener información sobre la distribución espacial de los constituyentes de una determinada muestra. Por tanto, una ventaja de NIR-CI frente a NIRM es que la primera recoge simultáneamente espectros de una superficie a una mayor velocidad (2 minutos/muestra). Por tal razón, en el caso de inspecciones y controles de contaminaciones, la tecnología NIR-CI podría ser más útil [63].

La tecnología NIR-CI fue desarrollada originalmente para aplicaciones de sensores remotos [64], extendiéndose más tarde al campo de la astronomía [65], de la agricultura [66, 67], de la farmacia [68, 69, 70] y de la medicina [71, 72, 73]. Una revisión extensa de las aplicaciones del NIR-CI en la industria agroalimentaria se encuentra en el apartado 1.6 de este Capítulo.

En el caso de piensos animales hay que destacar que la información NIR-CI es muy limitada. Baeten y Dardenne [74], y Fernández Pierna et al. [75] mostraron el potencial de detección de harinas de carne en piensos con un límite de detección de 1g/kg. Sin embargo, solo existe un trabajo publicado que haga referencia a la discriminación entre especies animales [76] en muestras no sedimentadas.

1.3. ANÁLISIS NIRS

1.3.1. FUNDAMENTOS DE LA RADIACIÓN NIR

La radiación electromagnética es una forma de energía que presenta características de corpúsculo y onda. Su origen se encuentra en el movimiento de las partículas con carga eléctrica. Consiste en unos campos eléctricos y magnéticos oscilantes, perpendiculares entre sí y que se propagan en dirección perpendicular a sí mismos con velocidad constante. La radiación electromagnética puede estar polarizada, de modo que el campo eléctrico y el magnético oscilan en un plano definido. Habitualmente la radiación no se encuentra polarizada, así que en ella existen campos oscilando perpendicularmente a su

dirección de propagación en todos los planos posibles. La Figura 4 reproduce el esquema de la radiación electromagnética polarizada en el plano.

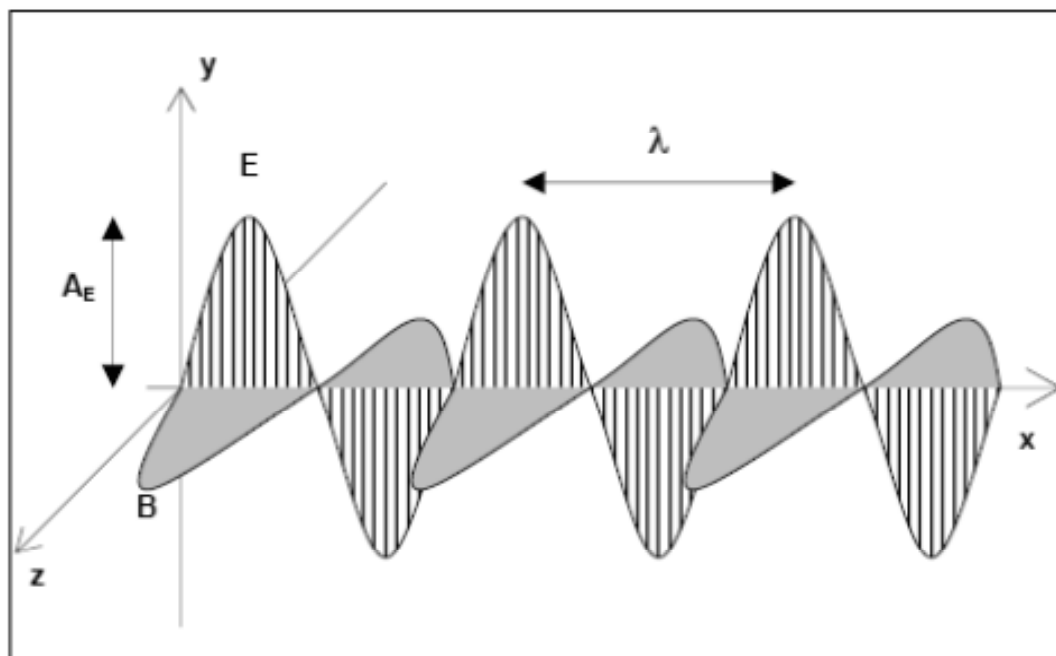


Figura 4. Representación de la radiación electromagnética polarizada. E = campo eléctrico y B = campo magnético. λ = longitud de onda, A_E = amplitud para el componente eléctrico de la radiación.

Entre las propiedades inherentes a la radiación electromagnética, las más utilizadas para su clasificación en espectroscopia son la longitud de onda λ y sus magnitudes relacionadas frecuencia ν y número de onda $\bar{\nu}$.

La energía total de una molécula se define como suma de las energías de los distintos niveles energéticos posibles:

$$E_{\text{total}} = E_{\text{electrónica}} + E_{\text{vibracional}} + E_{\text{rotacional}} + E_{\text{traslacional}}$$

Estos términos energéticos se corresponden con transiciones de niveles de energía en los que están implicados electrones, vibraciones, rotaciones y traslaciones de la molécula. Una molécula absorbe radiación infrarroja cuando experimenta un cambio neto en el momento dipolar como consecuencia de su movimiento de vibración o de rotación. Si esto ocurre, el campo eléctrico asociado a la radiación puede interactuar con el campo eléctrico originado por la fluctuación del momento dipolar de la molécula. Si la

frecuencia de la radiación iguala exactamente a la frecuencia de vibración natural de la molécula, ocurre una transferencia neta de energía que da lugar a un cambio en la amplitud de la vibración molecular y, como consecuencia, se absorbe la radiación [77].

En el rango del infrarrojo cercano (780 – 2500 nm) se producen sobretonos y combinaciones de las bandas fundamentales del infrarrojo medio [78, 79]. Las transiciones no fundamentales son menos probables que las transiciones entre niveles consecutivos. Por esta razón, las bandas NIR son de menor intensidad que las que aparecen en la región del infrarrojo medio. Además, son bandas más anchas y no están bien definidas debido al solapamiento de los sobretonos y bandas de combinación [80]. Las bandas más frecuentes en la región del NIR son debidas a enlaces que contienen átomos con elevadas diferencias en el peso molecular (por ejemplo C-H, O-H, N-H,..), lo que provoca un aumento en la anarmonicidad del enlace. En la Figura 5 se muestra la región NIR utilizada en este trabajo (900-1700 nm) donde absorben los diferentes enlaces. Las bandas de los grupos C=O, C-C, C-F o C-Cl, en general son muy débiles o no aparecen en la región NIR. Las vibraciones fundamentales de estos grupos tienen bajas frecuencias en la región IR y por tanto, los primeros sobretonos también aparecen en esa región [81].

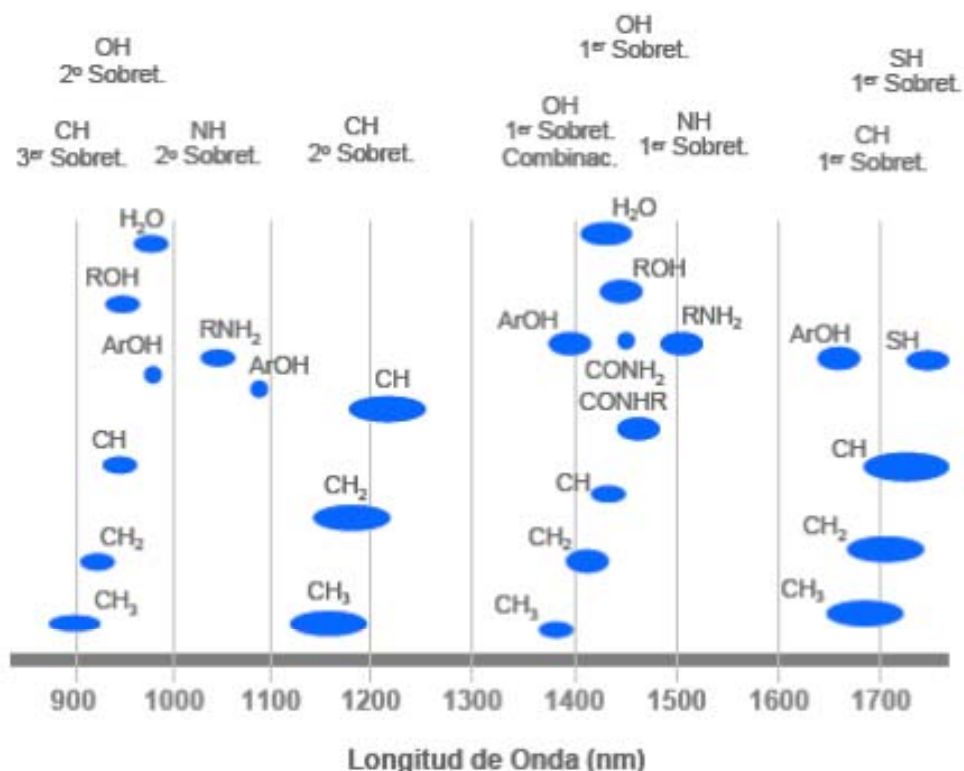


Figura 5. Representación gráfica de las zonas del espectro NIR donde se manifiestan los principales grupos funcionales. Imagen extraída de [82].

En el NIR las bandas de absorción no están tan bien definidas como en el infrarrojo medio, apareciendo en forma de bandas anchas y solapadas entre sí, por lo que es más difícil realizar una asignación a un componente o grupo funcional concreto de la muestra. Las bandas tienen una menor intensidad (la absorción de la muestra es menor, por lo que se debe trabajar con caminos ópticos más largos, de 0.5 a 10 mm, frente a los 10-50 μm utilizados en el infrarrojo medio).

1.3.2. TIPOS DE MEDIDAS EN LA REGIÓN NIR E INSTRUMENTACIÓN

Cuando la radiación incide en la muestra (Figura 6) esta puede sufrir diferentes fenómenos: absorción, transmisión y reflexión. La intensidad de la luz transmitida a través de la muestra (P_T) es menor que la intensidad incidente (P_0). Una parte de esta intensidad incidente se ha reflejado (P_R), mientras que otra parte ha sido absorbida por la sustancia (P_A).

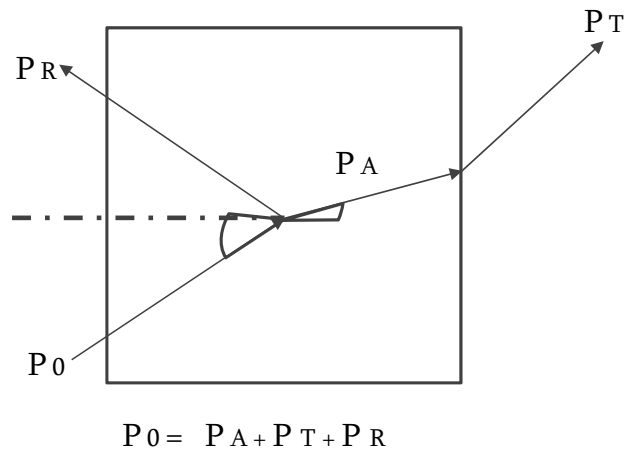


Figura 6. Absorción (P_A), transmisión (P_T) y reflexión (P_R) de la radiación electromagnética al interactuar con la materia.

Reflectancia

La espectroscopia de reflectancia estudia la radiación reflejada por una muestra que ha estado irradiada. Consta de dos componentes: La difusa y la especular. La componente especular aporta poca o nula información acerca de la composición de la muestra. El detector se coloca en un ángulo determinado frente a la muestra de manera que se minimizan las radiaciones especulares. La componente difusa se genera en todas las direcciones y predomina cuando la superficie irradiada es débilmente absorbente a la longitud de onda incidente *i* la penetración de la radiación es mayor en relación a la longitud de onda. La señal analítica medida se expresa como absorbancia aparente:

$$A_{ap} = \log \frac{1}{R} = ac$$

Siendo R la reflectancia relativa ($R = R_{\text{muestra}} / R_{\text{estándar}}$), a una constante de proporcionalidad y c la concentración.

Transmisión

La absorción de la radiación NIR sigue la ley de Lambert-Beer por lo que las medidas por transmisión pueden ser utilizadas con finalidad cuantitativa. La absorbancia puede ser definida:

$$A_{ap} = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon bc$$

Siendo T la transmisión, I_0 la intensidad de radiación incidente, I la intensidad de la radiación transmitida, ϵ la absortividad molar, b el camino óptico y c la concentración. Hay que remarcar que, de manera análoga a las regiones del visible y el MIR, se pueden producir desviaciones del comportamiento de la ley debido a cambio en los enlaces por puentes de hidrógeno, formación de complejos u otros procesos químicos.

Transflectancia

La muestra, generalmente líquida o semi-líquida, se coloca en una cubeta junto con una superficie reflectante por una de las caras. El haz de radiación incidente entra por la cara transparente de la cubeta, atraviesa la muestra y se refleja en la otra cara de la cubeta. Así retorna de nuevo atravesando la muestra y la radiación es captada por el detector.

A pesar de las distintas clasificaciones del tipo de medida NIRS, todos los instrumentos tienen elementos comunes:

Fuente de luz: es la fuente de emisión de la radiación infrarroja. Generalmente es halógena o de tungsteno.

Red de difracción: se compone de una lente holográfica cóncava. La lente puede ser móvil o estacionaria. Es móvil para sistemas de filtros y para el monocromador de rastreo, y estacionaria para el filtro optoacústico (AOTF) y la matriz de diodos.

Filtros: son elementos que eliminan la llegada de longitudes de onda procedentes de fenómenos de difracción no deseadas al detector. Estos filtros van sincronizados con el movimiento de la red de difracción.

Porta muestras: en ello se colocan las celdas o cubetas que integran la muestra correspondiente. Existen variedad de módulos para diferentes tipos de análisis (reflectancia, transmitancia y transflectancia).

Detector: es el sensor que detecta la radiación NIR. Uno de los más utilizados es el de sulfuro de plomo (PbS), debido a las buenas prestaciones tanto de sensibilidad como de rango (900 – 3300 nm). Entre otros detectores empleados está el de silicio para longitudes incluidas entre 400 y 1100 nm, y el detector InGaAs (compuesto por Indium Arsenide), para longitudes de 900 – 1700 nm.

1.4. DE LA ESPECTROSCOPÍA CLÁSICA AL ANÁLISIS DE IMAGEN

En espectroscopia clásica (NIRS) un espectro refleja la información integrada de la superficie de la muestra. Por lo tanto, el analista adquiere sólo una parte de información acerca de la muestra. Desde el final del siglo XX los avances técnicos han permitido el desarrollo de nuevos métodos para adquirir simultáneamente información espectral y espacial. El conjunto de estos métodos se refieren a la que se define "imagen química" (Chemical Imaging, CI). En ella los espectros están localizados espacialmente, así que es posible identificar las especies químicas en las muestras y, además, conocer su distribución espacial.

La tecnología NIR-CI integra el análisis de imagen con la información espectral proporcionada por cada píxel de una imagen en el rango del infrarrojo cercano.

Las principales diferencias entre NIR-CI, análisis de imagen convencional (RGB Imaging), NIRS y análisis multiespectral (análisis de imagen con menos de 10 bandas, MSI) están descritas en la Tabla 3.

Tabla 3. Comparación entre análisis de imagen RGB, NIRS, análisis multiespectral (MSI) y NIR-CI

CARACTERÍSTICAS	RGB imaging	NIRS	MSI	NIR-CI
Información espacial	sí	no	si	si
Información espectral	no	sí	baja	si
Información multicomponentes	baja	si	baja	si
Sensibilidad a componentes minoritarios	no	no	baja	si

La estructura de una imagen hiperespectral, además de proporcionar información espacial, aporta información espectral en un amplio rango y por cada píxel de la imagen, ya que las imágenes hiperespectrales están formadas por un elevado número (hasta centenares) de bandas por cada posición espacial de una muestra analizada. Cada píxel de una imagen contiene el espectro correspondiente a su posición específica. Este espectro tiene la función de “huella dactilar”, que puede ser utilizada para caracterizar la composición de un píxel específico.

1.4.1. TERMINOLOGÍA EN NIR-CI

Cuando nos referimos a sistemas de análisis de imagen hiperespectral, existen algunas importantes definiciones útiles para entender el funcionamiento de los instrumentos [83]. En este apartado se enumeran algunos términos normalmente utilizados en NIR-CI.

Rango espectral

El rango espectral describe la región espectral cubierta por el instrumento. Los instrumentos más utilizados trabajan en el visible (380- 800 nm) o en la primera parte del NIR (400-1000 nm). Hoy en día los instrumentos que trabajan en el rango 900-1700 nm proporcionan la precisión requerida en la mayoría de las aplicaciones en análisis de productos agroindustriales.

Resolución espectral

La resolución espectral de los sistemas hiperespectrales está relacionada con su espectrógrafo. La resolución espectral se define como el límite absoluto de la capacidad de un sistema hiperespectral de separar dos rasgos monocromáticos espectrales adyacentes emitidos por un punto en la imagen. En otras palabras, define el tamaño y número de intervalos de longitud de onda específica del espectro que puede ser detectado por un sensor.

Resolución espacial

La resolución espacial determina el tamaño del objeto más pequeño que puede ser detectado por el sensor en la superficie de la muestra y separado de su entorno. Asimismo, determina la capacidad de un sistema para inspeccionar detalles de los objetos estudiados, es decir, la resolución espacial se define como el área representada por una imagen de un píxel. Por cuestiones prácticas normalmente se utiliza la resolución espacial en vez del número de píxeles de una imagen. El parámetro más comúnmente utilizado para describir la resolución espacial es el *campo de vista* (FOV). La resolución espacial se refiere al número de píxeles por unidad longitud.

Número de bandas

El número de bandas es uno de los principales parámetros que caracterizan los sistemas de imágenes hiperespectrales. En función del tipo de instrumento (multiespectral o hiperespectral), varía el número de bandas espectrales desde unos pocos (generalmente menos de 10) en imágenes multiespectrales hasta cerca de 100– 250 bandas espectrales en el espectro electromagnético en el caso de imágenes hiperespectrales.

Ancho de banda

El ancho de banda es un parámetro que se define como intervalo de frecuencias (FWHM) para el que la ganancia es superior o igual a la mitad de la ganancia máxima.

Relación señal/ruido

La relación señal/ruido (S/R) se establece entre la señal recibida y el ruido procedente de los componentes electrónicos del detector y del instrumento, es decir, la relación señal / ruido compara el nivel de una señal deseada con el nivel de ruido de fondo. En sistemas NIR-CI, el S/R depende siempre de la longitud de onda a causa de la señal que generalmente decrece para mayores longitudes de onda. Cuanto mayor sea la relación, menor es el efecto del ruido de fondo.

Firma espectral

El NIR-CI se basa en el hecho de que todos los materiales reflejan, dispersan, absorben y emiten energía electromagnética de manera distinta en longitudes de onda específicas. Este fenómeno es debido a las diferencias en la composición química y la estructura física inherente. Esta característica se denomina *firma o huella espectral*. Cada elemento de una imagen (píxel) en NIR-CI contiene su propia firma espectral. La firma espectral se define como el patrón de reflexión, absorbancia, transmitancia y emisión de energía electromagnética en longitudes de onda específicas. En principio, la firma espectral puede utilizarse para caracterizar, identificar y discriminar por clase/tipo cualquier objeto en una imagen y en una banda de longitud de onda suficientemente amplia [84].

1.4.2. ADQUISICIÓN DE IMÁGENES HIPERESPECTRALES

Cubo hiperespectral

Los datos procedentes de una imagen hiperespectral constan de varias imágenes congruentes que representan las intensidades en diferentes longitudes de onda λ que forman un vector de píxeles (voxel). Este contiene información espacial bidimensional (de m filas y n columnas), así como información espectral (de longitud de onda λ). Estos datos se conocen como “cubo de datos” (Figura 7) y pueden proporcionar información física o química de un material. Esta información puede incluir observaciones físicas y geométricas de tamaño, orientación, forma, color y textura, así como información química/molecular, como cantidad de agua, grasas, proteínas y otros componentes [85]. Las dos dimensiones m y n representan las localizaciones espaciales de los compuestos químicos y la dimensión λ permite su identificación. Varios miles de espectros pueden ser adquiridos con NIR-CI dependiendo del tamaño del detector.

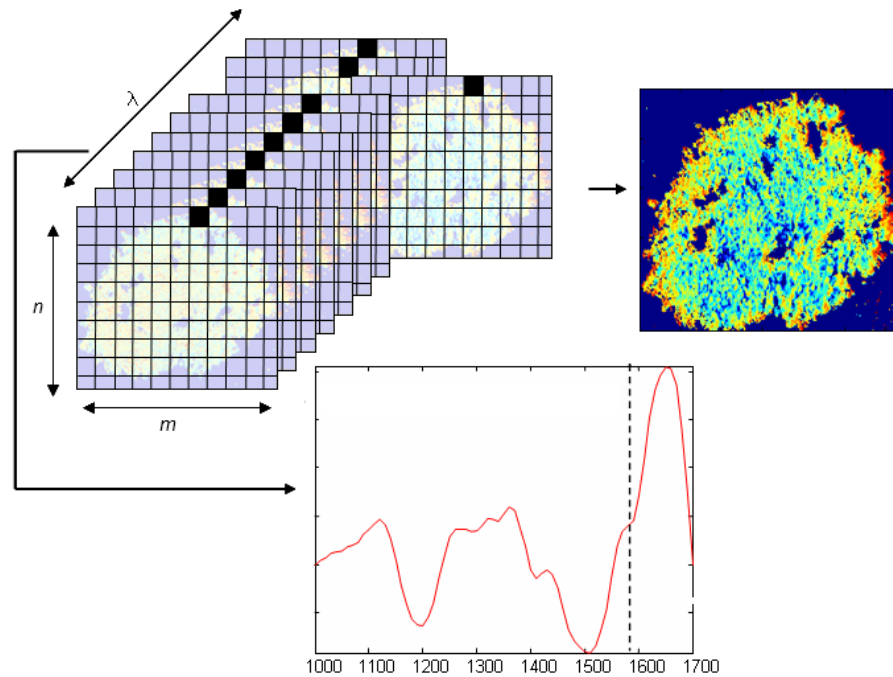


Figura 7. Cubo de datos (o hipercubo) generado durante un análisis NIR-CI. Dos dimensiones representan la distribución de los compuestos. La tercera representa la distribución espectral y permite su identificación.

Debido a que los píxeles son valores de gris digitalizados o intensidades en una determinada longitud de onda, estos pueden ser expresados como enteros. Los valores de intensidad de una imagen espacial, en el hipercubo y para una λ específica, pueden tener valores de gris a partir de 8-bits, lo que significa que 0 es el negro y 255 es el blanco. En sistemas más precisos, los valores de intensidad de cada píxel tienen 12-bits (2^{12} gradaciones, es decir, 0–4095), 14-bits (2^{14} gradaciones, es decir, 0–16383) ó 16-bits (2^{16} gradaciones, es decir, 0–65535) niveles de gris. La cámara MatrixNIR utilizada en los estudios de esta memoria cuenta con 12-bits.

El hipercubo puede ser considerado en el dominio espacial como imagen ($m \times n$) en una longitud de onda específica k o en el dominio espectral como vectores espectrales en todas las longitudes de onda como se muestra en la Figura 8.

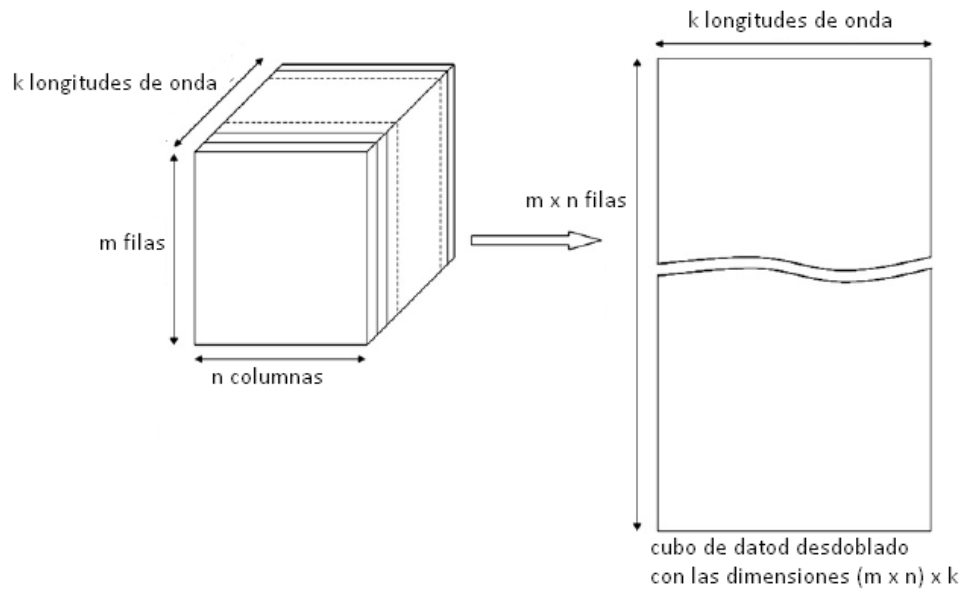


Figura 8. Desdoblamiento del cubo hiperespectral para facilitar el análisis multivariante.

Ambas representaciones son esenciales para el análisis de los datos hiperespectrales. Por ejemplo, si una imagen hiperespectral tiene dimensiones de $256 \times 320 \times 71$, este cubo de imagen puede ser interpretado como 71 imágenes de un único canal, cada una formada por 256×320 píxeles. Como alternativa, el mismo hipercubo puede verse como 81920 espectros, cada uno con 71 valores de longitud de onda. Esta gran cantidad de datos desafía las minerías de datos, pero también crea nuevas oportunidades para describir detalladamente información antes oculta.

Tipos de registro de imágenes hiperespectrales

Para generar un cubo de datos existen tres técnicas hiperespectrales, como se muestra en la Figura 9. La primera es la creación de un escaneo de puntos (Figura 9 (a)). Hasta el año 2000, esta técnica era la más generalizada. El instrumento utilizado es un espectrómetro combinado con un microscopio y una plataforma en movimiento [86]. El usuario define una cuadrícula regular de posiciones espaciales sobre la superficie de la muestra. Un espectro es medido en una posición, luego la muestra se mueve al siguiente punto de medición de la cuadrícula y otro espectro es registrado. El proceso es iterativo para todas las posiciones en el área que define la imagen. Hoy en día, casi todos los constructores configuran la posibilidad de utilizar el *mapping* para NIRM.

El segundo método se llama "escaneo de línea" (Figura 9 (b)). El detector permite adquirir al mismo tiempo una dimensión espacial y la dimensión espectral [87]. Como en el caso del *mapping*, el sistema adquiere espectros según unas posiciones espaciales predefinidas y la línea se mueve de derecha a izquierda y/o de arriba a abajo para cubrir toda la superficie. Existe, además, una segunda configuración de escaneo en línea en la que el detector es fijo y las muestras, puestas en una cinta transportadora, se mueven.

El tercer método ("escaneo de plano") utiliza detectores dispuestos en forma de Conjunto de Plano Focal (FPA) (Figura 9 (c)) [88, 89, 90, 91]. Los detectores FPA están compuestos por millares de elementos que forman una matriz de píxeles. Se trata de detectores ópticos que se coloca en el plano focal de los espectrómetros. Esto permite la adquisición de miles de espectros al mismo tiempo [92]. La popularidad de este último sistema ha incrementado en los últimos diez años y hoy en día se encuentran varias topologías de instrumentos para mapa de área.

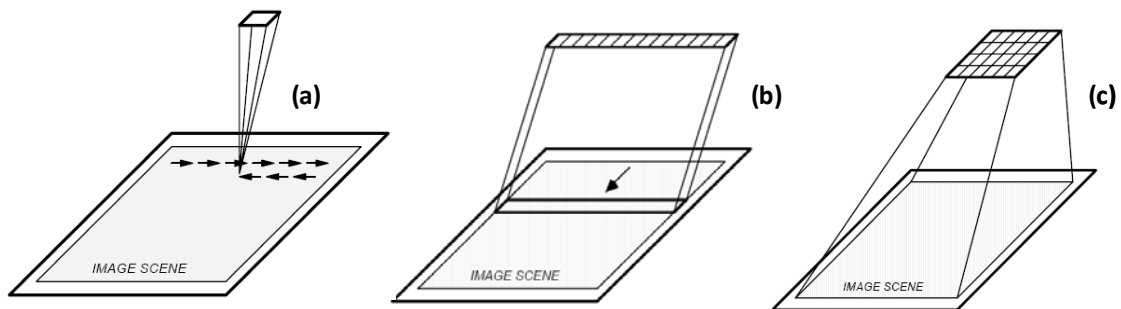


Figura 9. Esquema de las tres técnicas existentes para la adquisición del cubo de datos: (a) escaneo de puntos, (b) escaneo de línea (c) escaneo de plano. Adaptada de [93].

Los instrumentos utilizados para cada una de las modalidades arribas indicadas se definen como:

- *Whisker-broom*: configuración instrumental para escaneo de puntos.
- *Push-broom*: configuración instrumental para escaneo de línea.
- *Staring imager*: configuración instrumental para escaneo de plano.

Una representación esquemática de las tres configuraciones se encuentra en la Figura 10.

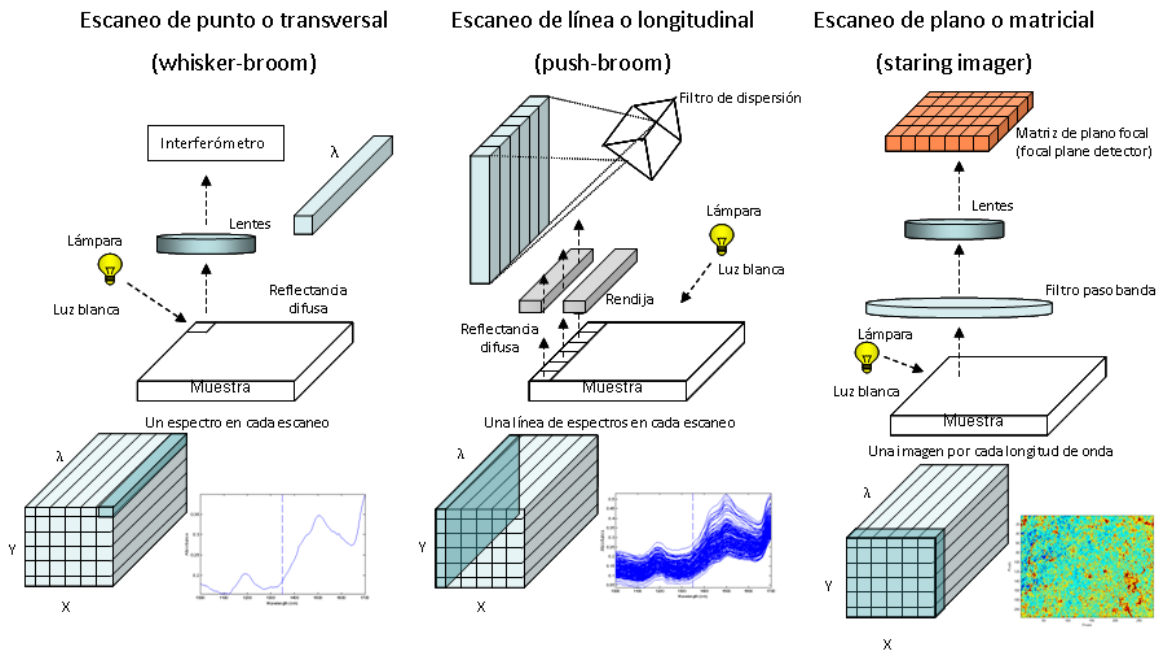


Figura 10. Las tres configuraciones comunes en los dispositivos utilizados en NIR-CI y la estructura final del cubo de datos ($X \times Y \times \lambda$). Adaptada de [94].

Las características principales de las tres tipologías de instrumentos están descritas detalladamente en la bibliografía [95, 96, 97]. Tanto el escaneo de punto como el de línea están basados en la obtención de mapas espectrales, a partir de la emisión de luz en un punto en concreto de la imagen, donde emite a una determinada longitud de onda en un punto. Así se toman espectros en todos los puntos de la muestra. Estas técnicas tienen una muy buena resolución espacial, sin embargo, el tiempo requerido puede ser muy largo. Los instrumentos *whisker-broom* miden el espectro de la imagen píxel por píxel, mientras que los *push-broom* registran los espectros por líneas de píxeles obteniendo la imagen en menor tiempo que el primer tipo de registro, aunque reduciendo la calidad de la imagen. Otro tipo de registro de imágenes es el escaneo de plano en el que se toman imágenes de toda la muestra a diferentes longitudes de onda, con lo que en tiempo de análisis se reduce muy considerablemente, aunque esto conlleva una disminución de resolución espacial. La utilización de una u otra técnica depende de la información que se quiera obtener de la muestra a analizar.

Instrumentación

El detector utilizado en NIR-CI desempeña un papel muy importante y es el elemento que marca la diferencia entre un sistema NIR-CI y un espectrómetro NIR clásico. Los detectores utilizados en los instrumentos NIR-CI son generalmente semiconductores fotovoltaicos, dispositivos llamados “de carga acoplada”(CCD). Los dispositivos semiconductores son componentes electrónicos que explotan las propiedades electrónicas de los materiales semiconductores, principalmente silicio (Si), germanio (Ge) y arseniuro de galio (GaAs). El silicio es el material más utilizado en dispositivos semiconductores. Las numerosas ventajas (procesamiento de materia prima a bajo costo, relativa facilidad de procesado, rango de temperatura idóneo) hacen que actualmente el silicio represente la mejor opción entre los diversos materiales candidatos. Los semiconductores para escaneo de línea o plano, que se utilizan habitualmente en sistemas de imágenes espectrales, incluyen sistemas de silicio (Si), antimoniuro de indio (InSb), telururo de mercurio-cadmio (HgCdTe) y arseniuro de indio-galio (InGaAs). Los sistemas o matrices de silicio son sensibles a la radiación en el rango de longitud de onda de 400–1000 nm, mientras que los sistemas InSb, HgCdTe y InGaAs alcanzan longitudes de onda entre 1000 y 5000 nm. En algunos instrumentos se utilizan varios elementos diferentes y superpuestos para optimizar la sensibilidad del detector en diferentes regiones del espectro [98]. Para aumentar la eficiencia de la detección especialmente en las regiones infrarrojos, el detector debe ser refrigerado continuamente. La refrigeración reduce la corriente de oscuridad del detector, lo que permite medir intensidades de corriente, y, por tanto, de luz, que destaquen menos sobre el ruido de fondo.

1.5. VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LA TECNOLOGÍA NIR-CI

La gran cantidad de información proporcionada por NIR-CI hace que esta tecnología sea útil en numerosas aplicaciones. Entre las ventajas que NIR-CI tiene se enumeran las siguientes:

- No requiere preparación de la muestra.
- No implica el uso de reactivos químicos.
- Una vez obtenido y validado el modelo el análisis es rápido y sencillo.
- No es invasivo ni destructivo.
- En lugar de registrar un solo espectro en un punto de la muestra, NIR-CI recoge un conjunto de espectros, uno por cada punto (píxel) de imagen de una muestra.
- Proporciona la posibilidad de elegir una región de interés (ROI) en la imagen. Si la ROI presenta un perfil espectral característico, esta región puede ser seleccionada y su espectro guardado en una librería espectral.
- Es capaz de determinar varios constituyentes simultáneamente en la misma muestra.
- No obstante, la tecnología NIR-CI también tiene algunos inconvenientes como los que se detallan a continuación:
- La imagen hiperespectral contiene una gran cantidad de datos, incluida mucha información redundante, que provoca problemas de computación.
- Es un método indirecto, es decir, necesita procedimientos de calibración estandarizada y transferencia del modelo.

Como todas las técnicas espectroscópicas, los datos espectrales extraídos de cada punto de la imagen contienen una serie de bandas sucesivas solapadas que son difíciles de asignar a un grupo químico específico.

Finalmente, hay que destacar que la tecnología NIR-CI no es indicada en algunos casos, por ejemplo, para análisis de líquidos o muestras homogéneas, en el que no hay beneficios en utilizar esta técnica, ya que el uso de un espectrómetro clásico proporciona

la misma información espectral. Naturalmente la definición depende de la resolución espacial del instrumento utilizado.

Para identificar y detectar diferentes objetos en una misma imagen estos tienen que tener características espectrales exclusivas. Además el objeto tiene que estar presente en una concentración mínima o converger en un píxel para ser detectado. Dependiendo de la resolución espacial y de la estructura de la muestra analizada, los espectros de píxeles de una imagen individual pueden no representar un espectro puro de un solo material, sino un espectro mixto constituido por las respuestas de varios materiales.

1.6. VARIABLES QUE INFLUYEN SOBRE LA CALIDAD DURANTE LA ADQUISICIÓN DE IMÁGENES HIPERESPECTRALES

La adquisición de datos es el primer paso en un análisis NIR-CI y de la calidad de los mismos depende en gran medida la precisión y exactitud a obtener con los modelos que posteriormente se desarrollen con los mismos. Por ‘adquisición de datos’ se entiende, en esta memoria, la preparación de la muestra, la configuración instrumental y los pretratamientos básicos de los datos espectrales. La calidad de los datos hiperespectrales depende de la adquisición de datos ya que ningún tratamiento espectral puede corregir completamente la mala calidad de una imagen no correctamente adquirida. Uno de los retos de la tecnología NIR-CI es el optimizar la adquisición de datos para cada tipo de producto y aplicación. Esta tarea no es fácil, ya que no existen protocolos (por ejemplo, un manual sobre ‘adquisición de imágenes de harinas proteicas’) para identificar los valores de configuración más apropiados.

Una de las ventajas del análisis NIR-CI, al igual que el análisis NIRS, es que no necesita ningún tratamiento de la muestra antes de la adquisición de los datos (ej. molienda), si bien la mayor parte de aplicaciones se realicen en terreno de alimentos. Debido al sistema de enfoque del instrumento solamente es preferible utilizar muestras con una superficie plana. En el caso de las harinas animales, compuestas por partículas de máximo 1 mm de tamaño, una simple espátula es suficiente para aplanar la superficie.

A continuación se describe el estudio de algunas variables (repetibilidad, velocidad de análisis, definición de la imagen e iluminación) cuya configuración puede ser optimizada para mejorar la calidad de las imágenes adquiridas.

1.6.1. REPETIBILIDAD

Un problema genérico en NIR-CI es la baja repetibilidad espacial y espectral de los cubos de imagen. Este argumento es clave para todos los investigadores implicados en el desarrollo de aplicaciones utilizando NIR-CI, sin embargo, estudios sobre como mejorar este aspecto se encuentran exclusivamente en el campo de la teledetección. Varios autores han publicado recientemente artículos sobre los distintos procedimientos para cuantificar y mejorar la repetibilidad espectral [99].

Un aspecto importante en este contexto es la calibración del instrumento

Los fabricantes de sistemas de análisis hiperespectral utilizan equipos sofisticados para calibrar sus instrumentos con la máxima precisión, utilizando una iluminación adecuada y condiciones ambientales constantes. Para el usuario, sin embargo, los aspectos relacionados con la calibración instrumental son solo de interés secundario y la repetibilidad es tenida en cuenta únicamente a nivel de imagen de una muestra.

Por su parte, el analista está interesado principalmente en la fiabilidad del producto final, es decir, en la repetibilidad de dos cubos de imagen adquiridos consecutivamente [100]. En este sentido, un concepto importante a tener en cuenta es que, en NIR-CI, si la variabilidad debida a defectos de reproducibilidad es similar en magnitud a la variabilidad de la información espectral o espacial de interés, utilizar este tipo de análisis para predicciones cualitativas o cuantitativas carece de sentido.

1.6.2. VELOCIDAD DE ANÁLISIS

Otro factor clave para la aplicación en tiempo real de la tecnología NIR-CI es la adquisición de imágenes espectrales en alta velocidad. Solamente minimizando los tiempos de análisis se puede pensar en un sistema de control *on-line* que analice la totalidad del producto en la salida de un proceso.

Los instrumentos NIR-CI tienen que ser diseñados y construidos para ser utilizados con la mayor eficiencia posible en cuanto a la iluminación, así como en la cuestión del detector, a fin de optimizar la relación señal/ruido (S/R). Las exigencias de velocidad afectan en gran medida también a la elección de softwares de alta velocidad que puedan tratar las imágenes hiperespectrales y aplicar algoritmos de medición y discriminación en tiempo real [101]. En cuanto a la alta velocidad, existen varios factores que influyen en la rapidez y la eficacia de un sistema NIR-CI. En relación a esto, investigadores [102] y productores de instrumentos tienen opiniones diferentes, por ejemplo, sobre la frecuencia con que las referencias negras y blancas tienen que ser escaneadas para optimizar tiempo y calidad de la imagen. Este es un tema crucial, sobre todo cuando el instrumento está habitualmente sometido a cambios de la temperatura ya que el material que compone el detector de un instrumento NIR-CI es extremadamente sensible a cambios de temperatura. Por ello, la mayor parte de las cámaras en el mercado de los últimos diez años son termalmente estabilizadas con varios tipos de sistemas de refrigeración [103]. Aunque así, la tolerancia de la calibración en el infrarrojo cercano a variaciones de temperaturas puede ser mejorada a través de la frecuente corrección de la imagen durante la adquisición de la imagen. Así pues, el reto está en alcanzar un compromiso para obtener tiempos de análisis cortos y alta estabilidad de las imágenes registradas.

1.6.3. DEFINICIÓN DE LA IMAGEN

Un ulterior elemento que hay que tener en cuenta para la correcta adquisición de la imagen es el material usado para la referencia negra, ya que las características de reflectancia/absorbancia de la referencia influyen en el rango de valores de intensidad de la señal del detector [104]. Las características de presentación de la muestra también afectan la calidad de la imagen. La capacidad de discriminar con facilidad los píxeles correspondientes a la muestra, y separarlos de los pertenecientes al soporte, depende del tipo de material elegido para el porta muestras empleado durante el análisis.

1.6.4. ILUMINACIÓN

Finalmente, el control de la luz externa tiene una considerable importancia durante la adquisición de la imagen hiperespectral, ya que cualquier variación en la uniformidad de la luz así como un calentamiento de la muestra, debido a la fuente de iluminación, puede afectar la calidad de imagen.

El objetivo principal de este estudio es el de optimizar la metodología para la adquisición de imágenes hiperespectrales, en vista de asegurar el desarrollo de modelos estadísticos robustos para la caracterización cualitativa y cuantitativa de MBM.

1.7. INFLUENCIA DE LA REPETIBILIDAD ESPECTRAL EN EL ANÁLISIS NIR-CI

Un aspecto importante durante la adquisición de los espectros es la evaluación de la repetibilidad espectral. Esta tiene que ser elevada para que la variabilidad entre espectros de una misma muestra no sea mayor que la variabilidad entre muestras distintas. Una de las herramientas disponibles para medir la repetibilidad es el cálculo del estadístico denominado Error Cuadrático Medio o RMSE (del inglés *Root Mean Square Error*) [105, 106], que permite calcular la similitud existente entre los valores de absorbancia entre varios espectros. Este estimador es una expresión de la desviación que informa de cuanto se desvía la variabilidad recogida por dos o más espectros respecto a la variabilidad media de la población espectral [107]. Para el cálculo del estadístico RMSE, en la presente memoria se ha utilizado la siguiente fórmula:

$$RMSE_j = 10^6 * \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=N} (Y_{ij} - \bar{Y}_i)^2}{N}}$$

Donde:

$RMSE$ = Desviación cuadrática media desde el espectro j

N = número de longitudes de onda (λ_i) en cada espectro j

Y_{ij} = absorbancia del espectro j a la longitud de onda λ_i

\overline{Y}_i = absorbancia media a la longitud de onda λ_i promediada sobre las pruebas J .

En NIR-CI, el concepto de “repetibilidad espectral” esta ligado al nivel de ruido espectral, es decir, a la variabilidad existente entre los espectros de los píxeles en una imagen. Esta variabilidad es debida a la estructura tridimensional de los datos de una imagen [108]. Una parte está asociada a diferencias físico-químicas presentes en una muestra, pero la mayor parte se atribuye a variaciones dentro de una imagen, debido a numerosos aspectos instrumentales. De la misma forma que el concepto de repetibilidad cambia cuando se pasa del espectro único (NIRS) al conjunto de espectros que forman una imagen (NIR-CI), también varía la noción de “colectivo de calibración representativo” y “número óptimo de muestras”. Para abordar un determinado estudio utilizando NIR-CI es imprescindible el conocimiento de la repetibilidad de las imágenes y de los espectros una vez que las condiciones de análisis han sido optimizadas, para una determinada combinación cámara-espectrofotómetro y para un determinado producto.

En el apartado 1.6 de este capítulo se describen algunas de las fuentes de error existentes en el análisis NIR-CI (iluminación, referencias, etc.) que pueden dar lugar a errores tanto en el dominio espacial como en el espectral. También se han propuestos posibles soluciones para minimizar estos errores, por ejemplo, mediante la estandarización en la presentación de la muestra, de la frecuencia de la referencia, etc.. Sin embargo, algunos de las fuentes de variabilidad son de más difícil control e incluso de origen desconocido.

Baghzouz et al. [109] han tratado de profundizar en el estudio del problema de la baja repetibilidad de las muestras analizadas con NIR-CI que, en efecto, es similar al problema que se tiene al trabajar con una fotografía desenfocada: se puede mejorar hasta cierto punto pero hubiera sido mejor enfocar la cámara debidamente en un primer momento. Es evidente la preocupación acerca de la repetibilidad de una imagen hiperespectral. Sin embargo, en la práctica, hay pocas recomendaciones sobre como enfrentarse a este problema. Algunos autores [110, 111] han realizado aportaciones en este sentido si bien

aplicadas a la teledetección. No obstante, es indudable que este conocimiento generado sobre imágenes multi o hiperespectrales en trabajos de teledetección, debe ser utilizado para avanzar en el conocimiento de los instrumentos NIR-CI, ya que un nivel bajo de repetibilidad podría presentarse también entre perfiles espectrales obtenidos de puntos muy próximos entre sí (separados por milímetros). Recientemente, Nansen et al. [112] han utilizado el variograma para crear unos parámetros para ser utilizados como posibles indicadores de la bioactividad acaricida y para medir el estrés por sequía en maíz respectivamente. Este enfoque, basado en la estructura espacial y que trata los datos hiperespectrales como imágenes y no solamente como conjuntos de datos espectrales, permite reducir sensibilidad a factores de ruido tanto a nivel de imagen, como entre diferentes cubos de imagen. El mismo autor [113] propone una solución para estudiar la consistencia de los datos adquiridos: el análisis previo y posterior a cada muestra, de cuatro tarjetas de diferentes colores. Para cada banda calcula finalmente la variación en la respuesta.

A colación de lo anterior, una de las estrategias utilizadas por Anderson y Peleg [114] para mejorar la calidad de los datos obtenidos de imágenes hiperespectrales es el estudio de parámetros que ayuden a cuantificar “errores” o diferencias entre imágenes debidas al sistema, a elementos externos (ej.: iluminación) o a las técnicas de muestreo. Delwiche et al. [115] indican el promediado entre píxeles como método para aumentar la repetibilidad. Esta estrategia, sin embargo, podría disminuir la información sobre la muestra, sobre todo si esta es heterogénea.

1.8. MÉTODOS PARA LA SELECCIÓN DE PÍXELES REPRESENTATIVOS

Los instrumentos utilizados en NIR-CI recogen simultáneamente varios miles de espectros NIR espacialmente distintos en un único conjunto de datos [116]. Las herramientas de análisis multivariantes que se utilizan generalmente para fines de clasificación son el análisis de componentes principales (PCA) y el análisis por mínimos cuadrados parciales (PLS) entre otros [117]. Sin embargo, la aplicación de tratamientos matemáticos para el análisis de imágenes hiperespectrales puede llevar a problemas

informáticos, ya que cada imagen correspondiente a una muestra tiene un tamaño de alrededor de 30 MB. Una solución a este problema es la reducción del número de objetos representativos de la base de datos. Hay muchos métodos de selección de subconjuntos representativos, y la elección de uno u otro depende de la naturaleza de cada problema específico. Una opción consiste en calcular el espectro promedio de cada muestra para construir un conjunto de calibración. Ésta es la opción más fácil y, aparentemente, la más viable bajo la condición de que la muestra estudiada pueda ser considerada homogénea. En el caso de las harinas animales, estas son aparentemente homogéneas ya que las partículas que las componen tienen tamaños parecidos entre ellos (= 3 mm). El uso del espectro medio representa la forma más concisa para reducir los datos y ha sido empleada, entre otros, por Taghizadeh et al para estudiar la humedad en hongos. [118]. Sin embargo, las muestras de harinas animales pueden también tener características por las que pueden considerarse heterogéneas. En este caso los datos hiperespectrales pueden claramente contiene una variedad de espectros puros y mezclado constituyente cuya abundancia relativa es característicos de la muestra [119].

En la literatura se encuentran referencias sobre como abordar el problema de la selección de información relevante a través de la utilización de numerosos métodos de selección de subconjuntos de muestras. Estos métodos, además de servir para construir los colectivos de calibración y validación, también buscan reducir un gran conjunto de datos. Como señalaron Stanimirova y Walczak [120], la estrategia más fácil y menos problemática para la elección de un subconjunto de datos es la selección aleatoria, método que puede aplicarse a los píxeles de una imagen hiperespectrales. Sin embargo, esa selección no garantiza la representatividad del subconjunto. Otras técnicas tienen en cuenta las características espectrales de las muestras analizadas, como por ejemplo los métodos de selección basados en la distancia de Mahalanobis (MD) [121] o el método de Kennard-Stone [122]. Sin embargo, en NIR-CI, también es posible utilizar la información espacial de una imagen hiperespectral en lugar de información espectral. En este sentido existen una amplia variedad de técnicas de reducción de datos, como pueden ser la interpolación espacial o el proceso de Binning.

1.9. HERRAMIENTAS PARA EL ANÁLISIS CUANTITATIVO Y CUALITATIVO DE IMÁGENES HIPERESPECTRALES

El procedimiento analítico de un experimento NIR-CI puede dividirse en tres pasos:

1. Adquisición de datos: preparación de la muestra, puesta a punto del instrumento, transformaciones espectrales básicas. La información de salida de un análisis NIR-CI se encuentra organizada en una estructura en 3D, el cubo de datos o cubo hiperespectral.
2. Procesamiento de datos: uso de herramientas de análisis univariante o multivariante de imagen (Multivariate Image Analysis, MIA). Puede incluir la selección de longitudes de onda, pretratamiento espectral, análisis de datos para generar mapas de distribución de ingredientes de una imagen.
3. Procesamiento de la imagen: integración de los resultados del procesamiento de datos para la descripción cualitativa y cuantitativa de una muestra.

Durante el paso 2 hay que tener en cuenta que el espectro de una muestra no representa una sola especie presente en una muestra sino la suma de la contribución a la absorbancia de cada uno de los componentes que la conforman y en cada longitud de onda. Esta característica, junto a la elevada cantidad de información contenida en los espectros NIR, hace que sea necesario el uso de herramientas matemáticas para el tratamiento de los datos. En este sentido, la quimiometría permite extraer la información presente en los espectros de un conjunto de muestras, ya sea de forma cualitativa como cuantitativa.

La quimiometría es una rama de la ciencia relativamente nueva y tiene varias definiciones oficiales y menos oficiales. Massart en el 1997 [123] presentó la siguiente definición:

“La quimiometría es la parte de la química que se sirve de las matemáticas, estadística y lógica formal para: diseñar o seleccionar procedimientos experimentales óptimos; proporcionar información química relevante a partir del análisis de señales analíticas y, finalmente, adquirir conocimiento de los sistemas químicos”.

El término *quimiometría* fue introducido a principios de 1970 por Bruce Kowalski y Svante Wold. Con la introducción y el uso generalizado de los ordenadores en los laboratorios de química para adquisición de datos y control de instrumentación se hizo evidente la necesidad de inventar nuevas herramientas para poder manejar el creciente volumen de datos químicos. El análisis estadístico multivariante había sido ya empleado en campos como la psicometría, la econometría y la biometría [124]. La extensión de estas técnicas al campo de química fue lo que impulsó el nacimiento de la quimiometría.

Todas las herramientas descritas en los siguientes apartados pueden ser aplicadas al análisis de imágenes hiperespectrales, previo desdoblamiento del cubo hiperespectral en una matriz bidimensional. En este trabajo se ha utilizado como metodología común a todos los estudios la reconstrucción de la imagen asignando un valor de predicción a cada píxel y la sucesiva aplicación de los cálculos necesarios para determinaciones cuantitativas.

1.9.1. PRETRATAMIENTO ESPECTRAL

Los pretratamientos espectrales o preprocesado son correcciones del espectro basadas en tratamientos matemáticos con la finalidad de aumentar la calidad de la señal instrumental reduciendo al máximo la información no asociada a la propiedad estudiada, como pueden ser desplazamientos de la línea base, ruido espectral, etc.. [125]

Se denomina ruido al componente espectral no relacionado con ninguna propiedad física o química de la muestra como puede ser el ruido instrumental o de iluminación. Además, otras fuentes de variación como la temperatura y humedad pueden aportar interferencias a la señal analítica. A continuación se presentan los pretratamientos más habituales utilizados en este trabajo.

Standard Normal Variate (SNV)

El SNV [126] corrige efectos de dispersión o *scattering* provocados por diferencias físicas entre muestras. El método se aplica individualmente a cada espectro y se obtiene un espectro de absorbancia media $N = 0$ y desviación estándar $STD = 1$.

La ecuación para el cálculo del es la siguiente:

$$Abs_j^{SNV} = \frac{Abs_j - Abs}{STD}$$

Abs_j es la absorbancia original a la longitud de onda j , Abs es la absorbancia media del espectro.

Detrend (DT)

El *Detrend* (DT) se emplea como complemento del tratamiento SNV, puesto que este no corrige curvaturas en la línea base. Al igual que la corrección SNV, se calcula de manera individual para cada espectro. Elimina la curvatura de la línea base causada por interacciones variables entre la humedad y efectos de partícula [127].

Multiplicative Scatter Correction (MSC)

La corrección del efecto multiplicativo de dispersión tiene la misma utilidad que el SNV, sin embargo, el pretratamiento espectral depende del conjunto de muestras al que se aplica [128]. Un estudio publicado por la doctoranda [129] describe las diferencias entre SNV y MSC para tratamientos de datos hiperespectrales.

Mean Center

El centrado de la media consiste en extraer el valor medio de la variable para cada uno de los valores de la variable original. De esta manera, cada variable en la nueva matriz de datos (matriz centrada) presenta a una media igual a cero.

$$z_{ij} = x_{ij} - \bar{X}_j \quad i = 1, \dots, I \quad j = 1, \dots, J.$$

$$\bar{X}_j = \frac{\sum_{i=1}^I x_{ij}}{I},$$

z_{ij} es el nuevo valor centrado, x_{ij} es el valor original de la variable y \bar{X}_j es el valor medio de los valores x_i de las variables j . El tratamiento *Mean Center* hace una translación de las coordenadas originales de cero al valor medio de los datos. De esta manera, las desviaciones de la media son fáciles de visualizar, ya que esta parte de la información de las variables es considerada constante y puede ser eliminada. Sin embargo, el centrado de media hace el cálculo de las asignaciones cuantitativas proporcionales de las diferentes fuentes de contaminación en muestras más difíciles debido a la presencia de valores negativos. El tratamiento de *Mean Center* es aconsejado en el caso de algunos métodos de quimiometría como análisis de componentes principales [130] para investigar las diferentes fuentes de variación.

1.9.2. PROCESADO

El procesado de los espectros y la representación de los resultados en mapas de distribución permiten la localización de los compuestos químicos en la muestra y debe ser tan exacta como sea posible para evitar píxeles erróneamente clasificados. Se han desarrollado muchos métodos (Figura 11), la mayoría derivan directamente de la espectroscopia clásica. Dependiendo del tipo de información disponible, se deberá utilizar un método u otro.

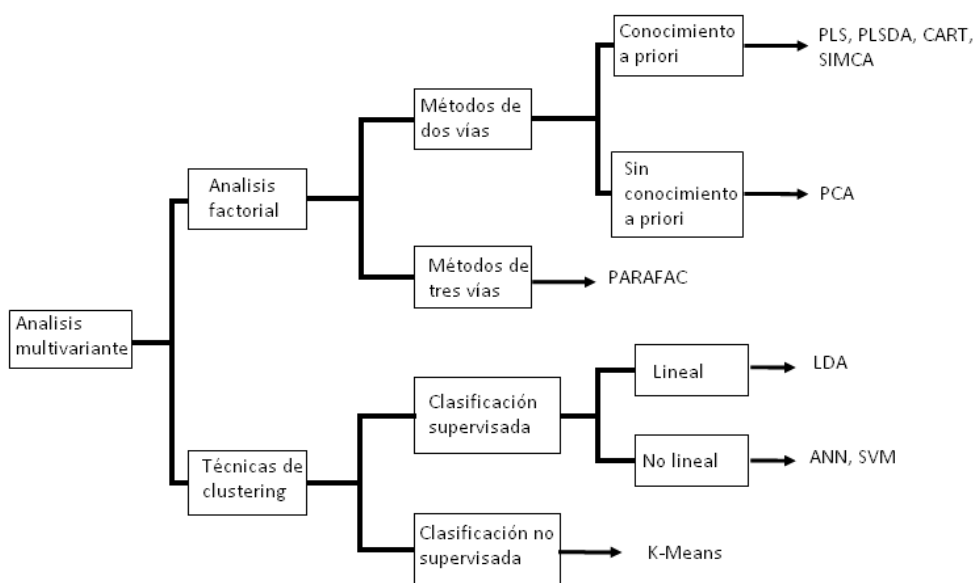


Figura 11. Métodos de extracción para crear mapas de distribución.

El análisis de datos multivariante (multidimensional o multicanal), como parte principal de la quimiometría, se hace indispensable para el desarrollo de aplicaciones cuantitativas o cualitativas en NIRS, la cual en algunas ocasiones maneja matrices de datos en las que cada objeto (muestra) presenta una enorme cantidad de variables (valores de absorbancia). Si se considera la tecnología NIR-CI, a la gran cantidad de variables hay que añadirle el elevado número de espectros (más de 80000 por cada muestra), por lo que se hacen indispensables métodos efectivos análisis de datos, minerías de datos y patrones de clasificación para extraer la información deseada de las imágenes.

Como se muestra en la Figura 11, se pueden establecer varias subdivisiones. Por un lado, están los métodos factoriales que tienen por objetivo reducir la dimensión mediante el uso de una distribución multivariante subyacente [131]. Los datos medidos se modelan tratándoles como una combinación lineal de los factores más un término de ruido. Por otro, están las técnicas de agrupamiento (*clustering*), que tienen por objetivo clasificar los espectros en diferentes grupos de las mismas características. Las técnicas de *clustering* pueden ser aplicadas tanto a los espectros completos como después de un análisis factorial en el espacio reducido [132].

Análisis factorial

El análisis factorial de datos hiperespectrales se basa principalmente en algoritmos procedentes del campo de la espectroscopía clásica. Estos métodos tratan matrices bidimensionales donde cada fila corresponde a un espectro. Los dos métodos, dentro de esta clase, utilizados en este trabajo han sido el Análisis por Componentes Principales (PCA) y el Análisis por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS). A continuación se describen los rasgos principales de estas dos técnicas quimiométricas.

Análisis por componentes principales (PCA)

El PCA es un método de estadística multivariante aplicado frecuentemente para el análisis de datos obtenidos de NIR-CI [133]. Se parte de la hipótesis de que, en el grupo de datos originales, hay un conjunto de factores reducidos o componentes dominantes (fuentes de variación) que influyen de manera importante en la variación de los datos

observados, y que estos factores o componentes no pueden medirse directamente (son factores ocultos), ya que no pueden ser observados experimentalmente.

Por lo general, una cantidad significativa de información contenida en las variables experimentalmente es redundante (correlación con otras variables) o irrelevante. El análisis PCA permite la transformación de este set en un nuevo conjunto de variables no correlacionadas entre ellas, más fácilmente interpretable, y subraya la información subyacente más importante contenida en datos. El PCA es un método de quimiometría que asume un modelo bilineal para explicar la variación de los datos observados utilizando un pequeño número de componentes. Usando la combinación lineal de las variables originales, se crea un nuevo grupo de variables ortogonales no correlacionadas (*loadings*), lo que hace posible el cálculo de los nuevos ejes (ortogonales) de la representación de datos (*scores*), en la que se explica la variación de los datos en orden decreciente [134].

El PCA intenta resumir la información pertinente contenida en la matriz de datos analizados, separando el ruido. Matemáticamente la matriz de datos (experimental) original D es descompuesta, siguiendo un modelo bilineal, en el producto de dos matrices de datos ortogonales, X y Y^T (Figura 12):

$$D = XY^T + E = D^* + E$$

Donde D es la matriz de datos experimentales, X la matriz de resultados (mapa de muestras), Y^T la matriz de *loadings* (mapa de variables) y E la matriz de error [135].

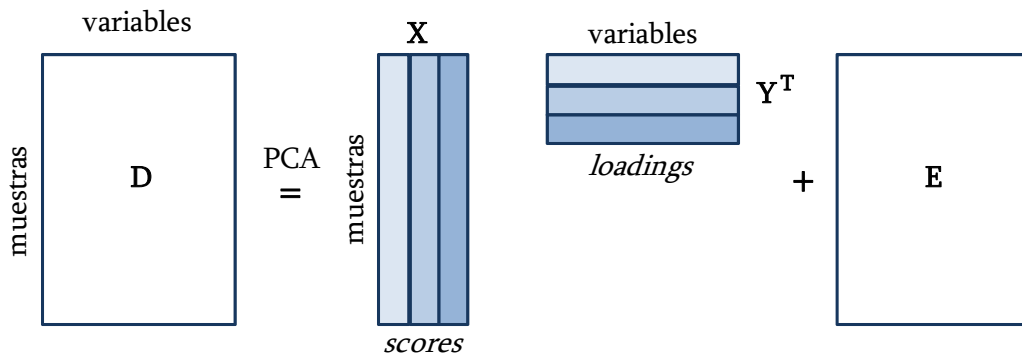


Figura 12. Descomposición PCA de la matriz de datos D siguiendo un modelo lineal por un número de componentes $N = 3$.

El producto entre los *scores* y las matrices de *loadings* reproduce la matriz de datos original para un determinado número de componentes N (número de columnas en \mathbf{X} y de filas de \mathbf{Y}^T). El hecho de que los componentes en PCA se obtienen en un orden decreciente de varianza explicada de los datos, la información más relevante del set de datos se concentra siempre en los primeros componentes principales generados. Es por ello que los últimos componentes pueden omitirse sin una pérdida significativa de información relevante, ya que estos explican sólo una pequeña parte de la varianza que, normalmente, está relacionada con ruido o con el error experimental. La descomposición de la matriz en la ecuación arriba descrita es llevada a cabo con algunas restricciones, como la ortogonalidad, normalización de *loadings*, y la máxima varianza explicada por los sucesivos componentes extraídos. En virtud de estas limitaciones, el PCA proporciona soluciones únicas. Sin embargo, estas soluciones son combinaciones lineales abstractas de las reales fuentes experimentales de varianza y, a pesar de que sean muy útiles para la exploración de datos, en muchos casos pueden ser difíciles de interpretar.

En general, el número de componentes N está seleccionado en el punto donde la adición de un nuevo componente no proporciona información complementaria relevante en el contexto del problema estudiado o, en otras palabras, cuando este componente explica solo ruido. El número seleccionado de componentes principales (PCs) está relacionado con el número independiente de fuentes o patrones de variación presentes en los datos analizados. Según la magnitud de la varianza explicada y la contribución de las variables originales en cada componente se puede deducir el significado de los componentes identificados y también se puede determinar el nivel aproximado de error contenido en los datos experimentales. En este contexto, la visualización de los *scores* (matriz \mathbf{X}) y de los *loadings* (matriz \mathbf{Y}^T) obtenidos son extremadamente útiles.

El valor de los *loadings* indica la magnitud de la contribución de cada variable original en cada componente (nuevos ejes). Cuando se consideran datos espectrales los *loadings* pueden proporcionar información sobre la composición química de una muestra. Las representaciones de la muestra en el nuevo espacio definido por los nuevos componentes se denominan *scores*. Su representación permite la agrupación de muestra de acuerdo con su similitud, así como la detección de muestras que presentan valores extremos. La

matriz de error \mathbf{E} contiene la parte de varianza no explicada por el modelo y que, en consecuencia, es el resultado del error experimental.

Analisis por mínimos cuadrados parciales (PLS)

Es un método de regresión que relaciona una matriz de espectros (\mathbf{X}) con un vector de valores de referencia (\mathbf{y}). PLS requiere un set de calibración compuesto por un suficiente número de muestras que abarque un rango apropiado de concentraciones para construir un modelo para nuevas predicciones. En su forma más simple un modelo lineal especifica la relación lineal entre una variable dependiente \mathbf{y} (respuesta), y un set de variables predictoras, el \mathbf{X} , así que:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_px_p$$

En esta ecuación b_0 es el coeficiente de regresión y los valores b_p son los coeficientes de regresión (para variables de 1 a p) calculados de los datos. El método trata de identificar y resaltar factores, o combinaciones lineales de variables \mathbf{X} , que mejor ajusten las variables dependientes \mathbf{y} . El análisis PLS es eficaz para el tratamiento de set de datos donde hay alta correlación entre las variables. La Figura 13 muestra la adquisición de la imagen y la transformación de los datos mediante PLS para obtener los mapas de distribución de los compuestos.

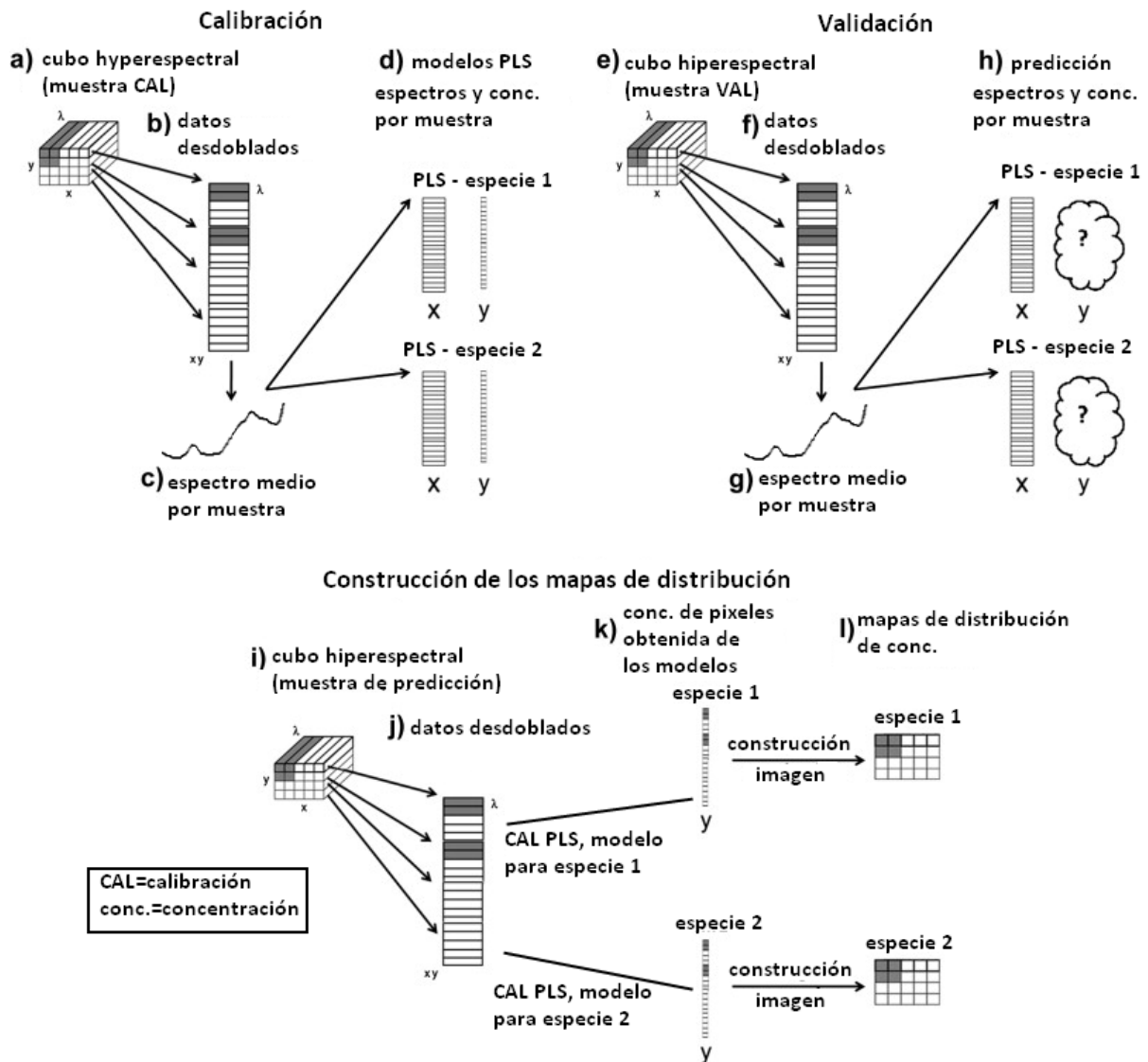


Figura 13. Pasos para transformación de datos y calibración para obtener el mapa de distribución. Adaptada de [136].

Una descripción más exhaustiva de esta metodología se encuentra en el siguiente apartado de este capítulo junto con la de otros métodos de clasificación como SIMCA (*Soft Independent Modeling of Class Analogy*) y CART (*Classification and Regression Tree*). No se han utilizado métodos de análisis factorial de tres vías por lo que no se describirán en este apartado.

Técnicas de clustering

Las técnicas de *clustering* son el segundo tipo de métodos de análisis multivariante. Su objetivo es agrupar píxeles que presenten características similares de acuerdo a un

criterio. Un grupo de píxeles es asignado a una clase o cluster. Estos grupos pueden ser creados utilizando un criterio basado en la distancia, en la probabilidad y en la información a priori. Pueden distinguirse dos familias de métodos entre las técnicas de *clustering*. La primera familia necesita un conjunto de muestras que ya está etiquetado, es decir, ya asignado a una clase. Este conjunto servirá como un conjunto de entrenamiento para calcular el modelo. El modelo creado será utilizado para clasificar muestras desconocidas.

Por otra parte, las técnicas *clustering* sin supervisión pretenden clasificar píxeles que tienen características similares sin información previa. Hasta ahora el uso de métodos de *clustering* en NIR-CI es bastante limitado siendo el algoritmo PLS mucho más extenso. En el presente trabajo se ha enfocado la atención a métodos que pueden clasificar píxeles sin interacción del usuario (no supervisados). Tal vez el método más popular y más simple dentro de las técnicas *clustering* sin supervisión es el algoritmo de *K-means (Km)*, donde K es el número de clústeres. *Km* es un clasificador donde cada píxel es asignado a una única clase. El objetivo es reducir al mínimo la suma de las variaciones dentro del *cluster* [137]. En el capítulo 3 de esta memoria se encuentra una descripción detallada de esta técnica quimiométrica.

1.10. ALGORITMOS DISCRIMINANTES

El análisis discriminante en NIRS puede ser caracterizado según diferentes criterios. Por ejemplo, la división en métodos supervisados y no supervisados [138], desarrollándose los primeros a partir de un conocimiento previo en cuanto a asociación entre miembros que constituyen grupos o clases, no existiendo estas características en los no supervisados, por lo que los modelos se diseñan sin una comprensión previa de la distribución o comportamiento en grupos que pueda presentar el colectivo experimental. Otras tipificaciones del análisis cualitativo se basan en la división entre métodos paramétricos o no paramétricos, determinísticos o no determinísticos, lineales o no lineales; finalmente, se puede distinguir entre métodos que se basan en la clasificación entre clases (PLSDA y CART) o en el modelado de clases (SIMCA) [139]. Todos se componen de los siguientes pasos:

- (1) Selección de los colectivos CAL (calibración) y VAL (validación).
- (2) Selección de variables que contienen información útil para la discriminación y eliminación de las variables que codifican el ruido.
- (3) Creación de un modelo utilizando el colectivo CAL.
- (4) Validación del modelo utilizando el colectivo VAL para evaluar la fiabilidad de la clasificación obtenida.

En el análisis NIR-CI hay otro paso que implica el desdoblamiento del cubo hiperespectral $A \times B \times L$ en una matriz bidimensional $(A \times B) \times L$ [70] de manera que cada imagen hiperespectral pueda ser tratada como si fuera una matriz de espectros.

Los progresos en el conocimiento del espectro y sus propiedades y asimismo la incorporación en los *softwares* que acompañan a los equipos, de diferentes algoritmos matemáticos para el análisis multivariante de datos espectrales, ha hecho posible la extracción eficiente de información espectral relevante y que el análisis cualitativo NIRS sea una realidad [140]. Hoy es posible utilizar la información espectral "*per se*" sin necesidad de relacionar esta a un método de referencia. Mediante la construcción de librerías espectrales que contienen información sobre espectros representativos de productos agro-industriales, una vez procesadas matemáticamente utilizando técnicas de análisis multivariante, es posible el utilizar la tecnología NIRS como método de identificación automática con múltiples aplicaciones (por ejemplo detección de productos que se desvían de un determinado estándar de calidad, detección de adulteraciones, etc.). El análisis cualitativo representa una herramienta de gran importancia en el comercio e industria de alimentos animales, para la declaración de ingredientes en mezclas y la detección de mezclas fraudulentas [141].

Los algoritmos quimiométricos más utilizados para el análisis de datos de reflectancia procedente de imágenes hiperespectrales incluyen: análisis discriminante [142-144], análisis por componentes principales [145-148], métodos basados en regresión lineal múltiple como PLS [149-151], uso de índices construidos con cocientes de longitudes de onda (*band ratio*) [152-154], árboles de decisiones (CART) [155], redes neuronales

artificiales (ANN) [156, 151, 155], SIMCA y máquinas de vectores de soporte (SVM) [157, 158]. En este capítulo se describe la aplicación de algunos de estos algoritmos en el análisis discriminante de harinas animales.

1.10.1. ANÁLISIS DISCRIMINANTE POR MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES (PLSDA)

La viabilidad del algoritmo PLSDA se refleja en la gran cantidad de trabajos publicados sobre su aplicación en NIR-CI [159-161].

Durante el desarrollo de un modelo PLSDA, se conoce a priori el grupo al cual pertenecen las muestras del colectivo de calibración. Esto permite organizar archivos que contengan los espectros de todas las muestras pertenecientes a una misma clase, tantos como clases existan. Automáticamente se genera una matriz temporal con las muestras de todas las clases y unas nuevas variables *dummy*, tantas como clases existan. Se indica en cada variable la pertenencia o no de una muestra a un determinado grupo mediante unos o ceros respectivamente, realizando una regresión PLSDA con la matriz de estas nuevas variables *dummy* y los datos espectrales de las muestras. Para fijar el número de nuevas variables (VLs) y evaluar el modelo se utiliza la validación cruzada. La Figura 14 muestra los pasos para la creación del modelo PLSDA.

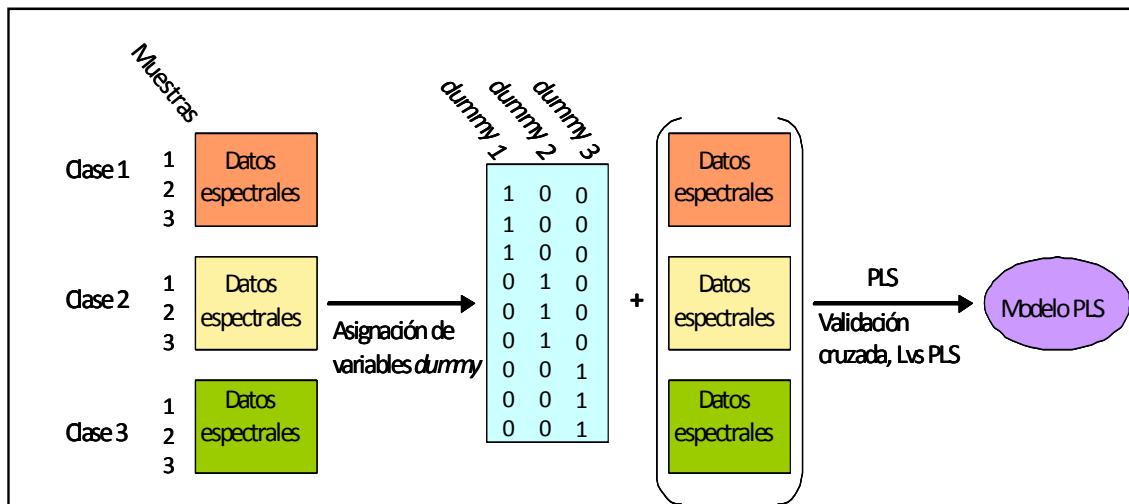


Figura 14. Obtención del modelo PLSDA. Adaptado de [162].

Una vez obtenido el modelo se predice el valor de cada variable *dummy* para cada muestra. El porcentaje de muestras correctamente clasificadas en las clases a las que pertenecen indica la bondad del modelo desarrollado [163].

1.10.2 MODELADO INDEPENDIENTE SUAVE DE ANALOGÍA DE CLASES (SIMCA)

El método de reconocimiento de patrones SIMCA (*Soft Independent Modeling of Class Analogy*) ha sido uno de los métodos de clasificación más utilizados en el control de calidad en las industrias agroalimentaria desde su introducción por Wold en 1977 [164, 165]. Se trata de un método supervisado de reconocimiento de patrones que se basa en el principio de analogía entre las muestras que pertenecen a una misma clase y emplea, para el cálculo de las distancias, unos *scores* establecidos mediante análisis por componentes principales (PCA). El método SIMCA calcula un modelo PCA para cada clase o categoría presente en el sistema objeto de estudio (Figura 15), posteriormente integra cada una de las clases y calcula sus límites o fronteras con una probabilidad dada, comúnmente del 95% [166].

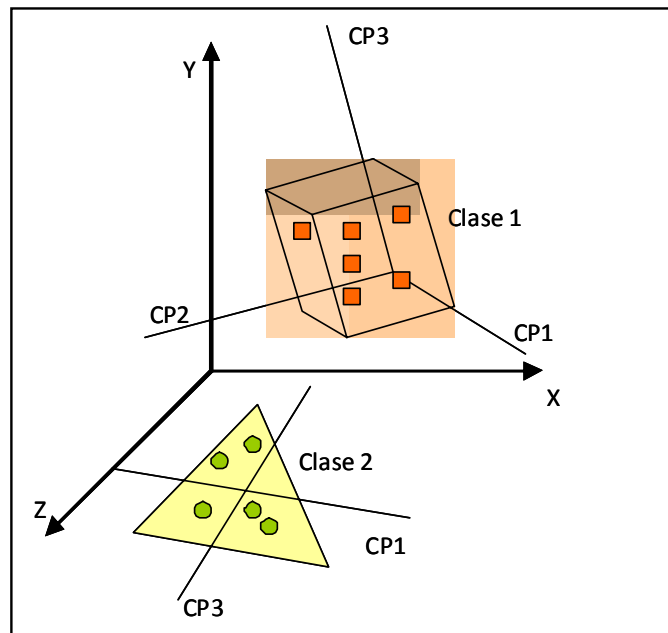


Figura 15. Modelado individual para cada clase en SIMCA.

Este método ha sido utilizado por Rutledge *et al.* [144] que ha empleado este algoritmo para clasificar sólidos heterogéneos con NIR-CI demostrando que SIMCA funciona mejor que PLSDA cuando las clases tienen características o tamaños diferentes entre ellos.

1.10.3. ÁRBOL DE CLASIFICACIÓN Y REGRESIÓN (CART)

Breiman [167] desarrolló por primera vez el algoritmo CART (*Classification and Regression Tree*) en 1984. Este método se incluye en un determinado grupo de técnicas denominadas de “búsqueda de baches” (*bump hunting*) [168] utilizadas para buscar espacios de variables de entrada asociados al valor medio más alto o más bajo de respuesta, bajo la condición de que el tamaño de la información en la región sea mayor de un determinado umbral.

El resultado es un árbol de decisión donde las ramas representan conjuntos de decisiones y cada decisión genera reglas sucesivas para continuar la clasificación (partición) formando así grupos homogéneos respecto a la variable que se desea discriminar. Las particiones se hacen en forma recurrente hasta que se alcanza un criterio de parada para evitar el sobreajuste al igual que otros métodos como ANN o SVM. El método utiliza datos históricos, es decir, ya calculados en pasos anteriores, para construir el árbol de decisión y este árbol se usa para clasificar nuevos datos. El método CART es clasificado como no-paramétrico y de segmentación binaria, es decir, el árbol es construido dividiendo repetidamente los datos. En cada división los datos son partidos en dos grupos mutuamente excluyentes. El nodo inicial es llamado *nodo raíz* o *grupo madre* y se divide en dos grupos hijos o nodos, luego, el procedimiento de partición es aplicado a cada grupo hijo por separado. Las divisiones se seleccionan de modo que “la impureza” (error) de los hijos sea menor que la del grupo madre [169]. El objetivo es dividir la respuesta en grupos homogéneos y a la vez mantener el árbol razonablemente pequeño. Para dividir los datos se requiere un criterio de partición que determinará la medida de impureza, esta última establecerá el grado de homogeneidad entre los grupos. El análisis CART generalmente consiste en el desarrollo del árbol a partir del nodo raíz, la parada de desarrollo y la poda del árbol [170], como mostrado esquemáticamente en la Figura 16.

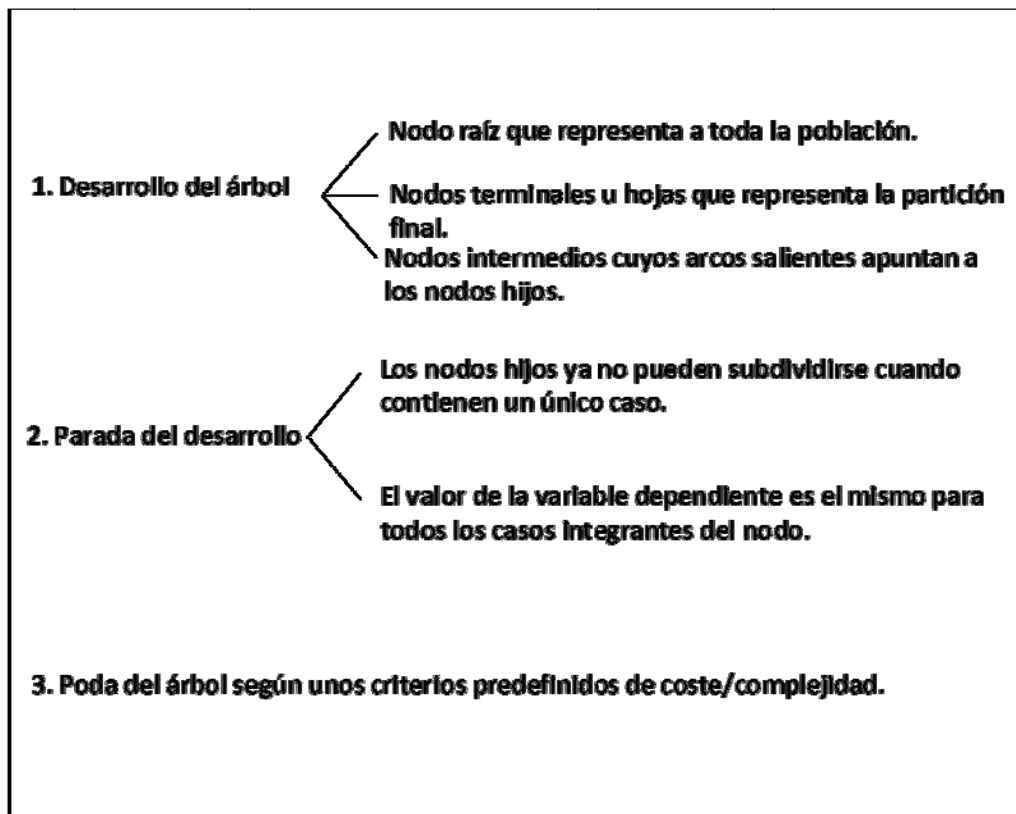


Figura 16. Esquema de los 3 pasos de un análisis CART.

A continuación se detalla el procedimiento consistente en los tres pasos necesarios al desarrollo de un análisis CART.

Desarrollo del árbol

El árbol máximo es construido utilizando un procedimiento de partición binario, comenzando en la raíz del árbol. Este árbol es un modelo que describe el conjunto de calibración (CAL) y, generalmente da lugar a sobreajustes, es decir, contiene gran cantidad de niveles y nodos que no producen una mejor clasificación y puede ser demasiado complejo. Cada grupo es caracterizado por la distribución (respuesta categórica) o por la media (respuesta numérica) de la variable respuesta, el tamaño del grupo y los valores de las variables explicativas que lo definen. Gráficamente, el árbol se representa con el nodo raíz (los datos sin ninguna división) al iniciar y las ramas y hojas debajo (cada hoja es el final de un grupo).

Parada del desarrollo: calidad del nodo mediante la función de impureza

La función de impureza $i(t)$ es una medida que permite determinar la calidad de un nodo [171]. Existen varias medidas de impureza (criterios de partición) que nos permiten analizar varios tipos de respuesta. Las tres medidas más comunes de Breiman *et al.* [167], para la parada de los árboles de clasificación son el índice de Gini, el índice de Towing y el índice de desviación.

El índice de Gini es un algoritmo cuyo objetivo es encontrar el mejor fraccionamiento del árbol que produzca la máxima homogeneidad en los dos lados de la partición. La fórmula es la siguiente:

$$i(t) = \sum_{i \neq j} p(j|t) p(i|t)$$

El objetivo es encontrar la partición que maximice $\Delta i(t)$ en:

$$\Delta i = - \sum_{j=1}^k [p_j(t)]^2$$

Este es el índice más utilizado. En cada división el índice Gini tiende a separar la categoría más grande en un grupo aparte. El índice alcanza su valor mínimo cuando el nodo incluye solamente objetos de la misma clase (nodo puro).

El índice Towing, a diferencia del índice Gini, busca las dos clases que juntas formen más del 50% de los datos, esto define dos “súper categorías” en cada división para las cuales la impureza es definida por el índice Gini. Aunque el índice Towing produce árboles mas balanceados, este algoritmo trabaja más lento que la regla de Gini [167]. Para usar el índice Towing se selecciona la partición s , que maximice:

$$\frac{p_L p_R}{4} \left[\sum_j |p(j|t_L) - p(j|t_R)| \right]^2$$

Donde t_L y t_R representan los nodos hijos izquierdo y derecho respectivamente, p_L y p_R representan la proporción de observaciones en t que pasaron a t_L y a t_R en cada caso.

- El índice de desviación (Deviance) se define como:

$$i(t) = \sum_j p(j|t) \ln p(j|t)$$

El objetivo es encontrar la partición que maximice $\Delta i(t)$ en la ecuación:

$$\Delta i = - \sum_{j=1}^k p(j|t) \ln p(j|t)$$

Donde $j = 1, \dots, k$ es el número de clases de la variable respuesta categórica y $p(j|t)$ la probabilidad de clasificación correcta para la clase j en el nodo t .

Podar del árbol

El árbol obtenido generalmente produce sobreajuste y por tanto debe ser podado, cortando sucesivamente ramas o nodos terminales hasta encontrar el tamaño “adecuado” del árbol. Breiman et al. [167] introdujeron algunas ideas básicas para resolver el problema de seleccionar el mejor árbol. Computacionalmente el procedimiento descrito es complejo. Una forma de simplificarlo es buscar una serie de árboles anidados de tamaños decrecientes [172], cada uno de los cuales sea el mejor de todos los árboles de su tamaño. Los árboles pequeños son comparados para determinar el óptimo. Esta comparación está basada en una función de costo/complejidad, $R_\alpha(T)$:

$$R_\alpha(T) = R(T) + \alpha |\tilde{T}|$$

Donde:

- $R_\alpha(T)$ es el promedio de la suma de cuadrados entre los nodos, que puede ser la tasa del total de clasificaciones incorrectas o la suma de cuadrados de residuales total dependiendo del tipo de árbol.
- $|\tilde{T}|$ es la complejidad del árbol, definida como el número total de nodos del subárbol.

- α es el parámetro de complejidad. El parámetro α es un número real mayor o igual a cero. Cuando $\alpha = 0$ se tiene el árbol más grande y a medida que α se incrementa, se reduce el tamaño del árbol.

La función $R\alpha(T)$ siempre será minimizada por el árbol más grande, por tanto, se necesitan mejores estimaciones del error. Para esto Breiman propone obtener estimadores “honestos” del error por validación cruzada (CV). Computacionalmente el procedimiento es exigente pero viable, pues solo es necesario considerar un árbol de cada tamaño, es decir, los árboles de la secuencia anidada.

Selección del árbol óptimo

De la secuencia de árboles anidados es necesario seleccionar el árbol óptimo y para esto se requiere estimar con precisión el error de predicción y, en general, esta estimación se hace utilizando un procedimiento de validación cruzada.

El objetivo es encontrar la proporción óptima entre la tasa de error de clasificación y la complejidad del árbol, siendo la tasa de error de clasificación el cociente entre las observaciones mal clasificadas y el número total de observaciones. El procedimiento de validación cruzada puede implementarse de varias formas.

El uso de los árboles de clasificación implica las siguientes ventajas:

- a. Se obtiene conocimiento estructurado en forma de reglas de clasificación o de los valores de una variable. Esto facilita interpretar en un lenguaje llano la caracterización de las clases o los valores de una variable.
- b. Al ser un procedimiento de análisis no paramétrico (*distribution free procedure*) no se requiere validar supuestos distribucionales de probabilidad.
- c. Permite trabajar con todo tipo de variables predictoras: binarias, nominales, ordinales y de intervalo o razón.
- d. Se puede establecer probabilidad a priori de las clases.

1.11. APLICACIÓN DE MODELOS CUANTITATIVOS EN NIR-CI

A un píxel “puro”, es decir, perteneciente a una muestra de una sola especie animal, se le puede asociar un espectro puro y utilizarlo en el análisis cualitativo para discriminar distintas especies animales. Sin embargo, desde el punto de vista de la inspección y control de harinas y piensos que circulan a nivel mundial, hay que enfrentarse a harinas que no son puras, o bien por estar mezcladas en proporciones controladas con harinas de otras especies animales, o bien por tener trazas de otras harinas a causa de la contaminación cruzada.

La imagen hiperespectral de una harina “contaminada” y/o mezclada no puede ser tratada como la de una harina pura. En efecto, mientras que una harina de una sola especie puede ser considerada homogénea en toda su superficie, es decir, todos los píxeles pueden ser agrupados en una misma clase, en el caso de una mezcla hay que considerar que algunos píxeles pertenecen a la clase “harina pura 1”, otros a “harina pura 2” y otros, la mayoría según nuestra experiencia [173], a la clase “mezcla”. Además, existen varios tipos de píxeles de mezclas que varían según el porcentaje de mezcla en una determinada zona de la imagen. El desarrollo de modelos cuantitativos que permitan detectar el porcentaje de una determinada especie en una mezcla está limitado por el hecho de que no se puede asignar un valor de referencia a nivel de píxel. En NIR-CI, las aplicaciones cuantitativas son escasas y se basan, en su mayoría, en la asignación de valores obtenidos de un análisis discriminante a la imagen original [174], en el estudio de los histogramas, en la binarización de la imagen y en el uso de filtros matemáticos para estudiar los píxeles a una determinada λ [175]. Todas estas metodologías se basan en modelos cualitativos y, por tanto, la cuantificación es indirecta. Burger y Geladi [176] evalúan métodos de regresión utilizando el espectro medio de una imagen para crear el modelo que posteriormente se aplica a todos los píxeles de una imagen para la predicción. En el campo de la teledetección existen trabajos que describen métodos que tienen en cuenta la naturaleza “impura” de un píxel para la calibración. En este campo hay varios estudios sobre píxeles mixtos y su tratamiento [177, 178].

Históricamente las primeras determinaciones cuantitativas en espectroscopía NIR fueron realizadas para determinación de humedad en las muestras, gracias a las dos bandas de fuerte absorción de agua en 1450 y 1940 nm [179]. Estudios cuantitativos en harinas animales incluyen la determinación de aminoácidos [180], la cuantificación de la especie animal [181] y la detección y cuantificación de MBM en piensos [182], entre otros

Al conjunto de herramientas quimiométricas para construir un modelo cuantitativo se le llama Métodos de Calibración Multivariados, y se clasifican según se basen en métodos lineales o no lineales (Figura 17).

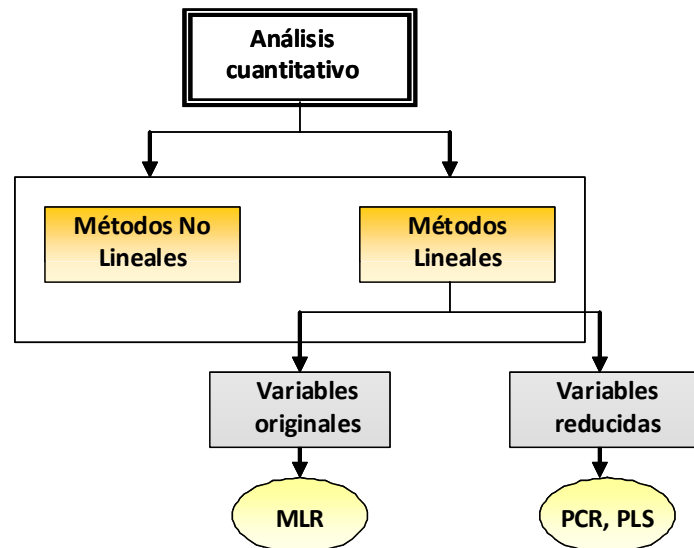


Figura 17. Clasificación general de los Métodos de Calibración Multivariados. Adaptado de [183].

1.11.1. REGRESIÓN POR MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES (PLS)

Los métodos de reducción de variables permiten condensar la información relevante en un nuevo número de variables inferior al original.

Entre estos métodos el PLS es una herramienta útil para resolver problemas de calibración cuando hay un número elevado de variables como es el caso de la espectroscopía NIR. Las nuevas variables, denominadas variables latentes (VLs) son combinaciones lineales de las variables originales. Durante la etapa de calibración el

algoritmo PLS utiliza tanto la información contenida en la matriz de los datos espectroscópicos (matriz X), como la información contenida en la matriz de datos de referencia (matriz Y). Teniendo en cuenta ambas informaciones, el método reduce el impacto de grandes pero irrelevantes variaciones en la matriz X en la calibración, buscando además la máxima variabilidad en la matriz X y la mayor correlación con la matriz Y [184]. El PLS realiza la regresión en un espacio ortogonal, evitando los problemas derivados de la colinealidad entre las variables. El objetivo de la calibración es obtener unos parámetros que permitan calcular la concentración en futuras muestras, de forma que, el residual (diferencia entre el valor de referencia y el predicho) de los datos calculados sea el menor posible. En base a esta información, se puede evaluar la capacidad de predicción del modelo. El objetivo es que las primeras VLs contengan la mayor información para la predicción de las muestras. La elección del número de VLs puede realizarse de diversas formas; una de las más extendidas es mediante la validación cruzada, procedimiento por el que el conjunto original se divide en varios grupos de forma que se utiliza un grupo para comprobar los resultados y el resto para construir el modelo, de forma que cada vez se deje un grupo fuera. El proceso se repite tantas veces como subgrupos se formen.

1.11.2. REGRESIÓN EN COMPONENTES PRINCIPALES (PCR)

El análisis PCR, también incluido en los métodos de reducción de variables, se divide en dos pasos. Primero, los datos espectrales están sometidos a tratamiento de Análisis por Componentes Principales (PCA). Luego, se aplica un MLR (ver apartado 1.11.3.) utilizando los *scores* del PCA como variables predictivas [185]. La ecuación de predicción se escribe como $Y_{muestra} = T_{muestra} \mathbf{b}$ donde \mathbf{T} representa las nuevas coordenadas (matriz de los *scores*), \mathbf{Y} muestra los valores de referencia y \mathbf{b} es el vector de coeficientes. El uso del PCR supone muchas ventajas, ya que el PCA elimina la colinealidad espectral. Sin embargo, no hay garantía de que los PCs calculados tengan relación con las propiedades estudiadas [186].

1.11.3. REGRESIÓN LINEAL MÚLTIPLE (MLR)

El MLR es un método cuantitativo que utiliza las variables originales, esto es, no realiza una reducción previa de los datos experimentales, sino que tras una selección de las variables espectrales, calcula la ecuación de regresión entre la señal (longitudes de onda) y la propiedad a determinar mediante un ajuste por mínimos cuadrados. La regresión permite establecer un enlace entre un número de longitudes de onda λ y una propiedad de las muestras. La predicción y_j de la propiedad estudiada puede ser descrita por la siguiente fórmula:

$$y_j = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i x_i + e_{i,j}$$

Donde b_i es el coeficiente calculado, x_i es la absorbancia por cada λ considerada y $e_{i,j}$ es el error. Cada λ es estudiada, una tras otra, y correlacionada con las propiedades estudiadas. La selección está basada en la habilidad predictiva de la λ . Los tres métodos de selección son: hacia adelante, hacia atrás, y paso a paso (*forward*, *backward*, *stepwise*). Cuando la correlación alcanza un valor fijado por el operador, esta se incluye en las λ s del modelo de calibración. Sucesivamente se calcula el modelo entre este conjunto de λ s de calibración y los valores de referencia de la propiedad estudiada [187].

1.12. APLICACIONES DE LA TECNOLOGÍA NIR-CI EN LA INDUSTRIA AGROALIMENTARIA

La evaluación de parámetros de calidad de los productos agroalimentarios ha sido siempre una gran preocupación en todos los procesos industriales, ya que los consumidores exigen la máxima calidad de los alimentos. El interés en la calidad es impulsado por la necesidad de proporcionar al consumidor productos de calidad alta y constante a un precio asequible. La alta calidad es un factor clave para la industria agroalimentaria moderna y es la base para el éxito en el mercado altamente competitivo de hoy.

Cuando la luz penetra en un material esta se altera dependiendo del paso óptico y de las diferencias en la absorbancia resultando una información química importante. Los enlaces absorben energía lumínica en determinadas longitudes de onda y esto permite determinar información sobre la composición de una muestra [188]. No obstante, los espectrómetros de un solo punto carecen de resolución espacial, puesto que se utiliza la medida de un solo punto que no aporta información de defectos, enfermedades o contaminaciones en un área determinada. Esto provoca que la espectroscopía clásica sea menos adaptada para la inspección de calidad basada en la apariencia con respecto a la más reciente NIR-CI. Las cámaras hiperespectrales permiten la adquisición de imágenes en múltiples longitudes de onda y proporcionan información tanto espectral como espacial.

Un examen exhaustivo de la literatura revela que la técnica NIR-CI ha sido aplicada a una amplia gama de productos agroalimentarios. Es evidente que NIRS ha simplificado y automatizado una gran variedad de tareas de rutina de inspección. Las cuatro principales esferas que se han visto beneficiadas por esta técnica son: control de calidad de cereales, manipulación posterior a la cosecha de frutas y hortalizas, contaminación en alimentación y calidad en productos de origen animal, seguridad alimentaria y autenticación.

En 2004 Cogill et al. [189] aplicaron la tecnología NIR-CI para determinar el contenido de humedad y el de aceite en un grano de maíz. Los resultados experimentales mostraban que NIR-CI puede ser útil para la medición de la humedad, pero su método no predijo correctamente el contenido de aceite. Sin embargo, los autores reconocieron que la incorrecta predicción de contenido de aceite fue debido a su método de referencia inexacto.

Lu y Peng estudiaron la firmeza del melocotón, utilizando la técnica de dispersión multiespectral [190]. Los autores utilizaron un sistema de imagen multiespectral push-broom (400-1000 nm) para determinar los perfiles de dispersión de melocotones en términos de blandura y firmeza. Los experimentos demostraron que los frutos blandos poseían un perfil más amplio de dispersión que los firmes y su diferencia era más pronunciada en 680 nm.

En otro documento de dos partes Peng y Lu montan un sistema de imagen multiespectral de LCTF basado adquisición de perfiles de dispersión de manzana para longitudes de onda entre 650 nm y 1000 nm [191, 192] Los resultados experimentales demostraron que la técnica de dispersión multiespectral de Vis/NIR es superior al NIRS convencional en la predicción de la firmeza de la fruta.

ElMasry et al. [193] probaron un sistema hiperespectral Vis/NIR (400-1000 nm) para determinar grado de humedad, sólidos solubles totales y acidez en fresas. Los modelos PLS mostraban buena exactitud en la predicción de los parámetros de calidad en fresa.

Qin y Lu [194] experimentaron sobre la detección de insectos en cerezas amargas usando la técnica de transmisión hiperespectral. Los clasificadores ANN dieron una buena predicción para cerezas infectadas que presentaban, a simple vista, el mismo tamaño, color y defecto. Según los autores, el estudio de imágenes de transmisión hiperespectral podría ser más efectivo que el espectro único en la detección de defectos en cereza.

Nicolai et al. [195] desarrollaron un sistema de imagen NIR para la detección de lesiones en manzanas. Liu et al. [196] desarrollaron un algoritmo para detectar lesiones debidas al frío en pepinos utilizando Vis/NIR-CI. Se constató que existe una gran diferencia espectral entre una superficie sana y una afectada por lesiones en la región de 700-850 nm. Una simple relación entre bandas (band ratio) seguida por un análisis PCA permitieron la detección de lesiones en la piel de la verdura.

Fernández Pierna et al. [197] desarrollaron un sistema combinado de SVM y NIR-CI para la detección de MBM en piensos compuestos. El NIR-CI combinado con PLS, ANN y SVM podía analizar rápidamente muchas muestras. Los modelos SVM superaron en exactitud los modelos PLS y ANN. Los resultados confirmaron que la tecnología NIR-CI combinada con técnicas de clasificación no lineal puede ser utilizada para certificar y cuantificar la presencia de MBM en piensos procesados. Qiao et al. [198] estudiaron parámetros de calidad de cerdo utilizando un sistema Vis/NIR-CI. Utilizaron los *scores* PCA como input para un clasificador ANN para discriminar los parámetros de RFN (reddish, firm, non-exudative) y RSE (reddish, soft and exudative). Se alcanzó un nivel

de exactitud del 85% (muestras correctamente clasificadas) basándose en los *scores* de los primeros 10 PCs.

Lawrence et al. [199] emplearon un sistema NIR-CI operativo en el rango 400–900 nm para detectar contaminación fecal y por ingesta en los cadáveres de aves de corral. Los resultados del experimento demostraron que la relación entre los valores de absorbancia de la imagen en 565 nm dividido por los valores de la imagen en 517 nm era la mejor opción mejor para la identificación de contaminantes, obteniendo una tasa de éxito de detección del 100% en su estudio.

En otro estudio llevado a cabo por Park et al. [200] se utilizaron la imagen producto de la relación $(I_{565 \text{ nm}}/I_{517 \text{ nm}})$ y las imágenes de la relación $(I_{576 \text{ nm}}-I_{616 \text{ nm}})/(I_{529 \text{ nm}}-I_{616 \text{ nm}})$ para identificar la superficies contaminadas por heces en cadáveres de aves de corral. La exactitud alcanzada fue del 96,4%.

Por su parte, Kim *et al.* [201] probaron la viabilidad de la detección de contaminación fecal de manzanas utilizando un sistema hiperespectral de reflectancia Vis/NIR hiperespectrales. Los resultados indicaron que la contaminación fecal puede identificarse utilizando tres longitudes de onda en las regiones del verde, del rojo y del NIR, o dos longitudes de onda en los extremos de la región NIR.

Las Tabla 4, 5 y 6 muestran los trabajos de los últimos 5 años más significativos sobre la aplicación de la tecnología NIR-CI al estudio de los productos agroindustriales, enseñando los parámetros estudiados, el producto y los resultados obtenidos.

Tabla 4. Principales aplicaciones de NIR-CI en fruta y verdura(página siguiente).

Capítulo 1. Revisión bibliográfica

Producto	Atributos	Rango espectral (nm)	Algoritmos	Resultados en validación (exactitud)	Año	Autor
Arándano	Detección de cuerpos extraños	400-720	Linear Discriminant Analysis (LDA), elección de 3 λ específicas	100%	2006	Tsuta et al. [202]
Arándano	Detección de hojas y tallos	1000-1400	LDA, selección de 2 λ	100%	2010	Sugiyama et al. [203]
Cereza amarga	Infestación por insectos	590-1550	Genetic Algorithm (GA) + Partial Least Square Discriminant Analysis (PLSDA)	95.7% (intacta) y 84.5% (infestada)	2008	Xing et al. [204]
Cebolla	Detección de bacteria	950-1650	Backpropagation Feedforward Neural Network (BPNN), 3 band ratios	85-90% SNV, 80-100% BPNN	2010	Wang et al. [205]
Champiñón	Defectos	400-1000	Principal Component Analysis (PCA)	90%	2008	Gowen et al. [206]
Champiñón	Humedad	400-1000	Partial Least Square Regression (PLS)	RMSEP=5.58%	2009	Taghizadeh et al. [207]
Cítricos pre-cosecha	Estado de madurez	369-1042	LDA	80-89%	2009	Okamoto y Lee [208]
Dátil	Tamaño y defectos en la piel	750-1200	Binarización+Connected Component Analysis	87.32%	2008	Lee et al. [209]

Capítulo 1. Revisión bibliográfica

Producto	Atributos	Rango espectral (nm)	Algoritmos	Resultados en validación (exactitud)	Año	Autor
Fresa	Humedad, sólidos solubles (TSS), acidez (pH)	400-1000	PLS+ Multiple Linear Regression (MLR) y Texture Analysis	$r^2=0.96$ (humedad), $r^2=0.85$ (TSS), $r^2=0.94$ (pH). 89.61% muestras correctamente clasificadas (madurez)	2007	ElMasry et al. [193]
Mandarina	Control de putrefacción	460-1020	LDA+Classification and Regression Tree (CART)	91%	2008	Gómez-Sanchis et al. [210]
Manzana	Eliminación de la variabilidad	430-900	Linear Equations utilizando mediana, luz UV-A	Disminución de la variabilidad de 55% a 5%	2006	Lefcote y Kim [211]
Manzana	Defectos	954-1350	PLS	Discriminación de defectos en la piel	2006	Nicolai et al. [195]
Manzana	Contaminación por heces	675-950	Band Ratio 725/811	Discriminación de contaminación por heces en la piel	2007	Liu et al. [212]
Manzana	Firmeza y sólidos solubles	500-1000	Backpropagation Feedforward Neural Network (BPNN) + PCA, modo dispersión (scattering)	$r^2=0.65$ (firmeza), $r^2=0.71$ (sólidos solubles)	2007	Lu [213]
Manzana	Firmeza y color	500-1040	PCA+ Artificial Neural Network (ANN), fluorescence, scattering	$r^2>0.75$	2007	Noh and Lu [214]

Capítulo 1. Revisión bibliográfica

Producto	Atributos	Rango espectral (nm)	Algoritmos	Resultados en validación (exactitud)	Año	Autor
Manzana	Firmeza y sólidos solubles	450-1000	Lorentzian Distribution Function, scattering	$r^2=0.89$ (firmeza), $r^2=0.88$ (sólidos solubles)	2008	Peng y Lu [215]
Manzana	Defectos	400-1000	ANN, selección de 5 λ	98.4%. $r^2=0.92$ set validación	2009	ElMasry et al. [216]
Manzana	Harinosidad	600-1000	PLSDA,scattering	$\geq 93\%$	2010	Huang y Lu [217]
Melocotón	Firmeza	500-1000	MLR, scattering	$r^2=0.67$	2006	Lu y Peng [192]
Pepino	Defectos	900-1700	Band Ratio 988/1025	82-93%	2006	Ariana et al. [218]
Pepino	Defectos	700-850	Band Ratio 818/756	superior al 90%	2006	Liu et al. [219]
Pera	Contenido en agua y azúcar	450-1000	PLS, selección de 5 λ + ANN	99% (agua), 94% (azúcar)	2007	Hong et al. [220]
Pomelo	Cáncer	450-930	Spectral Information Dicerence (SID)+ Correlation Analysis (CA), selección de 4 λ	93.3-96.7%	2010	Zhao et al. [221]
Tomate	Malas hierbas	385-810	Multivariate Bayesian Classifier	95%	2009	Staab et al. [222]

Tabla 5. Principales aplicaciones de NIR-CI en calidad de piensos y productos de origen animal

Producto	Atributos	Rango espectral (nm)	Algoritmos	Resultados en validación (exactitud)	Año	Autor
Ave	Contaminación por heces	400-1000	Band Ratio 565/517 + PCA	99%, 2.4% falsos positivos	2007	Heitschmidt et al. [223]
Ave	Contaminación por heces	400-900	Spectral Angle Mapper (SAM)	90.13%, STD=5.40%	2007	Park et al. [224]
Ave	Salubridad	400-1000	Fuzzy Logic+ Suppor Vector Machine (SVM)	99% salubres y 96% insalubres	2008	Chao et al. [225]
Ave	Fragmentos de hueso	400-1000	Nearest Neighbor Classifier, transmittancia+reflectancia	100% , falsos positivos=10%	2008	Yoon et al. [226]
Ave	Detección de tumor de la piel	447-951	Adaptative Branch and Bound + SVM, selección de 8λ	80%	2009	Nakariyakul y Casasent [227]
Bacalao salado	Humedad	760-1040	PLS	$r^2=0.92$, RMSECV=0.7%	2006	Wold et al. [228]
Cerdo	Nivel de veteado	430-1000	PCA+Feed Forward Neural Network	75-85%	2007a	Quiao et al. [229]
Cerdo	Color, textura y exudación	430-980	PCA (pretratamiento 1ª derivada)	87.5%	2007b	Quiao et al. [197]

Producto	Atributos	Rango espectral (nm)	Algoritmos	Resultados en validación (exactitud)	Año	Autor
Langostino	Efectos de aditivos alimentarios sobre la fibra muscular	1000-1600	$\lambda=1500$ nm	100% en cuantificación de la absorción de agua	2009	Sugiyama et al. [230]
Leche	Grasa	530-900	Non Linear Curve Fitting algorithm	99%	2007	Qin y Lu [231]
Pescado blanco	Parásitos nematodos	350-950	PLSDA, modo transmisión	100% hasta una profundidad de 0.8 cm	2007	Heia et al. [232]
Pescado	Contenido en lípidos y humedad	460-1040	PLS	$r^2=0.94$, RMSECV=2.99	2008	ElMasry y Wold [233]
Piensos	Detección de MBM	419-892	LDA	$r^2=0.85$	2010	Nansen et al. [234]
Piensos compuestos	Detección de PAPs	900-1700	SVM+OPTICS	99%	2010	Fernandez Pierna et al. [235]
Tenera	Terneza	496-1036	Stepwise Regression	$r^2=0.67$	2008	Cluff et al. [236]
Tenera	Terneza	900-1700	PLS+Texture Analysis	77%	2008	Naganathan et al. [237]
Cereales	Detección de cáscaras y paja	400-900	Genetic Algorithm (GA) para la selección 5 λ específicas+PLSDA	RMSECV=0.26	2009	Wallays et al. [238]

Producto	Atributos	Rango espectral (nm)	Algoritmos	Resultados en validación (exactitud)	Año	Autor
Maíz	Tamaño del grano y discriminación entre variedades	435-789	LDA	81-96%	2008	Nansen et al. [239]
Maíz	Distinción entre variedades con diferente dureza	960-1662 y 1000-2498	PCA + PLSDA	RMSEP=0.18% y 0.29%	2009	Williams et al. [240]
Trigo duro	Vitrosidad	650-1100	Factorial Discriminant Analysis (FDA)	94%	2006	Gorretta et al. [241]
Trigo	Defectos	420-2500	Penalized Discriminant Analysis (PDA)	95%	2007	Berman et al. [242]
Trigo	Discriminación entre variedades	960-1700	LDA+Quadratic Discriminant Analysis (QDA)	94-100%	2008	Mahesh et al. [243]
Trigo	Discriminación entre variedades	960-1700	Texture analysis + BPNN	99%	2008	Choudhary et al. [244]
Maíz	Contaminación por Aflatoxina	400-1000	SAM, fluorescence analysis	86-88%	2010	Yao et al. [245]

Tabla 6. Principales aplicaciones de NIR-CI en seguridad y trazabilidad de alimentos.

Producto	Atributos	Rango espectral (nm)	Algoritmos	Resultados en validación (exactitud)	Año	Autor
Productos alimentarios	Detección de Aspergillus Flavus	400-1000	PCA + GA + SVM comparando luz halogena y luz UV	95% usando luz UV	2009	Jin et al. [246]
Productos alimentarios	Detección de Campylobacter	400-900	Band Ratio 426/458	97-99%	2010	Yoon et al. [247]
Productos alimentarios	Detección de hongos toxigénicos	400-1000	Maximum Likelihood classifier	97.7 y 71.5%	2008	Yao et al. [248]
Tabaco	Detección material extraño en la línea de producción	400-1000	Fisher LDA	92.87%	2008	Garcia-Allende et al. [249]
Té	Discriminación entre calidades diferentes	450-1000	SVM	95%	2009	Zhao et al. [250]

Un estudio de las aplicaciones reflejadas en las Tablas 4, 5 y 6 permite obtener las siguientes conclusiones:

- Las aplicaciones más abundantes utilizan sensores que abarcan el rango espectral 400 – 1000 nm. Pocas aplicaciones cubren el rango 900 – 1700 nm y muy pocas (solamente dos) utilizan todo el rango del infrarrojo cercano.
- Las aplicaciones más abundantes en productos agroalimentarios corresponden al análisis de fruta y verdura.
- Con respecto a los atributos estudiados, los más abundantes son la detección de defectos, insectos e imperfecciones. Todos estos tipos de análisis implican el uso de algoritmos discriminantes.
- Entre los algoritmos utilizados existe una amplia gama (más de 20 métodos diferentes), siendo más frecuente el uso de métodos lineales (LDA, PCA, PLSDA).
- El número de trabajos que muestran el uso de análisis cuantitativos es limitado con respecto al número total de estudios.
- Entre los últimos avances de la tecnología NIR-CI en el campo de la seguridad alimentaria cabe destacar la detección de patógenos intestinales como la Salmonella en menos de 24h según un estudio del Servicio de Investigaciones Agrícolas de Estados Unidos (USDA) [251] .La innovación es realmente importante en materia de seguridad alimentaria. Hasta hoy distinguir un microorganismo Campylobacter de un no-Campylobacter era difícil al ser muy parecidos. Por eso, son una de las principales causas de intoxicación bacteriana en personas.

Esto, junto con los otros estudios publicados hasta ahora, demuestra que la tecnología NIR-CI tiene un gran potencial no solamente en el campo de la seguridad alimentaria sino también en el aseguramiento de la calidad.

1.13. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Cunningham, E.P., ed. (2003). After BSE – a future for the European livestock sector. Publicación de la Federación Europea de Zootecnia n.º 108. Wageningen (Países Bajos), Academic Publishers.].
- [2] CE (2004). Questions and Answers on Animal By-Products. MEMO/01/107. Brussels, 6 May 2004.
- [3] Hamilton, C.R. (2002). Real and perceived issues involving animal proteins. Proceedings of an expert consultation on alternative protein source for the animal feed industry. FAO, Rome].
- [4] National Renderers Association. (2003). A Buyer's Guide to Rendered Products, 15-16
- [5] Hamilton, C.R. (2004). Real and Perceived Issues Involving Animal Proteins. In Protein Sources for the Animal Feed Industry. Expert Consultation and Workshop. Bangkok. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. pp. 255-276.]
- [6] Meeker DL (ed). (2006). Essential Rendering: All About The Animal By-Products Industry. Arlington, VA: National Renderers Association. p 95–110]
- [7] AAFCO (2006) Feed Manufacturing Guidance OP pp 204 - 218)
- [8] CHAPTER 2.7.13. Scrapie.
- [9] http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.07.13_SCRAPIE.pdf. Visitado el 4 de mayo de 2011
- [10] Kimberlin, R.H. (1990). Scrapie and possible relationships with viroids. Sem. Virol. 1:153- 162.
- [11] WHO-World Health Organization. (1996). Report of a WHO consultation on public health issues related to human and animal transmissible spongiform encephalopathies. With the participation of FAO and OIE. Geneva: World Health Organization.
- [12] CE (1994). Decisión de la Comisión 94/381/CE sobre las medidas de protección contra la BSE y la utilización como alimento de proteínas derivada de mamíferos. Diario Oficial No L172 07.07.1994, pp. 0023-0024.

- [13] CE (2001). Reglamento No 999/2001 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de mayo de 2001, por el que se establecen disposiciones para la prevención, el control y la erradicación de determinadas encefalopatías espongiformes transmisibles.
- [14] EFSA (2010). Question No EFSA-Q-2010-01487, issued on 17 December 2010.
- [15] CE (2002). Reglamento No 1774/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo de 3 de octubre de 2002 por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales no destinados al consumo humano.
- [16] CE (2003). Reglamento No 1234/2003 de la Comisión, de 10 de julio de 2003, por el que se modifican los anexos I, IV y XI del Reglamento (CE) nº 999/2001 del Parlamento Europeo y del Consejo y el Reglamento (CE) nº 1326/2001 en lo que respecta a las encefalopatías espongiformes transmisibles y a la alimentación animal.
- [17] CE (2005). Reglamento No 1292/2005 de la Comisión, de 5 de agosto de 2005, por el que se modifica el anexo IV del Reglamento (CE) no 999/2001 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que respecta a la alimentación animal.
- [18] CE (2008) Reglamento No 956/2008 de la Comisión de 29 de septiembre de 2008 que modifica el anexo IV del Reglamento (CE) n 999/2001 del Parlamento Europeo y del Consejo, por el que se establecen disposiciones para la prevención, el control y la erradicación de determinadas encefalopatías espongiformes transmisibles.
- [19] TAFS (2010). Position Paper on Relaxation of Feed Ban in the EU. TAFS, Berne.
- [20] AOAC (1998). Int. AOAC official method 964.07. Microscopy of Animal Feed. 1998. Association of Official Analytical Chemists. Gaithersburg, MD.
- [21] .CE (1998) No 88/1998 — European Communities (Export and Import of Certain Dangerous Chemicals) (Pesticides) (Enforcement) (Amendment) Regulations.
- [22] CE (2003). Commission Directive EC/126/2003 on the analytical method for the determination of constituents of animal origin for the official control of feedstuffs. Off J Eur union L 339: 78–84.

- [23] CE (2009). Commission Directive EC/152/2009 methods of analysis for the determination of constituents of animal origin for the official control of feed. *Off J Eur Union* L54: 103–107.
- [24] Van Raamsdonk LWD, Zegers J, Van Cutsem J, Bosch J, Pinckaers V, Jorgenson JS, Frick G, Paradies-Severin I. (2005). Microscopic detection of animal by-products in feed (WP3). EUR 21124 Strategies and methods to detect and quantify mammalian tissues in feedingstuffs, Luxembourg: European Commission.
- [25] Liu, X., Han, L., Veys, P., Baeten, V., Jiang, X. and Dardenne, P. (2010), An overview of the legislation and light microscopy for detection of processed animal proteins in feeds. *Microscopy Research and Technique*, n/a. doi: 10.1002/jemt.20951.
- [26] Engling FP, Jorgenson JS, Paradies Severin I, Hahn H. (2000). Evidence of animal meal in feeds. *Kraftfutter Feed Magazine* 1: 14–17.
- [27] Van Raamsdonk L.W.D., Hekman W.E., Vliege J.J.M., Pinckaers V.G.Z., van Ruth S.M., van der Voet H. (2008). The 2008 Dutch NRL/IAG proficiency test for detection of animal proteins in feed. Wageningen, The Netherlands: RIKILT.
- [28] Veys P., Baeten V. (2007). CRL-AP Proficiency test 2007 final report. Gembloux, Belgium: CRA-W.
- [29] Garrido-Varo A., Fernandez V. (1998). NIRS technology for the quantitative prediction of the percentage of meat and bone meal added to a feed compound. A feasibility study. In: Jorgensen JS, editor. *Dans Report of the Workshop Identification of animal ingredients in compound feeds*, CEMA-DG VI-SMT Program, May 26, Lyngby, Denmark.
- [30] Piraux F, Dardenne P. (1999). Feed authentication by near-infrared microscopy. In: Davies AMC, Giangiacomo R, editors. *Proceedings of the 9th International Conference on Near Infrared Microscopy*, Verona, Italy.
- [31] Baeten V, von Holst C, Garrido A, Vancutsem J, Michotte Renier A, Dardenne P. (2005). Detection of banned meat and bone meal in feedstuffs by near-infrared microscopic analysis of the dense sediment fraction. *Anal Bioanal Chem* 382:149–157.

- [32] Murray, I., Garrido-Varo, A., Pérez-Marín, D., Guerrero, J.E., Baeten, V., Dardenne, P., Termes, S., Zegers J., Frankhuizen, R. (2005). Macroscopic near-infrared reflectance spectroscopy (WP5), In Stratfeed. Strategies and methods to detect and quantify mammalian tissues in feedingstuffs, Office for Official publications of the European Communities .
- [33] SAFEED. Processed animal proteins detection of presence of species-specific processed animal proteins in animal feed, <http://safeedpap.feedsafety.org>, (17.11.08).
- [34] Baeten, V. (2007). CRL-AP and SAFEED-PAP: Two European initiatives to help remove the animal protein feed ban. Lecture in: EFRA CONGRESS 2007, Marbella – Spain, 7 June 2007.
- [35] Ansfield, M, Reaney, S. D., Jackman, R. (2000). Performance assessment and validation of a sensitive immunoassay for detection of ruminant and porcine heat stable proteins in compound animal feedstuffs. *Food Agric. Immunol.*, 12, 285-297.
- [36] Fumière O, Dubois M, Baeten V, von Holst C, Berben G. (2006). Effective PCR detection of animal species in highly processed animal byproducts and compound feeds. *Anal Bioanalytical Chem* 385:1045–1054.
- [37] Boix A, von Holst C, Baeten V, Berben G, Vancutsem J. 2004. Determination of processed animal proteins (PAPs) including meat and bone meal (MBM) in feed. European Commission, DG Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements, Geel, Belgium, pp 2440.
- [38] Klein F, Lupo T, Pielack D, Mozola M. (2005). Validation study of a lateral- flow immunoassay for detection of ruminant by-product material in animal feeds and feed ingredients. *J AOAC Int* 88:1583– 1592.
- [39] Myers MJ, Yancy HF, Farrell DE, Washington JD, Frobish RA. 2005. Evaluation of two commercial lateral-flow test kits for detection of animal proteins in animal feed. *J Food Prot* 68:2656–2664.
- [40] Sambrook J., Russel, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed. edición). Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- [41] Aarts HJM, Bouw EM, Buntjer JB, Lenstra JA, van Raamsdonk LWD. (2006). Detection of bovine meat and bone meal in animal feed at level of 0.1%. *J AOAC Int* 89:1443–1446.
- [42] Krcmár P., Rencová E., (2005). Quantitative detection of species-specific DNA in feedstuffs and fish meals. *J. Food Protect.*, 68(6), 1217-1221.
- [43] Mendoza-Romero, L., Verkaar, ELC. Savelkoul, PH. Catsburg, A. Aarts, HJM. Buntjer, JB. y Lenstra, JA. (2004). Real-time PCR detection of ruminant DNA. *J. Food Prot.* 67:550-554.
- [44] Rensen, G., Smith, W. Ruzante, J. Sawyer, M. Osburn, B. y Cullor, J. (2005). Development and evaluation of a real-time fluorescent polymerase chain reaction assay for the detection of bovine contaminants in cattle feed. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2:152-159.
- [45] Garrido, A., Pérez-Marín, M.D., Guerrero, J.E., Gómez, A., De Paz, F., Delgado, N., (2002). Near infrared reflectance spectroscopy as an essential tool in food safety programmes: predicting ingredients in commercial compound feed. In: Davies, A.M.C., Cho, R.K. (Eds.), *Proceedings of the 10th International Conference on Near Infrared Spectroscopy*. NIR Publications, Chichester, West Sussex, UK, pp. 145–150.
- [46] Fernández, M., Martínez, A., Modroño, S., De la Roza B., (2002). Near infrared reflectance spectroscopy as a tool to predict qualitative and quantitative meat and bone meal presence in compound feed. In: Davies, A.M.C., Cho, R.K. (Eds.), *Proceedings of the 10th International Conference on Near Infrared Spectroscopy*. NIR Publications, Chichester, West Sussex, UK, pp. 307–312.
- [47] Murray, I., Aucott, L.S. and Pike, I.H., (2001). Use of discriminant analysis on visible and near infrared reflectance spectra to detect adulteration of fishmeal with meat and bone meal. *J. Near Infrared Spectrosc.* 9, pp. 297–311.
- [48] Garrido-Varo, A. (2006). La spectroscopie proche infrarouge: une technologie d'appui pour un service intégral en alimentation animale. In *La Spectroscopie Infrarouge et Ses Applications Analytiques (Chapter 20)*, 2nd Ed., (D.Bertrand and E.Dufour, eds.) pp. 473–496, TEC & DOC, Collection Sciences & Techniques Agroalimentaires, París, France.

- [49] Pérez-Marín, D., Garrido-Varo, A., Guerrero, J.E. And Gómez, A. (2004). Near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for the mandatory labelling of compound feedingstuffs: Chemical composition and open-declaration. *Anim. Feed Sci. Technol.* 116, 333–349.
- [50] Pérez-Marín, D., Garrido-Varo, A. And Guerrero, J.E. (2006). Remote NIRS instrument cloning and transfer of calibrations to predict ingredient percentages in unground compound feedingstuffs. *J. Near Infrared Spectrosc.* 14, 81–91.
- [51] Murray, I., Dardenne, P., Baeten, V., Garrido-Varo, A. (2005). Strategies and methods to detect and quantify mammalian tissues in feedstuffs: A summary of the EU STRATFEED project (G6RD-2000-CT-00414). In *Recent Advances in Animal Nutrition 2004* (P.C.Garnsworthy and J.Wiseman, eds.) pp. 89–106, Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- [52] <http://www.consumer.es/seguridadalimentaria/2008/06/13/177764.php>
- [53] Gizzi, G., Van Raamsdonk, L.W.D., Baeten, V., Murray, I., Berben, G., Brambilla, G. And Von Holst, C. (2003). An overview of tests for animal tissues in feeds applied in response to public health concerns regarding bovine spongiform encephalopathy. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 22(1), 311–331.
- [54] Boix A. et al., (2004). Determination of Processed Animal Proteins (PAPs) including meat and bone meal (MBM) in feed. Part I: Intercomparison study for the determination of PAPs in feed using microscopy. Part II: Prevalidation study for the detection of PAPs in feed by immunoassays. Geel, Belgium: JRC-IRMM.
- [55] Von Holst C. et al., 2008. Transferability study of a nearinfrared microscopic method for the detection of banned meat and bone meal in feedingstuffs. *Anal. Bioanalytical Chem.*, 392, 313-317.
- [56] Pérez-Martin M.D. et al., 2004. Detection and quantification of mammalian meat and bone meal in compound feedingstuffs using NIR. In: Davies A.M.C. & Garrido-Varo A., eds. *Proceedings of the 11th International conference on near infrared spectroscopy*, April 6-11, 2003, Cordoba, Spain. Chichester, UK: NIR Publications, 667-671.

- [57] De la Haba M.J. et al., (2007). Discrimination of fish bones from other animal bones in the sedimented fraction of compound feeds by near infrared microscopy (NIRM). *J. NIRS*, 15, 81-88.
- [58] De la Haba M.J., Garrido-Varo A., Pérez-Marín D.C. & Guerrero J.E., (2007). Near infrared analysis as a first-line screening technique for identifying animal species in rendered animal by-products meals. *J. Near Infrared Spectrosc.*, 15, 237-245.
- [59] Garrido-Varo, A., Pérez-Marín, M.D., Guerrero-Ginel, J.E., Gómez-Cabrera, A., Bautista J., de la Haba M.J. et al., (2005). Near infrared spectroscopy for enforcement of European Legislation concerning the use of animal by-products in animal feeds, *Biotechnology Agronomy Society and Environment* 9 (1), 3–9.
- [60] Piraux F., Dardenne, P. (2000). Microscopie-NIR appliquée aux aliments du bétail, *Biotechnology Agronomy Society and Environment* 4 (4), pp. 226–232.
- [61] De la Roza-Delgado, B., Soldado, A., Martínez-Fernández, A. Vicente, F. Garrido-Varo, A., Pérez –Marín, D. et al., (2007) Application of near-infrared microscopy (NIRM) for the detection of meat and bone meals in animal feeds: A tool for food and feed safety, *Food Chemistry* 105, 1164–1170.
- [62] Fernández-Ibáñez, M.V., Soldado, A., Vicente, F., Martínez-Fernández A., and de la Roza-Delgado, B. (2008). Particle size optimisation in development of near infrared microscopy methodology to build spectral libraries of animal feeds, *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 16, 43–48.
- [63] Fernández-Ibáñez, V., Fearn, T., Soldado A., de la Roza-Delgado B. (2010) Development and validation of near infrared microscopy spectral libraries of ingredients in animal feed as a first step to adopting traceability and authenticity as guarantors of food safety. *Food Chemistry* Volume 121, Issue 3, 871-877.
- [64] Wang, H., Babacan, S.D., Sayood, K. (2007). Lossless hyperspectral-image compression using context-based conditional average. *IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing* 45 (12), 4187-4193.
- [65] Goetz, A. F. H., Vane, G., Solomon, T. E. and Rock, B. N., (1985). Imaging spectrometry for earth remote sensing. *Science*, 228, 1147-1153.

- [66] Hege, E., O'Connell, D., Johnson, W., Basty, S. and Dereniak, E., (2003). Hyperspectral imaging for astronomy and space surveillance. *Proceedings of the SPIE*, 5159, 380-391.
- [67] Smail, V., Fritz, A. and Wetzel, D., (2006). Chemical imaging of intact seeds with NIR focal plane array assists plant breeding. *Vibrational Spectroscopy*, 42(2), 215-221.
- [68] Monteiro, S., Minekawa, Y., Kosugi, Y., Akazawa, T. and Oda, K., (2007). Prediction of sweetness and amino acid content in soybean crops from hyperspectral imagery. *ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing*, 62(1), 2-12.
- [69] Lyon, R.C., Lester, D.S., Lewis, E.N., Lee, E., Yu, L.X., Jefferson E.H., Hussain, A.S (2002). Near-infrared spectral imaging for quality assurance of pharmaceutical products: analysis of tablets to assess powder blend homogeneity, *AAPS PharmSciTech* 3 (3), 17.
- [70] Rodionova, O., Houmøller, L., Pomerantsev, A., Geladi, P., Burger, J., Dorofeyev, V., Arzamastsev, A. (2005) NIR spectrometry for counterfeit drug detection: a feasibility study, *Analytica Chimica Acta* 549 (1-2), 151-158.
- [71] Roggo, Y., Edmond, A., Chalus, P., Ulmschneider, M. (2005). Infrared hyperspectral imaging for qualitative analysis of pharmaceutical solid forms, *Analytica Chimica Acta* 535 (1-2), 79-87.
- [72] Ferris, D., Lawhead, R., Dickman, E., Holtzapple, N., Miller, J., Grogan, S., et al. (2001). Multimodal hyperspectral imaging for the noninvasive diagnosis of cervical neoplasia. *Journal of Lower Genital Tract Disease*, 5(2), 65e72.
- [73] Kellicut, D., Weiswasser, J., Arora, S., Freeman, J., Lew, R., Shuman, C., et al. (2004). Emerging technology: hyperspectral imaging. *Perspectives in Vascular Surgery and Endovascular Therapy*, 16(1), 53e57.
- [74] Zheng, G., Chen, Y., Intes, X., Chance, B., & Glickson, J. D. (2004). Contrast-enhanced near-infrared (NIR) optical imaging for subsurface cancer detection. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 8(9), 1106e1117.
- [75] Baeten, V., Dardenne, P. (2005). Applications of near-infrared imaging for monitoring agricultural food and feed products', in Rohit Bhargava, Ira Levin (Eds.), *Spectrochemical analysis using infrared multichannel detectors*.

- [76] Fernandez Pierna, J.A., Baeten, V., Dardenne, P.(2006) Screening of compound feed using NIR hyperspectral data, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 84 , 114–118.
- [77] Nansen, C., Herrman, T., Swanson, R. (2010). Machine vision detection of bonemeal in animal feed samples. *Applied Spectroscopy* 64 (6), 637-643.
- [78] Skoog, D. A., Holler, F. J. and Nieman, T. A. (2001) *Principios de análisis instrumental*, 5ª ed., McGraw-Hill.
- [79] Workman Jr., J.J. (1999) Review of process and non-invasive near infrared spectroscopy: 1993-1999. *Appl.Spectrosc. Reviews* 34, 1-89.
- [80] Goddu, R.F. and Delker, D.A. (1960) Spectra-Structure Correlations for Near-Infrared Region. *Anal. Chem.*, 32, 140-141.
- [81] Ciurczak, E.W. (2001) *Principles of Near-Infrared Spectroscopy*. In Burns, D.A.
- [82] Simpson, M.B. (2005) *Near-Infrared Spectroscopy for Process Analytical Chemistry: Theory, Technology and Implementation*. In Bakeev, K. (ed), *Process Analytical Technology*, Blackwell Publishing, Oxford, pp 39-41.
- [83] Gaitán Jurado, A. J. (2009). *Aportaciones de la tecnología nirs a la calidad de productos agroalimentarios*. Universidad de Córdoba.
- [84] ElMasry, G., Sun, W. (2010). *Principles of Hyperspectral Imaging Technology*, In: Professor Da-Wen Sun, Editor(s), *Hyperspectral Imaging for Food Quality Analysis and Control*, Academic Press, San Diego, 2010, Pages 3-43.
- [85] Shaw, G., y Manolakis, D. (2002). Signal processing for hyperspectral image exploitation. *IEEE Signal Processing Magazine*, 19(1), 12–16.
- [86] Lawrence, K. C., Park, B., Windham, W. R., & Mao, C. (2003). Calibration of a pushbroom hyperspectral imaging system for agricultural inspection. *Transactions of the ASAE*, 46(2), 513–521.
- [87] Harthcock M. A., Atkin, S. C. (1998). Imaging with Functional Group Maps Using Infrared Microspectroscopy, *Applied Spectroscopy*, 42, p. 449-455.
- [88] Liu, Z., Yu, H., MacGregor, J. F. (2007). Standardization of line-scan NIR imaging systems, *Journal of Chemometrics*, 21, 88-95.
- [89] Tran, C. D. (2003). *Infrared Multispectral Imaging: Principles and Instrumentation*, *Applied Spectroscopy Reviews*, 38, 133-153.

- [90] Treado, P. J., Levin I. W., Lewis, E. N. (1994). Indium Antimonide (InSb) Focal Plane Array (FPA) Detection for Near-Infrared Imaging Microscopy, *Applied Spectroscopy*, 48, 607-615.
- [91] Joon Oh, S., Koenig, J. L. (1998). Phase and Curing Behavior of Polybutadiene/Diallyl Phthalate Blends Monitored by FT-IR Imaging Using Focal-Plane Array Detection. *Anal. Chem.*, 1998, 70 (9), pp 1768–1772.
- [92] Lewis, N. E., Kidder, L. H., Arens, J. F., Peck, M. C., Levin, I.W. (1997). Si:As Focal-Plane Array Detection for Fourier Transform Spectroscopic Imaging in the Infrared Fingerprint Region, *Appl. Spectrosc.* 51, 563-567.
- [93] Treado P. J., Nelson, M. P. (2002). Raman imaging in *Handbook of vibrational spectroscopy*, J. M. Chalmers and P. R. Griffiths, Volume 2, John Wiley & Sons, London, 1429- 1459.
- [94] <http://www.kodak.com/global/plugins/acrobat/en/business/ISS/supportdocs/chargeCoupledDevice.pdf>. Visitada el 6 de septiembre de 2009.
- [95] Amigo, J.M., (2010) Practical issues of hyperspectral imaging analysis of solid dosage forms. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* Volume 398, Number 1, 93-109.
- [96] Ravn C (2009) Near-infrared chemical imaging in formulation development of solid dosage forms. PhD thesis, University of Copenhagen.
- [97] Clark D, Henson MJ, LaPlant F, Sasic S, Zhang L (2007) In: Pivonka DE, Chalmers JM, Griffiths PR (eds) *The handbook of vibrational spectroscopy, applications in life, pharmaceutical and natural sciences, pharmaceutical applications*. Wiley, Hoboken, pp 1–27.
- [98] Gowen AA, O'Donnell CP, Cullen PJ, Bell SEJ (2008) *Eur J Pharm Biopharm* 69:10–22.
- [99] Goetz, A. F. H. (2000). Short course in hyperspectral imaging and data analysis. In J. W. Boardman (Ed.), *Center for the Study of Earth from Space*. Boulder, CO: University of Colorado.
- [100] Peleg, K., Anderson, G.L., Yang, C. (2005). Repeatability of hyperspectral imaging - systems quantification and improvement. *International Journal of Remote Sensing*. 26(1):115-139.

- [101] Anderson, G.L., Peleg, K. (2007). Quantification and reduction of erroneous differences between images in remote sensing. *Environmental and Ecological Statistics* Volume 14, Issue 2, 113-127.
- [102] Driver, R.D. (2009). Quantification and threshold detection in real-time hyperspectral imaging. In: *Sensing for Agriculture and Food Quality and Safety*, Moon S. Kim; Shu-I Tu; Kaunglin Chao, Editors.
- [103] Choudhary, R., Mahesh, S., Paliwal, J., Jayas, D. S. (2009). Identification of wheat classes using wavelet features from near infrared hyperspectral images of bulk samples. *Biosystems engineering* 102, 115-127.
- [104] Rogalski, A., Chrzanowski, K. (2002). Infrared devices and techniques. *Opto-Electronics Review*, 10(2), 111-136.
- [105] Malvern Instrument. *MatrixNIR Operations Manual* (2005). Onley, MD, USA.
- [106] Martínez M.L.; Garrido A.; De Pedro E.J. And Sánchez L. (1998). Effect of sample heterogeneity on NIR meat analysis: the use of the RMS statistic. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 6: 313-320.
- [107] Rosales, M. (1993). *Uso de la información espectroscopica NIRS "per se" en la evaluación de la calidad de los productos agrícolas*. TPFCA. Universidad de Córdoba.
- [108] Vidal-Bello, M. J. (2011). *Desarrollo y puesta a punto de nuevas estrategias de muestreo para productos a granel usados en alimentación animal, basada en la espectroscopía del infrarrojo cercano (NIRS)*. TPFCA. Universidad de Córdoba.
- [109] Nansen, C., Kolomiets, M., Gao, X. (2008). Considerations Regarding the Use of Hyperspectral Imaging Data in Classifications of Food Products, Exemplified by Analysis of Maize Kernels. *J. Agric. Food Chem.* 56, 2933–2938.
- [110] Baghzouz, M.; Devitt, D. A.; Morris, R. L. (2006). Evaluating temporal variability in the spectral reflectance response of annual ryegrass to changes in nitrogen applications and leaching fractions. *Int. J. Rem. Sens.*, 27, 4137–4157.
- [111] Peleg, K.; Anderson, G. L.; Yang, C. (2005). Repeatability of hyperspectral imaging systems quantification and improvement. *Int. J. Rem. Sens.*, 26, 115–139.
- [112] Nansen C., Abidi, N., Sidumo, A. J., Hosseini Gharalari, A. (2010). Using Spatial Structure Analysis of Hyperspectral Imaging Data and Fourier Transformed

- Infrared Analysis to Determine Bioactivity of Surface Pesticide Treatment. *Remote Sens.*, 2(4), 908-925.
- [113] Nansen, C., Sidumo, A.J., Capareda, S. (2010). Variogram analysis of hyperspectral data to characterize the impact of biotic and abiotic stress of maize plants and to estimate biofuel potential. *Applied Spectroscopy*, 64, 6, 627-636.
- [114] Nansen, C., Herrman, T., Swanson, R. (2010). Machine vision detection of bonemeal in animal feed samples. *Applied Spectr.*, 64, 6.
- [115] Anderson, G.L., Peleg, K. (2007). Quantification and reduction of erroneous differences between images in remote sensing. *Environ. Ecol. Stat.*, 14: 113-127.
- [116] Delwiche, S. R., Chen, Y., Hruschka, W. R. (1995). Differentiation of hard red wheat by near-infrared analysis of bulk samples. *Cereal Chem.*, 72, 243-247.
- [117] Neil Lewis E. Neil, Kidder, L.H., Lee, E (2006) NIR Chemical Imaging as a Process Analytical Tool Innovations in Pharmaceutical Technology issue, 17.
- [118] Gowen, A.A., O'Donnell, C.P., Cullen, P.J., Downey, G., and Frias, J.M.(2007). Hyperspectral imaging-an emerging process analytical tool for food quality and safety control. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 590-598.
- [119] Taghizadeh, M., Gowen, A. and O'Donnell, C.P. (2009). Prediction of white button mushroom (*Agaricus bisporus*) moisture content using hyperspectral imaging. *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety*, 3, 4, 219-226.
- [120] Rutledge, H.T. and Reedy, B. (2009). Classification of heterogeneous solids using infrared hyperspectral imaging. *Applied Spectroscopy*, 63, 2.
- [121] Stanimirova, A and Walczak, B. (2008) Classification of data with missing elements and outliers, *Talanta* Volume 76, Issue 3, Pages 602-609.
- [122] De Maesschalck, R., Jouan-Rimbaud, D., Massart D. L. (2000). The Mahalanobis distance. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, Volume 50, Issue 1, 4, 1-18.
- [123] Kennard, R.W. and Stone, L.A. (1969). Computer aided design of experiments. *Technometrics* 11, 137-148.

- [124] Massart, D.L. Vandeginste, B.G.M. Buydens, L.M.C. De Jong, S.P. Lewi J. and Smeyers-Verbeke, S. (1997) In: B.G.M. Vandeginste and S.C. Rutan, Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A, Elsevier pp. 1-20.
- [125] Geladi, P. & Esbensen, K. 1990. The Start and Early History of Chemometrics: Selected Interviews, Part 1. Journal of Chemometrics 4; 337-354.
- [126] Bautista, M. (2009). Avances en la aplicación de la Espectroscopia NIR en la industria Farmacéutica. Introducción a pat y Técnicas de imagen. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona.
- [127] Barnes, R. J. Dhanoa M. S. y Lister, S. (1988). J. Appl. Spectrosc., 113, 1849.
- [128] Fernández Cabanas, V. (2003) Métodos de procesamiento de la señal espectroscópica NIRS: Aplicación al análisis cuantitativo y cualitativo de productos agroalimentarios, Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba.
- [129] Geladi P., McDougall, D., Martens, H. (1985) Linearization and Scatter-Correction for Near-Infrared Reflectance Spectra of Meat. Appl. Spectrosc. 39, 491-500.
- [130] Fearn, T., Riccioli, C., Garrido-Varo, A. and Guerrero-Ginel, E. (2009). On the geometry of SNV and MSC. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 96, pp. 22-26.
- [131] Jolliffe, I.T, (2002) Principal component analysis. Springer, New York.
- [132] Martens, H., Naes, T. (1991). Multivariate Calibration, John Wiley & Sons, Chichester.
- [133] Duda, R. O., Hart P. E., Stork, D. G. (2004). Pattern Classification, Wiley-Interscience, Chichester.
- [134] Dubois, J. Wolff, J.-C. Warrack, J.K. Schoppelrei J., Lewis, E.N. Spectroscopy 22 (2007), p. 36.
- [135] Terrado, M., Barceló, D., Tauler, R. (2011) Chemometric Analysis and Mapping of Environmental Pollution Sources in the Ebro River Basin. The Ebro River Basin. The Handbook of Environmental Chemistry, 13/2011, 331-372.
- [136] Sánchez, E, Kowalski, B.R. (1988) J Chemom 2:247.
- [137] Fortunato de Carvalho Rocha, W., Post Sabin, G., Henrique Março, P., Poppi, R. J. (2010). Quantitative analysis of piroxicam polymorphs pharmaceutical mixtures by hyperspectral imaging and chemometrics Original Research

- Article Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, In Press, Corrected Proof.
- [138] Jain, A. K., Duin, R. P. W., Mao, J. (2000). Statistical pattern recognition: a review, *IEEE transaction on pattern analysis and machine intelligence*, 22, p. 4-37.
- [139] Otto, M. (1999). *Chemometrics. Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry*, Wiley-VCH, New York, USA.
- [140] Berrueta, L. A., Alonso-Salces, R. M. Heberger K. (2007). Supervised pattern recognition in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 1158, 196–214.
- [141] Garrido, A. (2000). La espectroscopie proche infrarouge: Une technologie d'appui pour un service intégral en alimentation animale. In: D. Bertrand and E. Dufour, Editors, *La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques*, Collection Sciences and Techniques Agroalimentaires, TEC and DOC, Paris, 473.
- [142] De la Roza-Delgado B., Soldado A., Martínez-Fernández A., Vicente F., Garrido-Varo A., Pérez-Marín D., De la Haba M.J., Guerrero-Ginel J.E. (2007). Application of near-infrared microscopy (NIRM) for the detection of meat and bone meals in animal feeds: A tool for food and feed safety. *Food Chemistry* 105(3), 1164-1170.
- [143] Garcia-Allende, P.B.; Conde, O.M.; Mirapeix, J.; Cobo, A.; Lopez-Higuera, J.M. (2008). Quality control of industrial processes by combining a hyperspectral sensor and Fisher's linear discriminant analysis. *Sensor. Actuator. B-Chem.*, 129, 977-984.
- [144] Nansen, C.; Kolomiets, M.; Gao, X. (2008). Considerations regarding use of hyperspectral imaging data in classifications of food products—exemplified by analysis of maize kernels. *J. Agr. Food Chem.*, 56, 2933-2938.
- [145] Rutledge, H.T.; Reedy, B.J. (2009). Classification of heterogeneous solids using infrared hyperspectral imaging. *Appl. Spectrosc.*, 63, 162-179.
- [146] Vargas, A.M.; Kim, M.S.; Tao, Y.; Lefcourt, A.M.; Chen, Y.-R.; Luo, Y.; Song, Y.; Buchanan, R. (2005). Detection of fecal contamination on cantaloupes using hyperspectral fluorescence imagery. *J. Food Sci.*, 70, 471-476.

- [147] Chen, L.; Carpita, N.C.; Reiter, W.-D.; Wilson, R.H.; Jeffries, C.; McCann, M.C. (1998). A rapid method to screen for cell-wall mutants using discriminant analysis of Fourier transform spectra. *Plant J.*, 16, 385-392.
- [148] Kong, S.G.; Chen, Y.; Kim, I.; Kim, M.S. (2004). Analysis of hyperspectral fluorescence images for ave skin tumor inspection. *Appl. Optics.*, 43, 824-832.
- [149] Qiao, J.; Ngadi, M.O.; Wang, N.; Garieepy, C.; Prasher, S.O. (2007). Pork quality and marbling level assessment using a hyperspectral imaging system. *J. Food Eng.*, 83, 10-16.
- [150] Kolomiets, O.; Hoffmann, U.; Geladi, P.; Siesler, H.W. (2008). Quantitative determination of pharmaceutical drug formulations by near-infrared sprotoscopic imaging. *Appl. Spectrosc.*, 62, 1200-1208.
- [151] Delwiche. S.R. (1996). Protein content of single kernels of wheat by near-infrared reflectance spectroscopy. *J. Cereal Sci.*, 27, 241-254. 30.
- [152] Cogdill, R.; Hurburgh, C.; Rippke, G. (2004). Single-kernel maize analysis by near-infrared hyperspectral imaging. *Trans. ASAE*, 47, 311-320.
- [153] Zhao, D.K.; Raja Reddy, K.; Kakani, V.G.; Read, J.J.; Carter, G.A. (2003). Corn (*Zea mays L*) growth, leaf pigment concentration, photosynthesis and leaf hyperspectral reflectance properties as affected by nitrogen supply. *Plant Soil*, 257, 205-217.
- [154] El-Sebai, O.A.; Sanderson, R.; Bleiweiss, M.P.; Schmidt, N. (2006). Detection of *Sitotroga cerealella* (Olivier) infestation of wheat kernels using hyperspectral reflectance. *J. Entomol. Sci.*, 41, 155-164.
- [155] Campbell, P.K.E.; Middleton, E.M.; McMurtrey, J.E.; Corp, L.A.; Chappelle, E.W. (2007). Assessment of vegetation stress using reflectance or fluorescence measurements. *J. Environ. Qual.*, 36, 832-845.
- [156] Goel, P.K.; Prasher, S.O.; Patel, R.M.; Landry, J.A.; Bonnell, R.B.; Viau, A.A. (2003). Classification of hyperspectral data by decision trees and artificial neural networks to identify weed stress and nitrogen status of corn. *Comput. Electron. Agric.*, 39, 67-93.
- [157] McCann, M.C.; Defernez, M.; Urbanowicz, B.R.; Tewari, J.C.; Langewisch, T.; Olek, A.; Wells, B.; Wilson, R.H.; Carpita, N.C. (2007). Neural network analyses

- of infrared spectra for classifying cell wall architectures. *Plant Physiol.*, 143, 1314-1326.
- [158] Pierna, J.A.F.; Baeten, V.; Renier, A.M.; Cogdill, R.A.; Dardenne, P. (2004). Combination of support vector machines (SVM) and near infrared (NIR) imaging spectroscopy for the detection of meat and bonemeal (MBM) in compound feeds. *Chemometrics.*, 18, 341-349.
- [159] Jiang, L.; Zhu, B.; Rao, X.; Berney, G.; Tao, Y. (2007). Discrimination of black walnut shell and pulp in hyperspectral fluorescence imagery using Gaussian kernel function approach. *J. Food Eng.*, 81, 108-117.
- [160] J. Amigo, M., Ravn, C., Gallagher, N.B., Bro, R. (2009). A comparison of a common approach to partial least squares-discriminant analysis and classical least squares in hyperspectral imaging *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 373, Issues 1-2, 21, 179-182.
- [161] Williams, P., Geladi, P., Fox, G. Manley, M. (2009). Maize kernel hardness classification by near infrared (NIR) hyperspectral imaging and multivariate data analysis *Original Research Article Analytica Chimica Acta*, Volume 653, Issue 2, 121-130.
- [162] Xing, J., Saeys, W., De Baerdemaeker J. (2007). Combination of chemometric tools and image processing for bruise detection on apples. *Computers and Electronics in Agriculture*, 56, 1, 1-13.
- [163] Hernández Hierro, J.M. (2008). Utilización de la tecnología NIRS con sonda de fibra óptica para el control de calidad de alfalfa. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.
- [164] WinISI II, v. 1.50. (2000).Infrasoft International, LLC, Port. Matilda, PA, USA.
- [165] Wold, S., and Sjostrom, M. (1977). SIMCA: A method for analyzing chemical data in terms of similarity and analogy, in Kowalski, B.R., ed., *Chemometrics Theory and Application*, American Chemical Society Symposium Series 52, Wash., D.C., American Chemical Society, p. 243-282.
- [166] Forina, M.; Lanteri, S. (1984). In *Chemometrics. Mathematics and Statistics in Chemistry*; Kowalski, B. R., ed.; D. Reidel Publishing Company: Reidel, Dordrecht, p. 305.

- [167] Ferreira, M. C.; Antunes, A. M.; Melgo, M. S.; Volpe, P. L. O. (1999). *Quim. Nova* 22, 724.
- [168] Breiman L, Friedman JH, Olshen RA, Stone CJ. (1984) *Classification and Regression Trees*. London: Chapman & Hall.
- [169] Friedman, J.H., Fisher, N.I. (1999). Bump hunting in high-dimensional data. *Statistics and Computing*, 9 (2), 123-143.
- [170] Deconinck, E., Zhang, M. H., Coomans, D., & Heyden, Y. V. (2006). Classification tree models for the prediction of blood-brain barrier passage of drugs. *Journal of Quematic Information and Modeling*, 46 (3), 1410–1419.
- [171] Timofeev, R. (2004). *Classification and regression trees (cart) theory and applications*. Master thesis, CASE - Center of Applied Statistics and Economics. Humboldt University, Berlin.
- [172] Caetano, S., Ustun, B., Hennessy, S., Smeyers-Verbeke, J., Melssen, W., Downey, G., Buydens, L., Vander Heyden, Y. (2007). Geographical classification of olive oils by the application of CART and SVM to their FT-IR. *Journal of Chemometrics*, 21: 324–334.
- [173] Deáth, G. & Fabricius, K. E. (2000). Classification and regression trees: A powerful yet simple technique for ecological data analysis. *Ecology*, 81 (11), 3178–3192.
- [174] Riccioli, C. Pérez-Marín, D. Guerrero-Ginel, J.E., Fearn, T., Garrido, A. (2010). Pure and mixed pixels analysis for the detection of MBM in animal byproduct feeds. *Proceedings of the IASIM-10 Conference*.
- [175] Lewis, E. N., Schoppelrei, J., Lee E. (2004). *Spectroscopy* 19(4).
- [176] Gendrin, C., Roggo, Y., Collet, C. (2008). Pharmaceutical applications of vibrational chemical imaging and chemometrics: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48, 3, 533-553.
- [177] Burger, J., Geladi, P. (2006). Hyperspectral NIR imaging for calibration and prediction: a comparison between image and spectrometer data for studying organic and biological samples. *Analyst*, 131, 1–9, 1.
- [178] Plaza, A., Martinez, P., Perez, R., Plaza, J. (2004). A quantitative and comparative analysis of endmember extraction algorithms from hyperspectral data. *IEEE Transactions On Geoscience And Remote Sensing*, 42, 3.

- [179] Chang, C., Ren, H. (2004). An experiment-based quantitative and comparative analysis of target detection and image classification algorithms for hyperspectral imagery. *IEEE Transactions On Geoscience And Remote Sensing*, 38, 2.
- [180] Burns, D.A., Ciurczak E.W. (Eds.), (2001). *Handbook of Near-Infrared Analysis, Revised and Expanded*, 2nd ed., Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hingkong.
- [181] De la Haba, M. J., Garrido, A., Guerrero, J. E., Pérez-Marín, D. (2006). Near-Infrared Reflectance Spectroscopy for Predicting Amino Acids Content in Intact Processed Animal Proteins. *J. Agric. Food Chem.*, 54 (20), 7703–7709.
- [182] De la Haba, M. J., Garrido, A., Guerrero, J. E., Pérez-Marín, D. (2009). Near infrared spectroscopy calibrations for quantifying the animal species in processed animal proteins. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 17, 3, 109–118.
- [183] Pérez Marín, D.C., Garrido-Varo, A., Guerrero, J.E., Gómez, A., Soldado, A., De La Roza, B. (2008). External validation and transferability of nirs models developed for detecting and quantifying MBM in intact compound feeding stuffs. *Journal of Food Quality*, 31, 1, 96-107.
- [184] Alcalá, M. (2006). Utilización de la Espectroscopia NIR en el Control Analítico de la Industria Farmacéutica Desarrollos iniciales en PAT. Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.
- [185] Martens, H. Naes, T. (1996). *Multivariate Calibration*, JohnWiley&Sons, Chichester.
- [186] Höskuldsson, A. (1996). *Prediction methods in science and technology*. Thor Publishing, København, Denmark.
- [187] Naes, T., Isaksson, T., Fearn, T., Davies, A.M.C. (2002). *A User-Friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification*, NIR Publications, Chichester, UK.
- [188] Roggo, Y., Chalus, P., Maurer, L., Lema-Martinez, C., Edmond, A., Jent, N. (2007). A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007), 683–700.
- [189] Williams, P., Norris, K. (1987), *Near-Infrared technology in the agricultural and food industries*. American Association of Cereal Chemists, St Paul, MN.

- [190] Cogdill, R.P. Hurburgh Jr., C.R. Rippke, G.R. Bajic, S.J. Jones, R.W. McClelland, J.F. Jensen, T.C. Liu, J. (2004) *Trans. ASAE* 47(1), 311.
- [191] Lu, R. Peng, Y. J. (2005). *Near Infrared Spectrosc.* 13, 27.
- [192] Peng, Y. Lu, R. (2006). A LCTF Based Multispectral Imaging System for Estimation of Apple Fruit Firmness: Part I: Acquisition and Characterization of Scattering Images. *Transactions of the ASABE*, 49(1):259-267.
- [193] Lu, R., Peng, W. (2006). Hyperspectral Scattering for assessing Peach Fruit Firmness. *Biosystems Engineering* 93 (2), 161–171.
- [194] ElMasry, G., Wang, N., ElSayed, A., Ngadi, M. (2007). Hyperspectral imaging for nondestructive determination of some quality attributes for strawberry. *Journal of Food Engineering*, 81, 1, 98–107.
- [195] Qin, J., Lu, R. (2005) Detection of pits in tart cherries by hyperspectral transmission imaging, *Transactions of the ASAE*, 48 (5), 1963-1970.
- [196] Nicolai, B.M., Lötze, E., Peirs, A., Scheerlinck, N., Theron, K.I. (2006). Non-destructive measurement of bitter pit in apple fruit using NIR hyperspectral imaging. *Postharvest Biology and Technology* 40 (1), 1-6.
- [197] Liu, Y. Chen, Y. Wang, C.Y. Chan, D.E. Kim, M.S. (2005) *Appl. Spectrosc.* 59(1), 78.
- [198] Fernández Pierna, J.A. Baeten, V. Renier, A.M. Cogdill, R.P. Dardenne, P. (2004) *J. Chemom.* 18, 341.
- [199] Qiao, J., Ngadi, M., Wang, N., Gunenc, A., Monroy, M., Garipey, C., Prasher, S. (2007b). Pork quality classification using a hyperspectral imaging system and neural network. *International Journal of Food Engineering* 3 (1), 61-12.
- [200] Lawrence, K.C. Windham, W.R. Park, B. Buhr, R.J. Near J. (2003) *Infrared Spectrosc.* 11, 269.
- [201] Park, B. Lawrence, K.C. Windham, W.R. Smith, D.P. (2006) *J. Food Eng.* 75, 340.
- [202] Kim, M.S. Lefcourt, A.M. Chao, K. Chen, Y.R. Kim, I. Chan, D.E. (2002) *Trans. ASAE* 45(6), 2027.
- [203] Tsuta, M., Takao, T., Sugiyama, J., Wada, Y. and Sagara, Y. (2006). Foreign Substance Detection in Blueberry Fruits by Spectral Imaging. *Food Science and Technology Research* Vol. 12, 2 96-100.

- [204] Sugiyama, T., Sugiyama, J., Tsuta, M., Fujita, K., Shibata, M., Kokawa, M., Araki, T., Nabetani, H., and Sagara, Y. (2010). NIR spectral imaging with discriminant analysis for detecting foreign materials among blueberries. *Journal of Food Engineering* 101, 3, 244-252.
- [205] Xing, J., Guyer, D., Ariana, D., Lu, R. (2008). Determining optimal wavebands using genetic algorithm for detection of internal insect infestation in tart cherry. *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety* 2 (3), 161-167.
- [206] Wang, W., Li, C., Gitaitis, R., Tollner, E.W., Rains, G., Yoon, S.-C. (2010). Near-infrared hyperspectral reflectance imaging for early detection of sour skin disease in *Vidalia* sweet onions. *American Society of Agricultural and Biological Engineers Annual International Meeting 2010* 4, pp. 3415-3436.
- [207] Gowen, A. A., O'Donnell, C., Taghizadeh, M., Cullen, P. J., & Downey, G. (2008). Hyperspectral imaging combined with principal component analysis for surface damage detection on white mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Journal of Chemometrics*, 22, 259-267.
- [208] Taghizadeh, M., Gowen, A.A., O'Donnell, C.P. (2009). Prediction of white button mushroom (*Agaricus bisporus*) moisture content using hyperspectral imaging. *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety Volume 3, Number 4*, 219-226.
- [209] Okamoto, H., Lee, W.S. (2009). Green citrus detection using hyperspectral imaging. *Computers and Electronics in Agriculture* 66 (2), 201-208.
- [210] Lee, D. J., Schoenberger, R., Archibald, J., McCollom, S. (2008). Development of a machine vision system for automatic date grading using digital reflectance near-infrared imaging. *Journal of Food Engineering* Volume 86, Issue 3, 388-398.
- [211] Gómez-Sanchis, J., Gómez-Chova, L., Aleixos, N., Camps-Valls, G., Montesinos-Herrero, C., Moltó, E., Blasco, J. (2008). Hyperspectral system for early detection of rotteness caused by *Penicillium digitatum* in mandarins. *Journal of Food Engineering* 89 (1), 80-86.
- [212] Lefcote, A.M., Kim, M.S. (2006). Technique for normalizing intensity histograms of images when the approximate size of the target is known:

- Detection of feces on apples using fluorescence imaging. *Computers and Electronics in Agriculture* 50 (2), 135-147.
- [213] Liu, Y., Chen, Y.-R., Kim, M.S., Chan, D.E., Lefcourt, A.M. (2007). Development of simple algorithms for the detection of fecal contaminants on apples from visible/near infrared hyperspectral reflectance imaging. *Journal of Food Engineering* 81 (2), 412-418.
- [214] Lu, R. (2007). Nondestructive measurement of firmness and soluble solids content for apple fruit using hyperspectral scattering images. *Sens. & Instrumen. Food Qual.* (2007) 1:19–27.
- [215] Noh, H. and Lu, R., (2007). Hyperspectral laser-induced fluorescence imaging for assessing apple fruit quality. *Postharvest Biology and Technology*, 43, 193-201.
- [216] Peng, Y., Lu, R. (2008). Analysis of spatially resolved hyperspectral scattering images for assessing apple fruit firmness and soluble solids content. *Postharvest Biology and Technology* 48 (1), 52-62.
- [217] ElMasry, G., Wang, N., Vigneault, C. (2009). Detecting chilling injury in Red Delicious apple using hyperspectral imaging and neural networks. *Postharvest Biology and Technology* 52 (1), 1-8.
- [218] Huang, M., Lu, R. (2010). Apple mealiness detection using hyperspectral scattering technique. *Postharvest Biology and Technology* 58 (3), 168-175.
- [219] Ariana, D.P., Lu, R., Guyer, D.E. (2006). Near-infrared hyperspectral reflectance imaging for detection of bruises on pickling cucumbers. *Computers and Electronics in Agriculture* 53 (1), 60-70.
- [220] Liu, Y., Chen, Y. R., Wang, C. Y., Chan, D. E., & Kim, M. S. (2006). Development of hyperspectral imaging technique for the detection of chilling injury in cucumbers; spectral and image analysis. *Applied Engineering in Agriculture*, 22(1), 101–111.
- [221] Hong, T., Qiao, J., Ning, W., Ngadi, M.O., Zhao, Z., Li, Z. (2007). Non-destructive inspection of Chinese pear quality based on hyperspectral imaging technique *Nongye Gongcheng Xuebao/Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 23 (2), 151-155.

- [222] Zhao, X., Burks, T.F., Qin, J., Ritenour, M.A. (2010). Effect of fruit harvest time on citrus canker detection using hyperspectral reflectance imaging. *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety* 4 (3), 126-135.
- [223] Staab, E.S., Slaughter, D.C., Zhang, Y., Giles, D.K. (2009). Hyperspectral imaging system for precision weed control in processing tomato. *American Society of Agricultural and Biological Engineers Annual International Meeting 2009 Volume 7*, 4644-4656.
- [224] Heitschmidt, G.W., Park, B., Lawrence, K.C., Windham, W.R., Smith, D.P.(2007). Improved hyperspectral imaging system for fecal detection on poultry carcasses. *Transactions of the ASABE* 50 (4), 1427-1432.
- [225] Park, B., Windham, W. R., Lawrence, K. C. and Smith, D., (2007). Contaminant classification of poultry hyperspectral imagery using a spectral angle mapper algorithm. *Biosystems Engineering*, 96(3), 323-333.
- [226] Chao, K., Yang, C.-C., Kim, M.S., Chan, D.E. (2008). High throughput spectral imaging system for wholesomeness inspection of chicken. *Applied Engineering in Agriculture* 24 (4), 475-485.
- [227] Yoon, S.C., Lawrence, K.C., Smith, D.P., Park, B., Windham, W.R. (2008). Embedded bone fragment detection in chicken fillets using transmittance image enhancement and hyperspectral reflectance imaging. *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety* 2 (3), 197-207.
- [228] Nakariyakul, S., and Casasent, D.P. (2009). Fast feature selection algorithm for poultry skin tumor detection in hyperspectral data. *Journal of Food Engineering* 94, 358–365.
- [229] Wold, J.F., Johansen, I.-R., Haugholt, K.H., Tschudi, J., Thielemann, J., Segtnan, V.H., Narum, B., Wold, E. (2006). Non-contact transreflectance near infrared imaging for representative on-line sampling of dried salted coalfish (bacalao). *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 14 (1), 59-66.
- [230] Qiao, J., Ngadi , M., Wang, N., Garipey, C., Prasher, S.O. (2007a). Pork quality and marbling level assessment using a hyperspectral imaging system. *Journal of Food Engineering* 83, 10–16.

- [231] Sugiyama, T., Tsuta, M., Sugiyama, J., Araki, T., Sagara, Y. (2009). Visualization of Food Additive Effects on Prawn Properties by Near Infrared Spectral Imaging. *Food Sci. Technol. Res.*, 15 (4), 361–366.
- [232] Qin, J., Lu, R. (2007). Measurement of the absorption and scattering properties of turbid liquid foods using hyperspectral imaging. *Applied Spectroscopy* 61 (4), 388-396.
- [233] Heia, K., Sivertsen, A.H., Stormo, S.K., Elvevoll, E., Wold, J.P., Nilsen, H.(2007). Detection of nematodes in cod (*Gadus morhua*) fillets by imaging spectroscopy. *Journal of Food Science* 72 (1), E11-E15.
- [234] ElMasry, G., Wold, J.P.(2008). High-speed assessment of fat and water content distribution in fish fillets using online imaging spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (17), 7672-7677.
- [235] Nansen, C., Herrman, T., Swanson, R. (2010). Machine vision detection of bonemeal in animal feed samples. *Applied Spectroscopy* 64 (6), 637-643.
- [236] Fernández Pierna, J.A., Dardenne, P., Baeten, V.(2010). In-house validation of a near infrared hyperspectral imaging method for detecting processed animal proteins in compound feed. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 18 (2), 121-133.
- [237] Cluff, K., Naganathan, G.K., Subbiah, J., Lu, R., Calkins, C.R., Samal, A. (2008). Optical scattering in beef steak to predict tenderness using hyperspectral imaging in the VIS-NIR region. *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety* 2 (3), 189-196.
- [238] Naganathan, G.K., Grimes, L.M., Subbiah, J., Calkins, C.R., Samal, A., Meyer, G.E. (2008). Partial least squares analysis of near-infrared hyperspectral images for beef tenderness prediction. *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety* 2 (3), pp. 178-188.
- [239] Wallays, C., Missotten, B., De Baerdemaeker, J., Saeys, W. (2009). Hyperspectral waveband selection for on-line measurement of grain cleanness. *Biosystems engineering* 104, 1–7.
- [240] Nansen, C., Kolomiets, M., Gao X. (2008). Considerations Regarding the Use of Hyperspectral Imaging Data in Classifications of Food Products, Exemplified by Analysis of Maize Kernels. *J. Agric. Food Chem.*, 56 (9), 2933–2938.

- [241] Williams, P., Geladi, P., Fox, G. and Manley, M. (2009). Maize kernel hardness classification by near infrared (NIR) hyperspectral imaging and multivariate data analysis. *Analytica Chimica Acta* 653, 121–130.
- [242] Gorretta, N., Roger, J. M., Aubert, M., Bellon-Maurel, V., Campan, F., & Roumet, P. (2006). Determining vitreousness of durum wheat kernels using near infrared hyperspectral imaging. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 14(4), 231–239.
- [243] Berman, A., Connor, P. M., Whitbourn, L. B., Coward, D. A., Osborne, B. G., & Southan, M. D. (2007). Classification of sound and stained wheat grains using visible and near infrared hyperspectral image analysis. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 15, 351–358.
- [244] Mahesh, S., Manickavasagan, A., Jayas, D. S., Paliwal, J., & White, N. D. G. (2008). Feasibility of near-infrared hyperspectral imaging to differentiate Canadian wheat classes. *Biosystems Engineering*, 101, 50–57.
- [245] Choudhary, R. L., Mahesh, S., Paliwal, J., & Jayas, D. S. (2008). Identification of wheat classes using wavelet features from near infrared hyperspectral images of bulk samples. *Biosystems Engineering*, 102(2), 115–127.
- [246] Yao, H., Hruska, Z., Kincaid, R., Brown, R.L., Cleveland, T.E. (2008). Differentiation of toxigenic fungi using hyperspectral imagery. *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety*, 2 (3), 215-22.
- [247] Jin, J., Tang, L., Hruska, Z., Yao, H. (2009). Classification of toxigenic and atoxigenic strains of *Aspergillus flavus* with hyperspectral imaging. *Comput. Electron. Agric.*, doi:10.1016/j.compag.2009.07.023.
- [248] Yoon, S.C., Lawrence, K.C., Line, J.E., Siragusa, G.R., Feldner, P.W., Park, B., Windham, W.R. (2010). Detection of *Campylobacter* colonies using hyperspectral imaging. *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety* 4 (1), 35-49.
- [249] Yao, H., Hruska, Z., Kincaid, R., Ononye, A., Brown, R.L., Cleveland, T.E. (2010). Spectral angle mapper classification of fluorescence hyperspectral image for aflatoxin contaminated corn. 2nd Workshop on Hyperspectral Image and Signal Processing: Evolution in Remote Sensing, WHISPERS 2010.

- [250] Garcia-Allende, P.B., Conde, O.M., Mirapeix, J., Cobo, A., Lopez-Higuera, J.M. (2008). Quality control of industrial processes by combining a hyperspectral sensor and Fisher's linear discriminant analysis. *Sensors and Actuators, B: Chemical* 129 (2), 977-984.
- [251] Zhao, J., Chen, Q., Cai, J., Ouyang, Q. (2009). Automated tea quality classification by hyperspectral imaging. *Applied Optics*, Vol. 48, Issue 19, 3557-3564.
- [252] <http://www.ars.usda.gov/is/pr/2010/100825.html>. Visitada el 20 de mayo de 2011.

CAPÍTULO 2. OPTIMIZACIÓN DE PARAMETROS PARA EL ANALISIS HIPERESPECTRAL DE HARINAS ANIMALES

2.1. OBJETIVOS

El objetivo principal de este estudio es el de optimizar la metodología para la adquisición de imágenes hiperespectrales, en vista de asegurar el desarrollo de modelos estadísticos robustos para la caracterización cualitativa y cuantitativa de MBM.

2.2. METODOLOGÍA

2.2.1. INSTRUMENTACIÓN

El equipo MatrixNIR (*Malvern Instruments*, Maryland, U.S.A.), perteneciente a la Unidad de Espectroscopía NIR/MIR del Servicio Central de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Córdoba (SCAI), ha sido utilizado para todos los análisis presentes en esta tesis.

Este equipo consta de una cámara CCD y está equipado con un filtro de cristal líquido sintonizable (Liquid Cristal Tuneable Filter, LCTF). La cámara fue utilizada para adquirir imágenes de muestras que fueron iluminadas por cuatro fuentes de la luz halógena. La luz incidente de las lámparas pasa por unos filtros polarizados y está orientada en dirección perpendicular a la muestra, de modo que los fenómenos de reflectancia especular sean reducidos. La cámara, el filtro y las fuentes de la luz son controlados por un ordenador (Dell Inc, Round Rock, TX, EE. UU). La cámara cuenta con un sensor compuesto por *Indium Arsenide* (InGaAs), refrigerado termo-eléctricamente y capaz de adquirir 256X320 píxeles por cada imagen, con una resolución de aproximadamente 97.8

$\mu\text{m}/\text{píxel}$ en la región NIR (950-1700 nm, cada 6 nm). Los diferentes parámetros instrumentales están indicados a continuación:

Tiempo de integración (TI): Este parámetro, también conocido como el tiempo de exposición, es definido como el tiempo durante el cual el conjunto de fotodiodos acumula la señal. Mayor el TI, mayor la relación señal/ruido (S/R). Sin embargo, el conjunto de fotodiodos empieza a saturarse si la señal excede del rango dinámico del detector [1]. En este trabajo se ha optado por utilizar un TI de 32 ms.

Coadds: Este valor representa el número de imágenes individuales tomados por el detector y promediados por cada longitud de onda. En este trabajo se ha utilizado un número de 16 imágenes promediadas por cada análisis

Scans: Se trata del número de espectros que serán posteriormente promediados para producir el espectro final. En este trabajo, basandonos en las recomendaciones de los fabricantes del instrumento, se optó por la elección de 1 espectro por análisis ya que el uso de múltiples *coadds* es el más idóneo para aumentar la relación S/R.

Paso: La longitud del paso es la resolución espectral. Este factor es importante sobre todo a la hora de tratar con espectros que tienen picos muy solapados o parecidos, como es el caso de las harinas animales. En este caso se ha optado por un paso de 10 nm buscando un compromiso entre capacidad de almacenamiento de las imágenes y resolución espectral adecuada para detectar picos informativos.

Rango de longitud de onda: Para el presente estudio, se utilizó el rango de 1100-1600 nm (obteniendo 51 valores de longitudes de onda) para garantizar la eliminación de cualquier efecto debido a variaciones en las primeras y últimas regiones del espectro.

Intensidad de iluminación: En esta tesis se ha utilizado el 75 % de la potencia global correspondiente a un voltaje de 5.501 V y una corriente de 7.500 A.

Como referencia blanca se utilizó un material de alta reflectancia difusa (cerámica blanca, Malvern Instruments, MD, U.S.A.) para todos los ensayos incluidos en este capítulo. Su superficie es muy homogénea a nivel espacial, característica que permite

obtener una variabilidad espectral mínima además de presentar una expansión termal prácticamente insignificante. El nivel de reflectancia es aproximadamente del 90 % [2].

Todos los ensayos fueron realizados a una temperatura constante de 22° C±1 conseguida con un dispositivo de aire acondicionado situado en la habitación donde se encontraba instalado el instrumento. Dicha temperatura se controlaba constantemente por un termómetro externo.

Con los parámetros definidos, el tiempo necesario para la obtención de cada imagen es de dos minutos aproximadamente.

2.2.2. COMPARACIÓN ENTRE DIFERENTES MATERIALES DE REFERENCIA

Como primer paso, se estudiaron las características de tres diferentes materiales oscuros candidatos para ser utilizados como referencia negra. El primero de ellos era un espejo de acero inoxidable, el mismo recomendado por el fabricante de la cámara y sugerido por otros autores [3]. La segunda opción estudiada fue el uso de una tapa que cubre el objetivo como recomendado por Gowen et al. [4]. El tercer material analizado fue papel de lija negro compuesto por carburo de silicio. Esta última opción fue estudiada después de haber constatado que este material ha sido usado por otros autores como porta muestras [5]. El carburo de silicio tiene valores de absorbancia muy altos, similar a los obtenidos con el espejo de acero inoxidable. El material de papel de lija tiene, además, un coste inferior y una fácil adquisición.

Los tres materiales fueron analizados como si fueran muestras, es decir, a través del estudio de los píxeles de su imagen, y los datos fueron tratados en términos de valores de intensidad, sin tener en cuenta referencias negras y blancas. El análisis fue realizado bajo condiciones de iluminación externa ausente apagando las luces de la habitación donde estaba ubicado el instrumento. Las tres potenciales referencias negras (tapa del objetivo, papel de lija y espejo de acero inoxidable) fueron analizadas sin el uso de tratamientos previos y fueron considerados todos los píxeles ($256 \times 320 = 81920$ por cada imagen). Al control del nivel de saturación de los píxeles siguió un examen visual de espectros de los tres materiales. Finalmente, se calculó la distancia de Mahalanobis (MD) de los espectros

de cada imagen al centro de la población para evaluar la uniformidad de cada una de las imágenes.

2.2.3. FRECUENCIA DE ANÁLISIS DE LAS REFERENCIAS.

Las respuestas espectrales obtenidas de una medida NIR-CI contienen información de la muestra así como del instrumento. Es por esta razón que es necesario corregir la respuesta del instrumento a través de la medición inicial del 'fondo' (*background*). Este procedimiento se lleva a cabo midiendo la intensidad de luz reflejada de un material altamente reflectante (referencia blanca) y la intensidad de un material altamente absorbente (referencia negra). Después de haber medido la luz reflejada por la muestra, la absorbancia NIR es calculada usando la relación entre la muestra y los materiales reflectante y absorbente según la siguiente ecuación [6]:

$$\log\left(\frac{1}{R}\right) = \log\left(\frac{R_{blanco} - R_{negro}}{R_{muestra} - R_{negro}}\right)$$

Donde:

R_{blanco} = Intensidad de la radiación remitida por la referencia blanca.

R_{negro} = Intensidad de la radiación remitida por la referencia negra.

$R_{muestra}$ = Intensidad de la radiación remitida por la muestra.

La respuesta del instrumento varía en el tiempo debido a cambios en las condiciones externas como luz o temperatura. Por esta razón es crucial repetir la adquisición de las referencias para corregir los valores de absorbancia de las muestras analizadas. La Figura 18 muestra el procedimiento de adquisición de las referencias y de una muestra de harina animal.

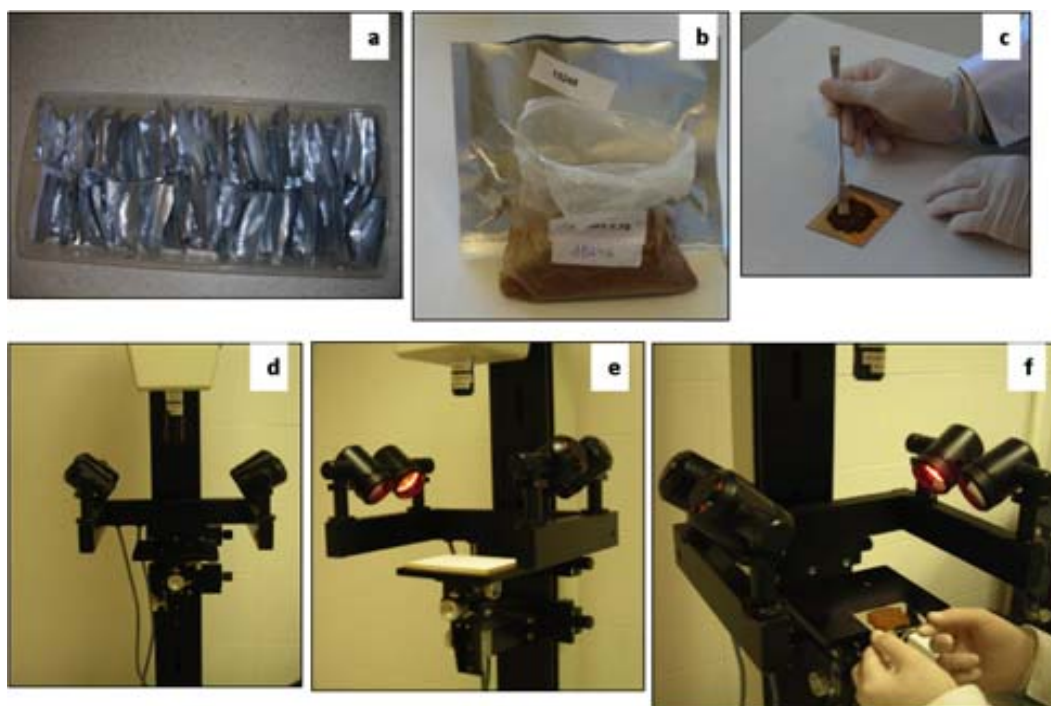


Figura 18. a: Muestras de harinas animales selladas. b: Apertura de la muestra para su análisis. c: Colocación de 1 g. de muestra en el espejo de acero inoxidable. d: Adquisición de referencia negra tapando el objetivo. e: Adquisición de la referencia blanca con la cerámica blanca. f: Colocación de la muestra para su análisis.

En este estudio se evaluaron tres diferentes frecuencias de análisis (o momentos) de las referencias blancas y negras para determinar una metodología de análisis que permita que los parámetros básicos de la imagen (ej. intensidad) queden constantes a lo largo del análisis. Las frecuencias estudiadas fueron:

1. Cada muestra: las referencias negra y blanca fueron adquiridas antes de cada adquisición de imagen (en tiempo: cada diez minutos). Esta opción asegura una estabilidad muy alta aunque los tiempos de análisis, en el caso de un elevado número de muestras, pueden ser significativamente más largos que en el caso de frecuencias menores.
2. Cada cinco muestras (treinta minutos): las referencias negra y blanca fueron adquiridas cada cinco adquisiciones de imagen.
3. Cada diez muestras (aproximadamente una hora): las referencias negra y blanca fueron adquiridas cada diez adquisiciones de imagen.

Como muestra para analizar se utilizó una placa de Spectralon (Labsphere, Inc., North Sutton, NH), llamado de aquí en adelante material estándar o ME, un material blanco que tiene un nivel de reflectancia del 98-99% en el rango 250-2500 nm. Se realizaron las tres pruebas a través de diez análisis del material estándar por cada momento de análisis de referencia, como se explica a continuación:

Referencia cada muestra: **R** - ME - **R** - ME - **R** - ME - **R** - ME - **R** - ME - **R** - ME - **R** - ME - **R** - ME - **R** - ME - **R** - ME.

Referencia cada cinco muestras: **R** - ME - ME - ME - ME - ME - **R** - ME - ME - ME - ME - ME.

Referencia cada diez muestras: **R** - ME - ME - ME - ME - ME - ME - ME - ME - ME - ME - ME.

Siendo **R**= referencias negra y blanca.

Las diez imágenes correspondientes a cada modalidad de frecuencia de referencia fueron reunidas en una usando la función de “concatenation” presente en el programa de tratamiento de imágenes ISYS (Marlvern Instruments, Maryland, U.S.A.). A continuación se realizó un “pixel binning” (agrupamiento de píxeles, Bin de ahora en adelante) [7] para disminuir el tamaño de datos y facilitar los futuros cálculos. Un *Bin* de 1 x 1 significa que el píxel individual se utiliza como tal. Un *Bin* de 2 x 2 significa que un área de 4 píxeles adyacentes se combina en un píxel más grande y así sucesivamente. La Figura 19 ilustra el efecto del Bin.

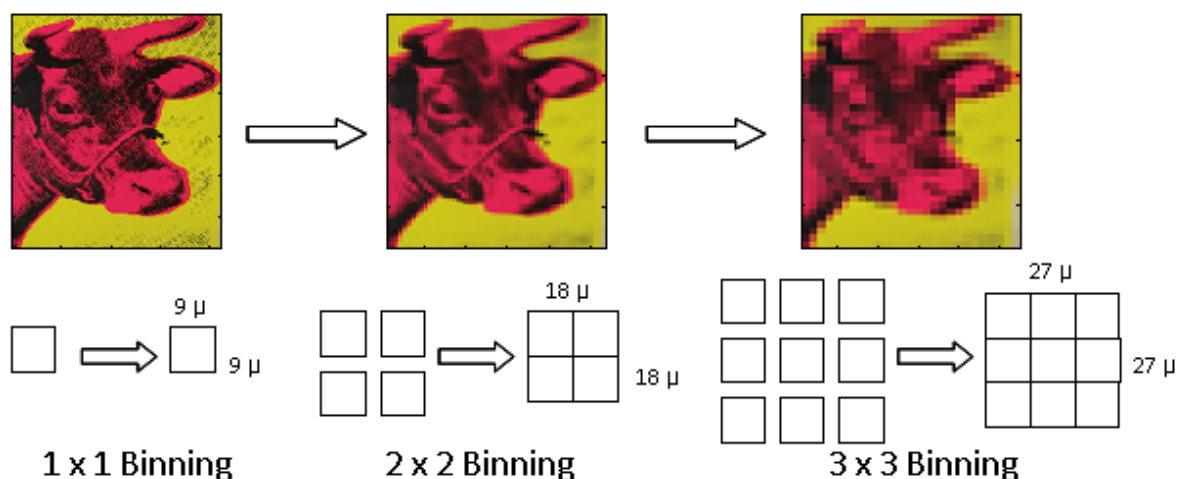


Figura 19. Representación de diferentes tratamientos de binning (1 x 1, 2 x 2, 3 x 3) y del efecto en la resolución de la imagen.

En este caso se creó un píxel correspondiente a la agrupación de 16 píxeles, es decir, se calculó el espectro medio de 16 píxeles adyacentes, aumentando de esta manera la relación S/R espectral disminuyendo la resolución espacial.

Con el fin de determinar la frecuencia óptima de análisis de la referencia se evaluaron tres diferentes estadísticos. El primero de ellos fue la STD calculada a la longitud de onda de 1520 nm para las diez muestras de cada una de las modalidades de frecuencia de referencia. La longitud de onda de 1520 nm fue seleccionada, ya que el detector del instrumento es calibrado por los fabricantes en este punto del espectro electromagnético. El material utilizado para la calibración del detector (Rare Earth Oxide Standard) es el que normalmente se usa para validar longitudes de onda en el rango 740-2000 nm por el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST) [8], y tiene un pico característico en la longitud de onda indicada.

El segundo estadístico utilizado fue el error cuadrático medio (RMSE), cuya fórmula se indica en el Capítulo 1 de esta memoria. El cálculo del RMSE permitió obtener información sobre la variabilidad dentro de cada imagen concatenada teniendo en cuenta la contribución de las 51 longitudes de onda disponibles.

Finalmente se calculó la MD entre todos los píxeles correspondientes a cada análisis al centro de la población (espectro medio de la imagen), para medir la similitud entre imágenes.

La MD es definida por contornos elípticos que se extienden desde los centros de las clases o, en este caso, de las imágenes. Las fórmulas matemáticas y las aplicaciones de MD han sido descritas, entre otros, por Mark [9]. La distancia MD, de un punto X al centro de un grupo i , es descrita por la ecuación:

$$MD^2 = (X - \bar{X}_i)' M (X - \bar{X}_i)$$

Donde MD es la distancia, X es el vector multidimensional que describe la posición de punto x , \bar{X}_i es el vector multidimensional que describe la posición de la media del grupo i , $(X - \bar{X}_i)'$ es la traspuesta del vector $(X - \bar{X}_i)$, y M es una matriz que determina las medidas de distancia del espacio multidimensional estudiado.

La adquisición de las imágenes fue realizada en condiciones de oscuridad dejando encendida solamente la pantalla del ordenador.

2.2.4. CONDICIONES DE ILUMINACIÓN

Partiendo de la base de que la iluminación es uno de los factores que más afectan la calidad de imagen, se decidió estudiar el efecto de variaciones en la luz presente en la habitación donde está ubicado el instrumento. Las pruebas fueron realizadas con el material estándar (ME) utilizado en el análisis de las referencias negra y blanca. El ME fue analizado diez veces usando las referencias negra y blanca antes de cada captación de imagen y cubriendo la lente durante la adquisición de la referencia negra. Se examinaron tres niveles de iluminación:

- Luz: luces de la habitación (lámparas halógenas) encendidas.
- Oscuridad: luces apagadas.

- Iluminación no controlada: se simularon condiciones no controladas durante la captación de las imágenes del ME.

Se estudiaron los valores MD y RMSE del ME para detectar posibles variaciones en las respuestas espectrales.

2.2.5. PRESENTACIÓN DE LA MUESTRA

Para estudiar el efecto que el soporte tiene en la imagen se evaluaron cuatro distintos tipos de porta muestras. El primero de ellos fue el espejo de acero inoxidable anteriormente descrito, seguido por la misma ceramica blanca utilizada para la referencia. El tercer tipo de porta muestras fue el papel de lija negro y el cuarto una tabla de Teflón® blanco. Este último fue estudiado porque, siendo muy apreciado a la ceramica blanca utilizada como referencia, tiene la ventaja de no ser poroso como la ceramica y, consecuentemente, es más facil de limpiar entre dos analisis. Una muestra de harina de carne fue analizada usando los cuatro portamuestras en condiciones de iluminación ausente.

Las cuatro imágenes de la muestra así obtenidas fueron inspeccionadas visualmente para identificar en cuál de ellas se distinguían mejor los píxeles pertenecientes a la muestra de los pertenecientes al soporte. Se examinaron los histogramas de intensidad de cada muestra para determinar la distancia máxima entre píxeles pertenecientes a la muestra y píxeles del portamuestras. Las referencias negra y blanca fueron tomadas antes de cada análisis de la muestra y la referencia negra fue tomada cubriendo la lente.

2.2.6. PROCESADO DE DATOS HIPERESPECTRALES.

Todos los análisis fueron realizados usando ISYS 4.0 (Malvern, Inc, Olney, MD, USA) y MatLab 7.1 (Mathworks, MA, USA). En todos los ensayos, excepto el del estudio del material para la referencia negra, se utilizaron los cubos de la imagen de las referencias blancas y negras para calcular los valores de absorbancia, para cada píxel y en cada longitud de onda λ_i según la formula indicada en el apartado 2.2.3. de esta tesis.

Debido a que, durante el curso de la adquisición de imágenes hiperespectrales, es posible que se generen números infinitos dividiendo un escalar por 0 y números indeterminados dividiendo 0 por 0, se procedió a la eliminación de estos valores con la ayuda de un algoritmo incluido en los pretratamientos disponibles en el programa ISYS 4.0. Esta función permite sustituir el valor del píxel defectuoso con la media de los ocho píxeles adyacentes.

Como se ha indicado anteriormente, para determinar la repetibilidad del análisis NIR-CI de la frecuencia óptima de las referencias negra y blanca, se se utilizaron los valores de:

- STD y RMSE para estudiar la correspondencia espectral de las imágenes.
- MD entre los píxeles de una imagen y el resto de las imágenes pertenecientes al mismo grupo.

El cálculo del RMSE, junto con el de MD, fue utilizado como medida de la similitud entre espectros.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. COMPARACIÓN ENTRE DIFERENTES MATERIALES DE REFERENCIA

La selección de la referencia negra más idónea se basa en el supuesto de que la imagen del material oscuro debe de tener píxeles con valores de intensidad muy bajos en la escala de valores del instrumento (1-4095, 12 bits) que se traducen en valores de reflectancia bajos y estables en cada píxel. Basándonos en estos parámetros se estudiaron los tres materiales candidatos para ser utilizados como referencia negra. Respecto a la intensidad de los tres materiales, la Figura 20 ilustra los niveles de intensidad de los píxeles pertenecientes a los tres materiales.

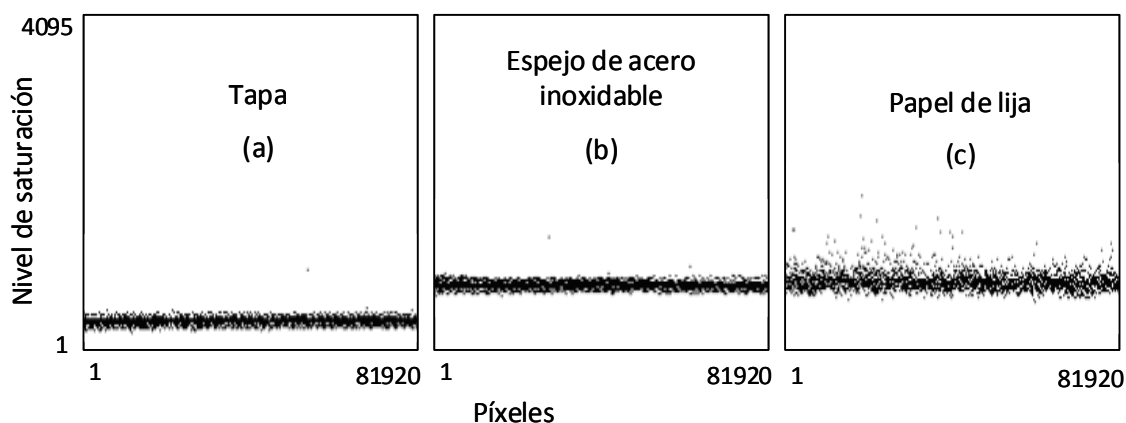


Figura 20. Niveles de saturación (de 0 a 2^{12}) para los tres materiales. a= tapa, b=espejo de acero inoxidable, c= papel de lija.

El gráfico mostrado en la Figura 20 es la salida de la función “osciloscopio” del programa de adquisición de imágenes (MatrixAcquire, Malvern Instruments) y muestra la distribución de la intensidad de cada uno de los píxeles de la imagen. El eje Y representa el rango dinámico del conversor analógico/digital (A/D) de la cámara (escala: intensidad de valores de 0 a 4095); el eje X indica el número de píxeles totales presentes en una imagen, es decir $320 \times 256 = 81920$ píxeles en esta estudio.

Para maximizar el rango dinámico de la cámara, los parámetros de adquisición de imagen deben estar establecidos de tal manera que una imagen oscura produzca una señal de salida con valores cercanos al cero. También es importante que la imagen de salida sea uniforme, es decir, que la línea formada por los píxeles en el osciloscopio sea lo más fina posible [10]. Esta característica puede ser controlada examinando el espesor del trazado del osciloscopio, como especificado en el manual de usuario de la cámara.

La opción de tapar el objetivo con un obturador negro (a) es la mejor opción como se deduce de la Fig. 20, ya que, de los tres métodos estudiados, los píxeles correspondientes a la imagen obtenida con este sistema proporcionan los menores niveles de intensidad (próximos a cero) y además, todos los píxeles se sitúan en una línea horizontal.

Además, el hecho de que los píxeles de la imagen tomada con la opción (a) tengan los niveles de intensidad más bajos permite, a la hora de analizar una muestra, aumentar el rango de valores y , consecuentemente, aumentar la resolución espectral. Los valores de

intensidad de los píxeles a cada longitud de onda y para los tres materiales estudiados aparecen en la Figura 21.

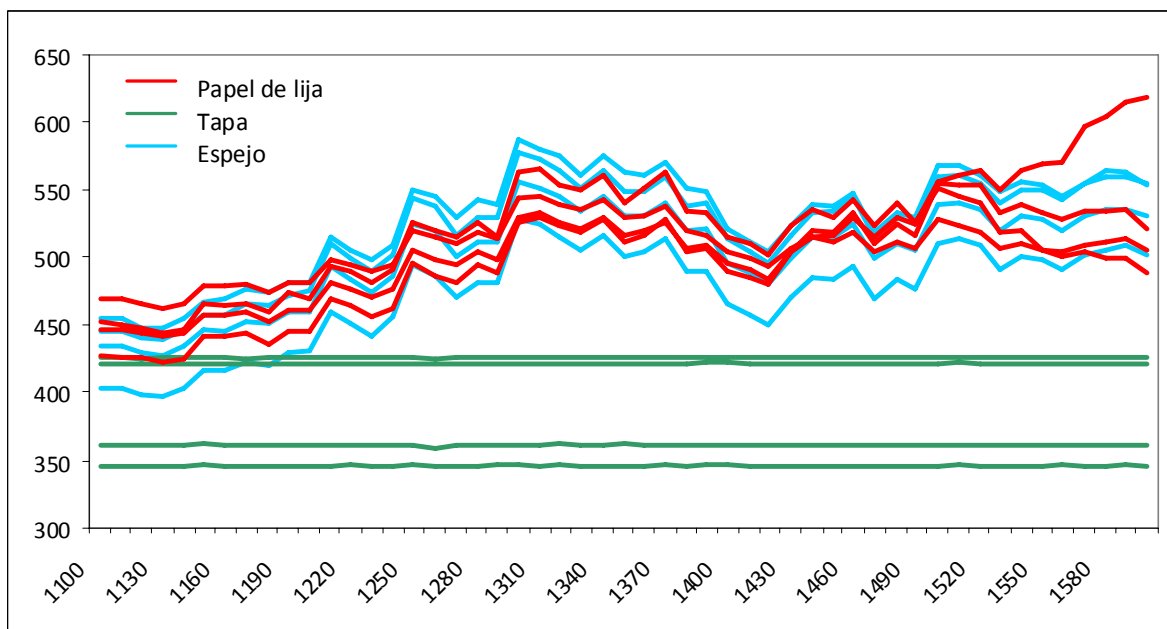


Figura 21. Espectros de 4 píxeles por cada uno de los materiales candidatos: papel de lija, espejo de acero inoxidable y tapa. Valores de intensidad.

Los cuatro espectros de los píxeles procedentes del papel de lija y los del espejo de acero inoxidable muestran características similares, teniendo valores de intensidad menores en la primera región del espectro y picos de valores máximos alrededor de 1330 nm y 1600 nm. Los espectros correspondientes a la tapa, sin embargo, tienen valores de intensidad inferiores y no presentan picos ni variaciones en la línea base.

Para confirmar los resultados hasta aquí obtenidos se calculó también la MD como criterio de semejanza entre píxeles de una imagen. Los resultados de esta prueba sirvieron para verificar la homogeneidad espacial de la imagen de la referencia negra. Los resultados están representados en la Figura 22.

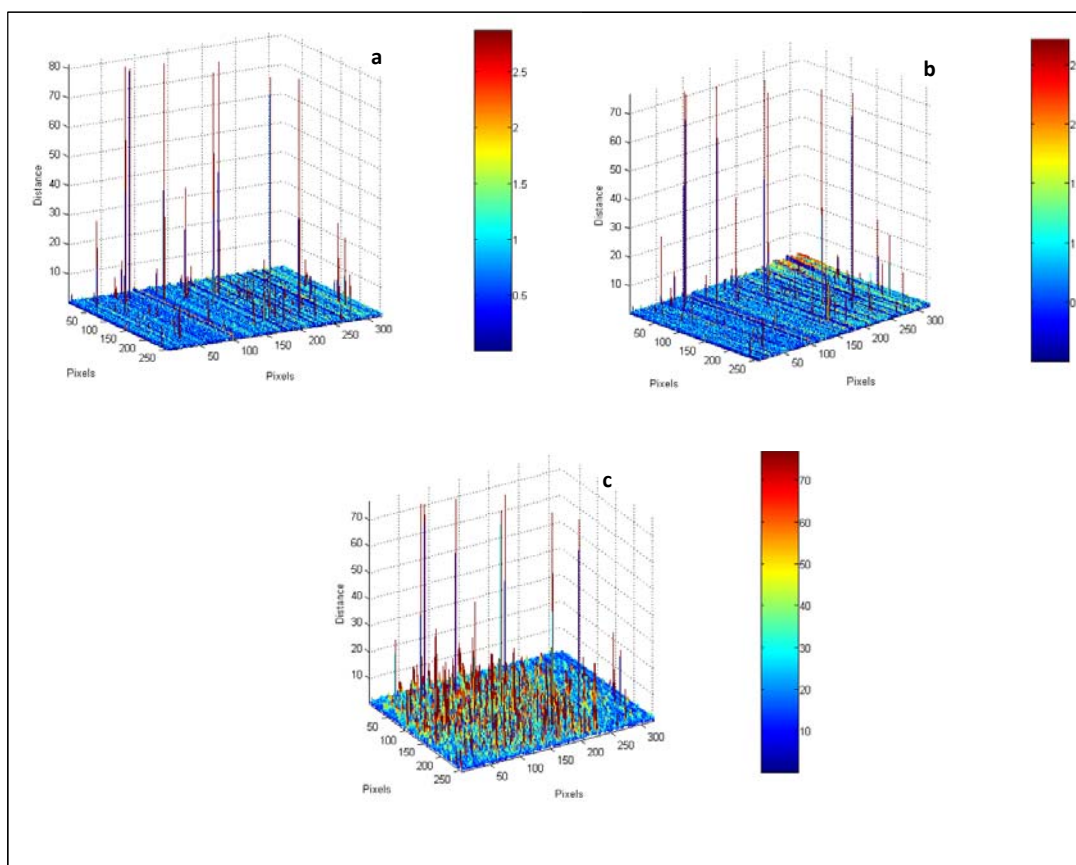


Figura 22. Mapa topológico de las distancias MD de los píxeles al centro de las imágenes de: a) tapa, b) espejo de acero y c) papel de lija.

Tomando como referencia el valor medio y la STD de MD, los valores de MD más altos fueron obtenidos con el papel de lija (promedio MD= 1.223, ST=1.229) frente a la tapa (promedio MD= 0.448, ST=0.874) y al espejo de acero inoxidable (promedio MD= 0.5189, ST=0.857), indicando una mayor variabilidad de entre los píxeles de este material, probablemente debida a su superficie irregular. Los resultados confirman que el cubrir el objetivo con un obturador produce imágenes cuyo píxeles tienen menor dispersión entre ellos.

Este material fue considerado, por lo tanto, el menos conveniente, a pesar de su menor coste y de la baja reflectancia que proporciona en la región NIR, ventajas indicadas por Burger y Geladi [11]. Los píxeles pertenecientes al espejo de acero inoxidable resultaron tener distancias dos veces inferiores a las anteriores que confirma que este material es mucho más homogéneo que el papel de lija. Los valores más bajos se obtuvieron con el

uso de la tapa mostrando que la eliminación de la posible influencia de pequeñas variaciones en la luz permite obtener el mayor grado de homogeneidad entre los píxeles.

En la Figura 22 también resalta la presencia de algunos píxeles, comunes a las tres imágenes, con valores de MD muy altos. Los valores anómalos de intensidad de estos píxeles son debidos al normal desgaste del instrumento y, para futuras análisis, deberían ser eliminados antes de aplicar cualquier tratamiento de la imagen. En este caso, su presencia no influyó en los resultados dado que el número de píxeles anómalos es insignificante con respecto al número total de píxeles por imagen.

2.3.2. FRECUENCIA DE ANÁLISIS DE LAS REFERENCIAS

Como se ha indicado anteriormente, la adquisición de una buena referencia es imperativa para la corrección apropiada de los datos de la muestra. El cubo de datos de la referencia blanca se obtiene de un estándar altamente reflectante y tiene que ser adquirido usando exactamente los mismos parámetros instrumentales y las mismas condiciones usadas para adquirir los datos de la muestra [12]. La intensidad de la señal de la muestra está influenciada por los componentes del sistema. La luz no es homogénea en toda la superficie de la imagen. Lo mismo pasa con la respuesta de la óptica debido a aberraciones ópticas. La sensibilidad del detector también varía con la longitud de onda [13].

No hay recomendaciones claras sobre la frecuencia ideal con la que los espectros de referencia deberían ser adquiridos a fin de mantener resultados estables. Posibles cambios de temperaturas ambientales pueden, por ejemplo, causar la necesidad de incrementar la frecuencia con la que la referencia debería ser tomada. Como se indica en el apartado 2.2.3 de este Capítulo, se evaluaron tres opciones de referencia. Después de aplicar un tratamiento de *Bin*, diez imágenes del material estándar ME para cada modalidad de frecuencia de referencia fueron concadenadas formando una sola imagen (Figura 23). De esta manera se pudo estudiar más fácilmente la relación entre los píxeles de imágenes tomadas en diferentes momentos.

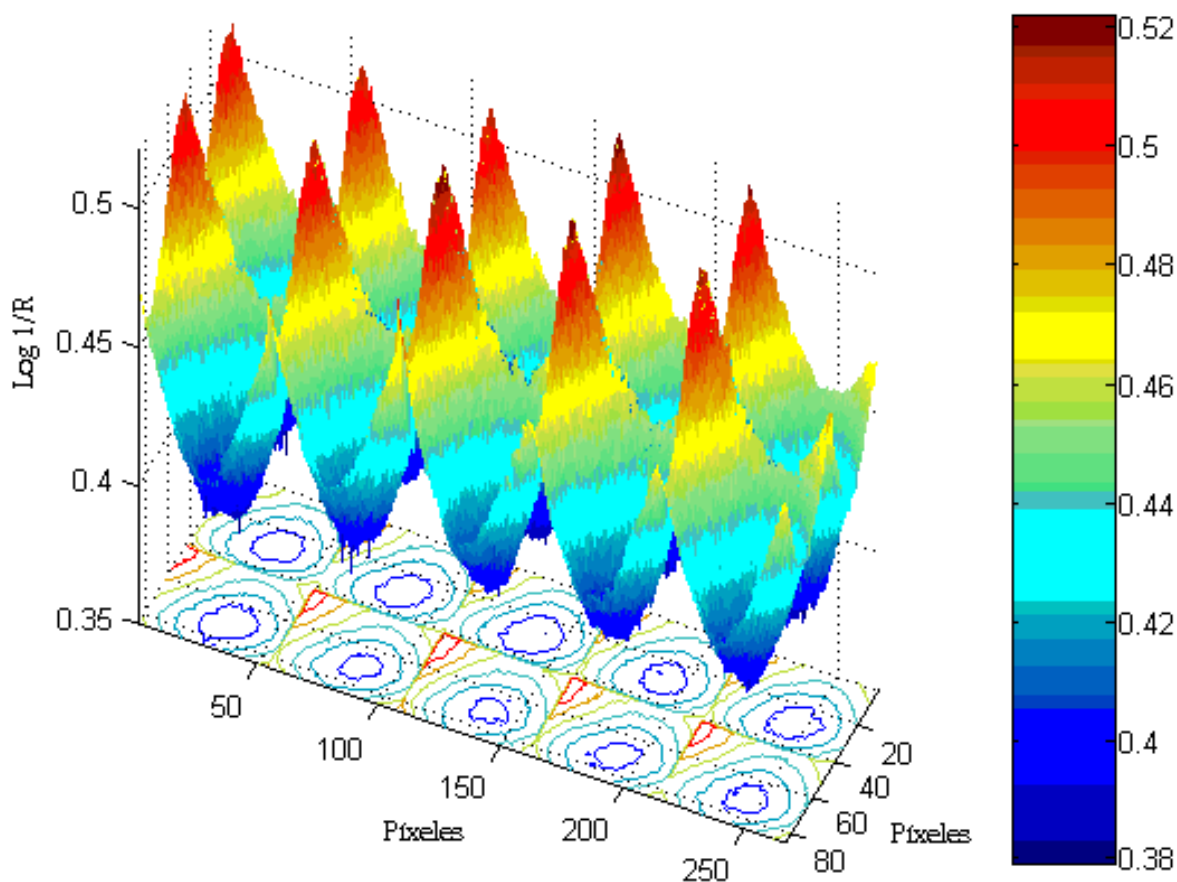


Figura 23. Imagen topológica de los valores de absorbancia ($\log 1/R$) a 1520 nm de las imágenes concatenadas de los diez análisis del ME.

A pesar de que el ME usado fuera uniforme a simple vista, se detectan evidentes irregularidades de la superficie pudieron ser detectadas a través de una inspección de la imagen. Los valores de absorbancia varían según la posición de los píxeles siendo más altos en los bordes y disminuyendo hacia el centro de las imágenes. Estos resultados están relacionados con la fuente de la luz, que, a pesar del uso de filtros polarizados, causa efectos de reflexión. Como afirma Geladi et al. [14], el sistema ideal de iluminación tiene que cumplir varias pautas: proporcionar una iluminación homogénea, contar con una luz intensa y policromática, contar con una fuente de luz polarizada y penetrar en la muestra con una reflectancia medible. Las muestras biológicas, como son las harinas animales, tienen un problema adicional ya que pueden ser sensibles al calentamiento causado por la iluminación continua de las lámparas. El ElMasry et al. [15] trató de solucionar el problema colocando alrededor de la muestra una estructura cúbica cubierta

con una tela de nailon blanca para difundir la luz y proporcionar una condición de iluminación uniforme.

En el presente estudio se consideró el factor de la iluminación no homogénea como una constante y, por esto, las condiciones de iluminación fueron mantenidas constantes y no se aplicó ninguna corrección al respecto.

Los resultados para los 4 índices utilizados para estimar la repetibilidad espectral para cada uno de las tres frecuencias estudiadas se pueden apreciar en la Tabla 7.

Tabla 7. Valores de RMSE, MD y STD para las tres modalidades de frecuencia de referencia.

	Cada muestra	Cada 5 muestras	Cada 10 muestras
RMSE mLog 1/R	2.25x10 ⁴	2.30x10 ⁴	2.31x10 ⁴
MD	0.82	0.87	0.82
STD a 1520 nm	0.02	0.02	0.02
STD a 1200 nm	0.03	0.03	0.03

Aunque los valores de RMSE fueran similares en los tres casos estudiados, los valores más bajos fueron obtenidos utilizando la modalidad de referencia “cada muestra”. Para dar una idea del orden de magnitud de los valores de RMSE para imágenes hiperespectrales, se indica que el RMSE para los píxeles de un solo análisis del ME es $2 \times 10^4 \mu\text{Log } 1/R$. Este valor está ligado evidentemente a propiedades inherentes al material en sí mismo y puede ser restado de los valores de RMSE obtenidos para las tres imágenes concatenadas. Así, los valores de RMSE asociados a la frecuencia de una referencia por cada analisis son de 2250, los asociados a la frecuencia de una referencia cada cinco muestras son de 2300 y, finalmente, los asociados a la frecuencia de una referencia cada diez muestras son de 2310.

Un comportamiento similar fue observado calculando la MD de una imagen concatenada al centro de la población. Los valores de MD fueron muy similares en los tres casos estudiados y no se observan diferencias debidas a la frecuencia de analisis de la referencia para los tres casos estudiados. En la Figura 24 se observan los valores de MD para cada

uno de los píxeles de cada imagen al centro de la población de la imagen concatenada y para cada modalidad de frecuencia estudiada.

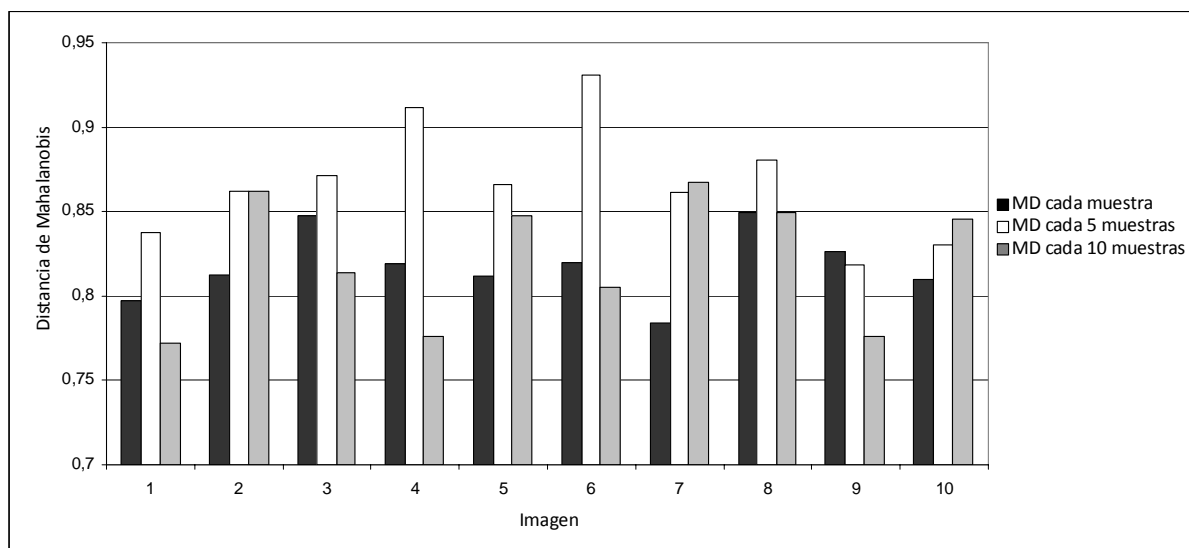


Figura 24. MD desde cada analisis al centro de la población para cada una de las modalidades de frecuencia de referencia.

Este análisis permitió establecer si la estabilidad del instrumento durante la adquisición de la imagen era influida en mayor o menor grado por la frecuencia de referencia. Las diferencias entre las distancias en cada analisis fueron menos marcadas dentro la modalidad ‘cada muestra’, con valores de desviación absolutos medios de 0.014. La modalidad ‘cada cinco muestras’ obtuvo un valor de 0.025 y, finalmente, la modalidad ‘cada diez muestras’ obtuvo una desviación entre las diferencias de 0.032. El analisis permitió por lo tanto confirmar que el aumenar la frecuencia de analisis de las ferencias influye positivamente sobre la estabilidad de las imágenes obtenidas.

Los valores de STD a la longitud de onda de 1520 nm son prácticamente idénticos para las tres modalidades de frecuencia de referencia y por esto se decidió modificar la longitud de onda considerada para el cálculo de la STD ya que, como anteriormente indicado (apartado 2.2.3), el detector del instrumento es calibrado por los fabricantes en $\lambda=1520$ nm. Esto nos hizo dudar si la medida de la estabilidad en esta longitud de onda fuera o meno fuitable y por ello se decidió calcular dicho estadistico a otra longitud de onda (1200 nm) importante en el analisis NIRS de harinas de origen animal [16]. Como se puede observar en la Tabla 7, los valores siguen siendo muy similares, confirmando

que las diferencias entre las STD no son significativas. La única excepción se encuentra en la modalidad “cada muestra” que es ligeramente inferior a los demás, hechos que confirman el resultado de los anteriores test.

2.3.3. CONDICIONES DE ILUMINACIÓN

Con el objetivo de detectar potenciales variaciones en la respuesta espectral debidas a la influencia por parte de la luz externa se realizó un ensayo similar al anterior, es decir, se calcularon los valores de RMSE y MD para tres diferentes condiciones de iluminación. Todas las muestras fueron analizadas con la modalidad de frecuencia de referencia ‘cada muestra’, y manteniendo una temperatura externa de 22 ° C±1. Además se calculó la MD de los análisis del SM al centro de la población de la imagen concadenada. Los resultados se reflejan en la Tabla 8.

Tabla 8. RMSE y MD para las tres modalidades de condiciones lumínicas.

	Luz	Oscuridad	Luz no controlada
RMSE $\mu\text{Log } 1/R$	2.08×10^4	1.77×10^4	2.56×10^4
MD	0.74	0.77	1.19

Los valores de RMSE indican que la menor variabilidad fue obtenida analizando las muestras en condiciones ambientales de oscuridad. La Figura 25 muestra los valores de MD de cada imagen al centro de la población de las diez imágenes concatenadas que pertenecen a los grupos "luz", "oscuridad" y "luz no controlada".

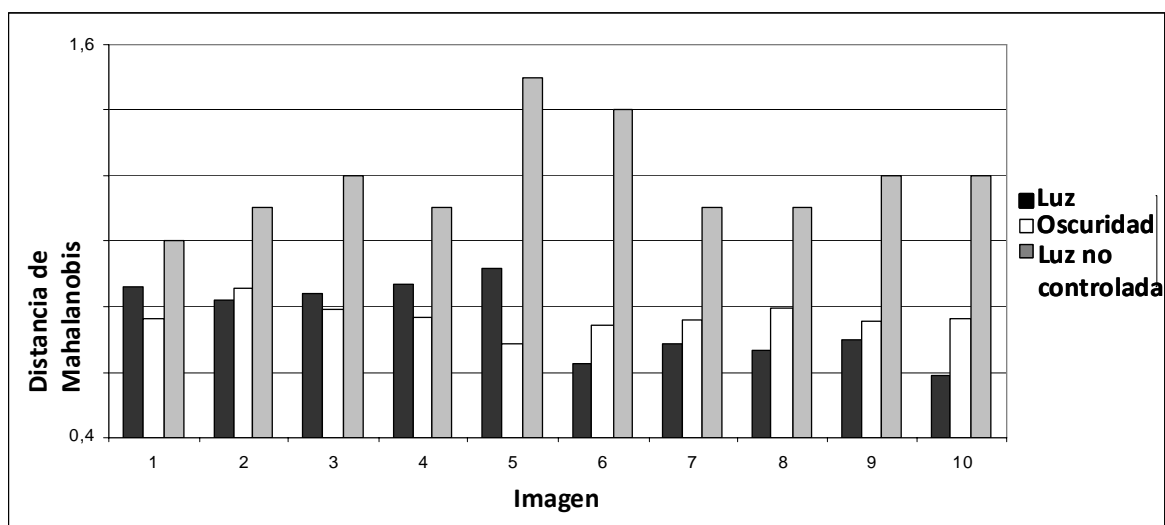


Figura 25. Valores promedio de MD desde cada imagen analizada en las tres condiciones de iluminación al centro de la población.

Los valores de MD mostraron que el modo "oscuridad" era el más estable, con un valor de promedio de desviaciones absolutas de 0.028, comparado con 0.103 para el modo "luz" y 0.110 para el modo "luz no controlada". Es interesante constatar que la presencia de iluminación externa no controlada incrementa la variabilidad entre imágenes provocando una disminución considerable en la estabilidad del análisis. El estudio confirmó la estrecha relación entre la calidad de espectro y las condiciones de iluminación externa, además de confirmar que la ausencia de luz en la habitación es aconsejable durante el análisis NIR-CI.

2.3.4. PRESENTACIÓN DE LA MUESTRA

La presentación de muestra es otro factor clave para la obtención de una imagen hiperespectral de la máxima calidad posible. El porta muestras debe ser escogido basándose en el principio de que hay que maximizar las diferencias entre zonas de muestra y de no muestra. La elección del material adecuado para ser utilizado como soporte tiene además que depender de la mayor o menor facilidad con la que se puedan eliminar bordes de la imagen y efectos de sombra. En muchos estudios de análisis de imagen, además, es muy importante la información proporcionada sobre los bordes de la muestra, aspecto relacionado con las aplicaciones de geometría de fractales en imágenes hiperespectrales [17]. La incorporación de información espacial mejora el resultado de las

clasificaciones basadas en los píxeles como se ha demostrado en estudios de teledetección [18] y en investigaciones desarrolladas en el campo de la medicina [19]. Estos aspectos pueden ser, en definitiva, clave para el análisis de harinas proteicas de origen animal.

La ventaja de poner la muestra sobre una superficie de metal, con propiedades de reflectancia no-difusa, como una placa de acero inoxidable, está en que este material tiene alta capacidad de absorber la radiación NIR y, en consecuencia, resulta claramente distinguible de cualquier tipo de muestra orgánica. No obstante, podría ocurrir que el uso de materiales alternativos más fácilmente aseQUIBLES y economicos sea más idóneo. Además, las placas de acero inoxidable tienen la desventaja de deteriorarse ya que suelen rayarse con los utensilios utilizados para dosificar y colocar la muestra. Por esta razón, se decidió desarrollar un ensayo específico de diferentes materiales para evaluar su idoneidad en terminos de facilidad de uso, coste y disponibilidad.

Como se ha indicado en el apartado 2.5 de este capítulo, para este ensayo se analizó una muestra real de MBM sobre cuatro porta muestras compuestos por cuatro diferentes materiales: porcelana, papel de lija, espejo de acero inoxidable y Teflón®.

En la Figura 26 (página siguiente) se pueden observar las imágenes de los cuatro porta muestras utilizados para analizar la muestra de MBM a la longitud de onda de 1520 nm. Los histogramas de los valores de absorbancia de los píxeles fueron estudiados para individuar la mejor opción en términos de minimizar los efectos de sombras y evitar clasificaciones incorrectas de los píxeles pertenecientes a los bordes de la muestra.

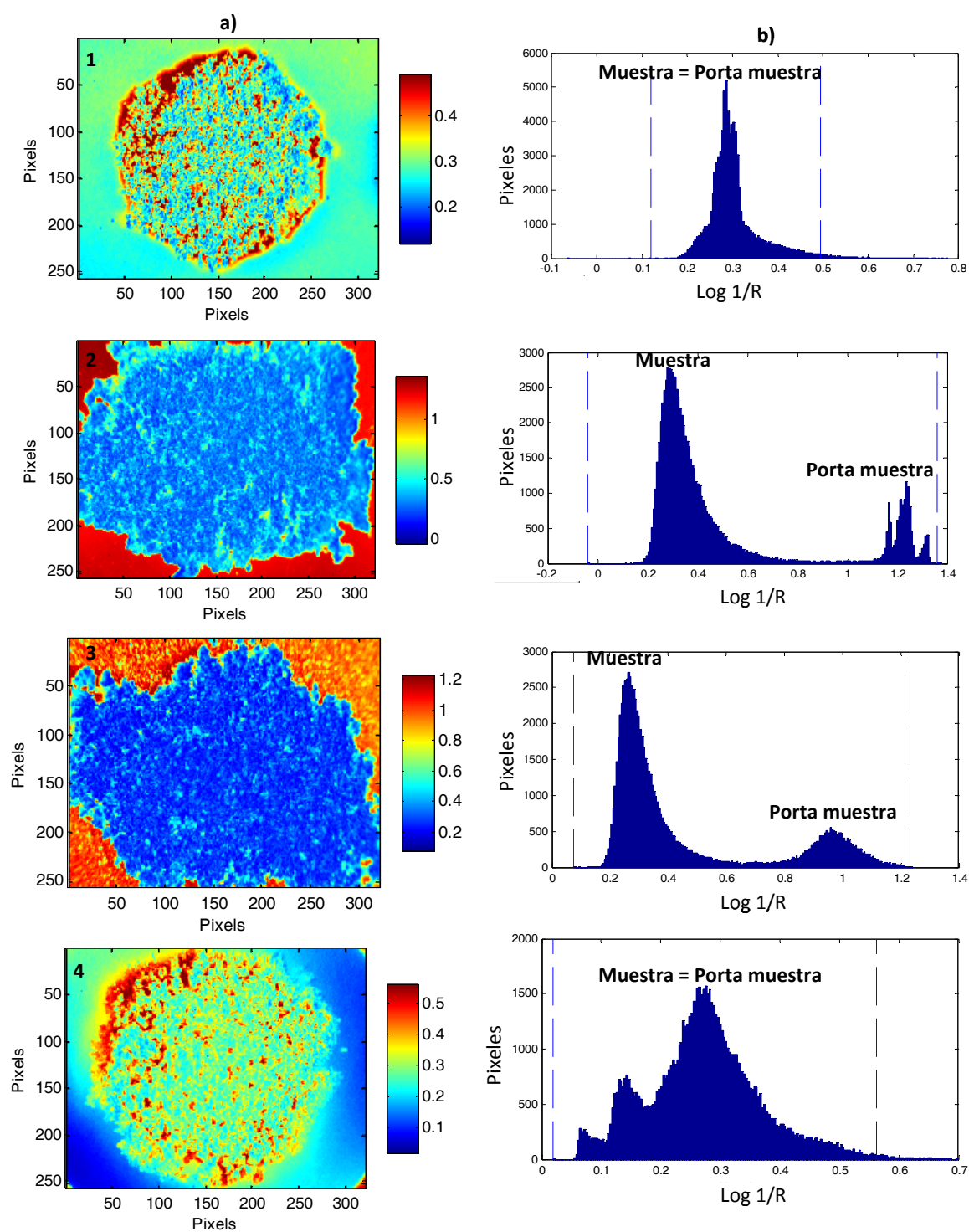


Figura 26. a) Imágenes de los valores de absorbancia ($\text{Log } 1/R$) de la muestra de MBM en los diferentes porta muestras: 1. Porcelana, 2. Espejo de acero, 3. Papel de lija y 4. Teflón. b) histogramas de las imágenes con los valores de absorbancia de muestra y porta muestras.

Los histogramas en NIR-CI, esto es, la representación de la intensidad a cada píxel en una imagen [20, 21], ofrecen una descripción clara y concisa de las características

globales de una imagen como la composición de la muestra y su homogeneidad. La forma estrecha y simétrica de un histograma, por ejemplo, indica una distribución de intensidades similares para todos los píxeles de la imagen, mientras que los histogramas de una imagen heterogénea tienen una distribución asimétrica y unos picos anchos.

Para la descripción exhaustiva de las propiedades de una imagen se suelen utilizar los valores de media, STD, coeficiente de curtosis y coeficiente de asimetría [22]. En el presente estudio, sin embargo, un análisis visual ha sido suficiente para determinar cuál de los cuatro materiales resulta más distinguible de la muestra, que es el objetivo perseguido a fin de establecer un protocolo para el análisis NIR-CI de harinas animales.

El uso del espejo de acero inoxidable y del papel de lija dieron lugar a histogramas con dos picos definidos, uno correspondiente a la muestra y el otro correspondiente al porta muestras. Esto indica que los píxeles de la muestra eran fácilmente distinguibles de los del porta muestras. La mayor separación entre los dos picos fue alcanzada con el porta muestras de acero inoxidable y esto confirma la viabilidad de este material para su uso en NIR-CI.

El análisis de los espectros indica una clara separación entre los píxeles de muestra y no muestra tanto en el caso del uso del papel de lija como en el del espejo de acero inoxidable. Con este último, sin embargo, la distancia entre los picos correspondientes a la muestra y al porta muestras tienen una mayor separación y esto lo convierte en el material más apto para una correcta definición de zonas de interés (ROI del inglés *Region Of Interest*). En efectos prácticos, dada la textura pulverulenta de las muestras de MBM, el espejo de acero inoxidable tiene la ulterior ventaja de limpiarse fácilmente y de poder ser reutilizado.

2.4. CONSIDERACIONES FINALES

En términos generales, los resultados del presente estudio revelan que la calidad de un análisis hiperespectral puede ser sustancialmente incrementada a través de la optimización de ciertas condiciones operacionales que pueden afectar a las imágenes adquiridas. En particular, las pruebas desarrolladas muestran que la adquisición de la

referencia negra se optimiza con el uso de un obturador (tapa) que cubra el objetivo, contrariamente a las especificaciones proporcionadas por los productores del instrumento. Otro parámetro optimizado fue la frecuencia con la que las referencias blanca y negra tienen que ser analizadas para que no haya variaciones en la respuesta espectral de las muestras.

En este sentido, los resultados obtenidos analizando las referencias antes y después de cada muestra fueron muy parecidos a los obtenidos con un análisis de las mismas cada diez análisis de las muestras. Este resultado llevó a la conclusión que, por cuestiones operacionales, esta última opción fuera la más indicada ya que el tiempo de análisis se reduce, en el caso del análisis de 10 muestras, de aproximadamente dos horas a menos de una hora. Las pruebas hechas para optimizar las condiciones de iluminación revelaron que el análisis de muestras en condiciones de oscuridad proporciona mayor estabilidad durante el análisis. Finalmente, se ha mostrado que el uso de un espejo de acero inoxidable como porta muestras es el más idóneo para el NIR-CI. Estos parámetros optimizados nos han permitido establecer un protocolo preciso, que puede ser recomendado utilizado el instrumento para el análisis NIR-CI de harinas proteicas.

2.5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Rust, S. R., Price, D. M., Subbiah, J., Kranzler, G., Hilton, G. G., Vanoverbeke D. L., Morgan, J. B. (2008). Predicting beef tenderness using near-infrared spectroscopy. *Journal of Animal Science*, 86:211-219.
- [2] <http://www.malvern.com/common/downloads/MRK747.pdf>. Visitada el 30 de octubre 2010.
- [3] Windham, W.R., Smith, D.P., Berrang, M.E., Lawrence K.C., Feldner P.W. (2005) Effectiveness of Hyperspectral Imaging System for Detecting Cecal Contaminated Broiler Carcasses. *International Journal of Poultry Science* 4 (9): 657-662.
- [4] Gowen, A.A., O'Donnell, C. P., Taghizadeh M., Gaston E., O'Gorman A., Cullen P. J., Frias J. M., Esquerre C., Downey G. (2008) Hyperspectral imaging for the investigation of quality deterioration in sliced mushrooms (*Agaricus bisporus*) during storage. *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety*, 2:133–143.
- [5] Williams, P., Geladi, P., Fox, G., and Manley, M. (2009). Maize kernel hardness classification by near infrared (NIR) hyperspectral imaging and multivariate data analysis. *Analytica Chimica Acta* Volume 653, Issue 2, 121-130.
- [6] Dubois, J., Lewis, E. N., Fry, F. S., Jr., & Calvey, E. M. (2005). Bacterial identification by near-infrared imaging of food specific cards. *Food Microbiology*, 22, 577–583.
- [7] Livens, S., Kleihorst, R. (2009). *Lecture Notes in Computer Science*, 5807, 577.
- [8] Burgess, G. and Hammond, J. (2007) Wavelength Standards for the Near-Infrared Spectral Region. *Spectroscopy*, 22 (4).
- [9] Mark, H. (2008) In *Handbook of Near-Infrared Analysis*. Third Edition. (Eds Donald A. Burns and Emil W. Ciurczak). CRC Press, 307-331.
- [10] Malvern Instrument. *MatrixNIR Operations Manual* (2005). Onley, MD, USA.
- [11] Burger, J., Geladi, P. (2006). Hyperspectral NIR image regression part II: Dataset preprocessing diagnostics. *Journal of Chemometrics*; 20: 106–119.
- [12] Clark, R. N., Swayze, G. A., Livo, K. E., Kokaly, R. F., King, T. V. V., Dalton, J. B., Vance, J. S., Rockwell, B. W., Hoefen, T., and McDougal, R. R. (2002).

- Surface Reflectance Calibration of Terrestrial Imaging Spectroscopy Data: a Tutorial Using AVIRIS. In Proceedings of the 10th Airborne Earth Science Workshop, JPL Publication 02-1.
- [13] Tan, A. (2009). Effect of noise on signals in in-vivo near infrared spectroscopy. <http://www.uwo.ca/biophysics/Undergrad/new/6wp/Near%20Infrared%20Spectroscopy.pdf>
- [14] Geladi, P., Burger, P., Lestander, T. (2004). Hyperspectral imaging: calibration problems and solutions. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, Volume 72, Issue 2, 209-217.
- [15] ElMasry, G., Wang, N., Vigneault, C., Qiao, J., ElSayed, A. (2008). Early detection of apple bruises on different background colors using hyperspectral imaging. *LWT - Food Science and Technology*, 41 (2), 337-345.
- [16] Garrido-Varo, A., Pérez-Marin, D., Guerrero, J.E., Boix, A, Slowikowski, B., Fernandez, J.A., Baeten, V. y Dardenne, P. (2008). Wavelength range optimization for multivariate discrimination of species in animal by-product meals analysed by NIR-microscopy. *Proceedings of the 11th international conference on chemometrics for analytical chemistry*, p. 103 Vol 4. Montpellier (France).
- [17] Crawford, T. W., Commito, J. A., Borowik, A. B. (2006). Fractal characterization of *Mytilus edulis* L. spatial structure in intertidal landscapes using GIS methods. *Landscape Ecology*, Vol. 21, pp. 1033-1044.
- [18] Segl, K., Roessner, S., Heiden, U., Kaufmann, H. (2003). Fusion of spectral and shape features for identification of urban surface cover types using reflective and thermal hyperspectral data. *ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing* 58 (1-2), 99-112.
- [19] Soltanian-Zadeh, H., Rafiee-Rad, F., Pourabdollah-Nejad, D.S. (2004). Comparison of multiwavelet, wavelet, Haralick, and shape features for microcalcification classification in mammograms. *Pattern Recognition* 37 (10).
- [20] Cairós Barreto, C. (2009). Espectroscopia de imagen en el infrarrojo próximo. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.
- [21] Seul, M., O’Gorman, L., Sammon, M.J. (2000). Practical algorithms for image analysis: description, examples, and code. 21-37. Cambridge University Press.

- [22] Joanes, D. N., Gill, C. A. (1998) Comparing measures of sample skewness and kurtosis. *Journal of the Royal Statistical Society. The Statistician* 47, 183–189.

CAPÍTULO 3. EVALUACION DE LA REPETIBILIDAD ESPECTRAL DE LAS IMÁGENES HIPERESPECTRALES

3.1. OBJETIVOS

El objetivo de este estudio es estudiar la origen de la información proporcionada por una imagen híperespectral, es decir, si la variabilidad espectral entre píxeles esta relacionada a características físico-químicas de la muestra estudiada o si depende de otros factores y en que promoción. Para ello, se analizó el comportamiento entre muestras y submuestras para evaluar la cantidad de información que una imagen híperespectral puede aportar partiendo del presupuesto que, a diferencia de la espectroscopia tradicional, el NIR-CI permite adquirir información sobre una gran cantidad de partículas de la muestra describiendo en una sola imagen la variabilidad de muchas características de una muestra. Esta gran cantidad de información disponible puede hacer que el número de muestras necesarias para construir un modelo discriminante robusto pueda ser inferior con respecto al número mínimo de muestras que tradicionalmente se considera óptimo para un análisis NIRS.

3.2. METODOLOGÍA

3.2.1. MUESTRAS PERTENECIENTES AL BANCOS DE ALIMENTOS VALORADOS DE LA UCO

El material experimental utilizado en esta tesis pertenece al Banco de Alimentos Valorados de la UCO y está constituido por 170 muestras de harinas puras (cerdo, ave, rumiante, pescado) procedentes de distintas fábricas y 126 muestras experimentales

(elaboradas en el Departamento de Producción Animal de la UCO [1]) compuestas por harinas de composición binaria (pescado y rumiante en distintas proporciones).

De las muestras reales se disponía de la información proporcionada por la empresa suministradora sobre los índices de temperaturas alcanzadas durante el proceso, la presión y el tiempo correspondientes a la etapa de esterilización y el rendimiento en harina y grasa de cada una de las muestras.

En cuanto a las muestras experimentales, estas fueron diseñadas y preparadas para tratar de identificar y cuantificar porcentajes de harina de rumiante como contaminante de HP. Para su elaboración se utilizaron muestras reales procedentes de la industria. Para el diseño de los porcentajes de cada especie en las mezclas finales se tuvo en cuenta el objetivo de la detección del nivel de contaminación en muestras de pescado con harinas de rumiantes, por lo que se decidió establecer como límite máximo para este constituyente el nivel del 16%*.

Todas las muestras fueron analizadas en forma molida. La molienda se llevó a cabo con un molino ciclónico (CYCLOTEC), hasta el tamaño de partícula de 1 mm (Figura 27). Para el envasado de las muestras se utilizaron bolsas de aluminio y polietileno multicapas (PET/ALU/PE) selladas al vacío. Las muestras así envasadas estaban colocadas en contenedores de plástico ordenadas por su número de referencia y almacenadas en una cámara refrigerada a 4 °C de temperatura y 10% de humedad relativa.



Figura 27. Presentación de una muestra de harina de carne en forma molida para el análisis NIR-CI.

Para el estudio descrito en el presente capítulo se analizaron dos replicas de un total de 12 muestras: 3 muestras de harinas puras de rumiante, 3 muestras de cerdo, 3 muestras de ave y 3 muestras de mezcla de pescado con rumiantes. Estas últimas tenían la siguiente composición:

- Mezcla 1: 99% pescado, 1% rumiante.
- Mezcla 2: 94% pescado, 6% rumiante.
- Mezcla 3: 87.75% pescado, 12,25% rumiante.

Se analizó 1 gr. de cada muestra utilizando el protocolo puesto a punto en el capítulo 2 de esta tesis. Entre dos submuestras se agitó la bolsa de manera que, por cada submuestra, se cogiesen partículas diferentes para posteriormente estudiar la variabilidad entre distintas partículas de la misma muestra.

3.2.2. TRATAMIENTO DE DATOS HIPERESPECTRALES

Distancia de Mahalanobis

Entre los distintos métodos utilizados por varios autores [2, 3], se decidió evaluar en nuestro ensayo, la MD de todos los píxeles a sus respectivos centros poblacionales. El cálculo de esta distancia se detalla en el capítulo 2 de esta memoria. Entre los varios métodos disponibles para calcular la distancias entre espectros se ha optado por el basado en la MD dado que es un parámetro comúnmente utilizado en la espectroscopía NIR para el estudio de poblaciones (ej. cálculo de distancias de espectros al centro de la población o distancia entre muestras) desde la definición y puesta a punto por Shenk y Westerhaus [4], de los conceptos de distancia global (GH) al centro y distancia de vecinos (DV).

Una vez obtenidas las 24 imágenes (2 repeticiones por cada una de las 12 muestras), se pasó a calcular la MD desde cada píxel de cada imagen al centro de la población de cada imagen. Por cada submuestra, primero se calculó el centro de la población (centroide) considerando los primeros tres componentes principales (PCs), con los cuales se explicaba el 99% de la variabilidad. Luego se calculó la distancia de cada píxel de las 24

submuestras a cada centroide. Finalmente se calculó media y desviación estándar (STD) de las distancias de los píxeles pertenecientes a cada imagen para caracterizar cada submuestra con un solo valor y resumir la información procedente de los 60480 píxeles de cada submuestra.

Comparación entre covarianzas

Una alternativa para comparar dos grupos de datos es el cálculo de los parámetros S (pendiente) y r² (coeficiente de determinación) obtenidos tras calcular la regresión lineal de las matrices de covarianza de dos grupos de datos expresada como:

$$Cov(y, y) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) = \frac{1}{n} \sum_{i,j} x_i \cdot y_i n_{ij} - \bar{x}\bar{y},$$

Este método fue originalmente definido por Riccioli et al. [5] y ha sido utilizado así mismo para comparar subcolectivos de píxeles seleccionados con el colectivo de procedencia. Para poder cotejar los espectros de los píxeles de una imagen con otra se procedió a la conversión de las matrices a vectores. Posteriormente se calculó el ajuste de curva y los coeficientes de la regresión entre vectores para comparar replicas entre ellas y muestras de la misma especie entre ellas.

Índice de Diferencia Relativa (RD%)

Anderson y Peleg [6] compararon varios índices para determinar unos valores límites de diferencias entre dos imágenes obtenidas con sensores remotos. Uno de ellos es el índice de diferencia relativa (RD%). La misma estrategia utilizada en teledetección para garantizar la repetibilidad podría resultar útil en imágenes hiperespectrales procedentes de un sensor de laboratorio. El RD% se define como:

$$RD\% = \frac{[Log1/R_{\lambda_1} - Log1/R_{\lambda_2}] \times 100}{[media(Log1/R_{\lambda_1}) + media(Log1/R_{\lambda_2})] / 2} \%,$$

Donde el numerador es el valor absoluto de la diferencia entre dos espectros repetidos y el denominador es la media de las señales repetidas. En este estudio se aplicó el cálculo de RD% a las imágenes híperespectrales de las harinas animales analizadas.

Uso del Análisis Anidado de la Varianza (ANOVA Anidado).

Candolfi et al. [7] utilizaron el ANOVA anidado para investigar la influencia de varias fuentes de error en un proceso industrial a través del estudio de la varianza en espectros NIRS.

En el presente estudio, con el objetivo de estudiar el origen de la variabilidad entre imágenes híperespectrales, se aplicó un análisis PCA a un conjunto de 24 muestras divididas en cuatro grupos según la especie de origen. Una vez obtenidos las nuevas coordenadas, se tomaron en consideración los primeros diez componentes principales (PCs) y se aplicó un análisis ANOVA anidado de cuatro niveles para cada PC considerando los siguientes factores o niveles:

1. Especie: 1. Rumiante, 2. Cerdo, 3. Ave y 4. Mezcla
2. Muestra: Por cada especie se analizaron tres muestras. En el caso de la especie Mezcla, cada muestra tenía una proporción diferente de pescado y rumiante:

Muestra I. 99% pescado, 1% rumiante.

Muestra II. 94% pescado, 6% rumiante.

Muestra III. 87.75% pescado, 12,25% rumiante

3. Réplica: Para cada muestra se analizaron dos réplicas.
4. Píxel: A través del método de interpolación espacial se seleccionaron 160 píxeles por cada imagen manteniendo la variabilidad espacial.

La varianza total fue descompuesta mediante un diseño anidado en el que se consideraron los efectos jerárquicos de: Especie, Muestra, Réplica y Píxel. El modelo creado tenía la siguiente estructura:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_{ij} + \delta_{ijk} + \varepsilon_{ijk\lambda},$$

Siendo:

μ : Media total.

α_i : “Efecto” de la especie i .

β_{ij} : “Efecto” de la muestra j dentro de la especie i .

δ_{ijk} : “Efecto” de la replica k dentro de la muestra j .

$\varepsilon_{ijk\lambda}$: “Efecto” de del píxel λ dentro de la réplica k .

Las varianzas δ^2 tienen una distribución normal y la hipótesis nula es que no hay diferencias entre las varianzas.

Análisis “cluster” de imágenes hiperespectrales

Entre las estrategias existentes para el estudio del comportamiento de los píxeles en una imagen existen varios métodos no supervisados útiles para estudiar la relación de un píxel con sus vecinos. Entre ellos, los algoritmos de agrupamiento se basan en un procedimiento de agrupación de una serie de vectores de acuerdo con un criterio de cercanía [8]. Los vectores de un mismo grupo comparten propiedades comunes y el conocimiento de los grupos puede permitir una descripción sintética de un conjunto de datos multidimensional complejo. Entre los varios algoritmos de análisis de cluster disponibles se utilizó el llamado “de particionamiento” debido a su empleabilidad con grandes bases de datos como son las imágenes hiperespectrales. El número de grupos o *clusters* se determina de antemano y las observaciones se van asignando a los grupos en función de su cercanía [9]. El algoritmo crea una partición de las observaciones minimizando una función de costo:

$$\sum_{j=1}^k E(C_j),$$

Donde k es el número de clusters, C_j es el j cluster y $E: C \rightarrow R^+$ es la función de costo asociada al cluster. El algoritmo más famoso es el k -means [10], cuyo objetivo es minimizar la varianza total intraclusters. El algoritmo k -means tradicional asigna de forma iterativa cada punto de datos al cluster con el centroide más cercano y actualiza el centroide de las muestras en cada grupo. Sin embargo, el rendimiento de K-means puede disminuir significativamente cuando el tamaño de las variables es alto [11]. Para abordar este problema una manera sencilla es proyectar los datos multidimensionales en un subespacio compuesto por un número inferior de dimensiones a través del algoritmo de análisis de componentes principales (PCA). A continuación, se calcula K -means en el nuevo subespacio. Esta técnica llamada análisis discriminante por *clusters* (DCA) es la que se utilizó en este estudio. El análisis DCA de una imagen permite obtener rápidamente un mapa de la imagen con la información relativa a los grupos de píxeles que resultan del análisis de *clusters*. El algoritmo DCA ha sido utilizado para discriminar distintas zonas de una imagen tanto en campo medico como en teledetección [12, 13], tanto a nivel multiespectral como hiperespectral demostrando su viabilidad para el analisis discriminante en NIR-CI.

En este estudio, el analisis DCA fue aplicado a cuatro muestras, una por cada clase estudiada entre cerdo, ave y mezcla rumiante y pescado. El objetivo fue el estudio del comportamiento de los *clusters* de las imágenes de las distintas harinas animales. En particular se quiso investigar posibles agrupamientos comunes a todas las imágenes que podían estar relacionados con propiedades externas a las muestras.

Las muestras se eligieron aleatoriamente entre las 24 disponibles en la base de datos inicial. A estas muestras se le aplicó un análisis DCA considerando la totalidad de los píxeles (60840 por cada imagen). El número de *clusters* asignado fue de dos (mínimo) a seis (máximo). El valor máximo de seis fue elegido teniendo en cuenta el tiempo computacional que, a partir de siete *clusters*, aumentaba de manera exponencial impidiendo el desarrollo de los cálculos.

3.3. RESULTADOS

En el capítulo 2 de esta memoria, se ha observado cómo el indicador RMSE, aplicado a imágenes híperespectrales, no es efectivo ya que está ligado a las propiedades inherentes al material que compone la muestra más que a diferencias entre escaneos sucesivos. De aquí la exigencia de encontrar otros tipos de índices que aporten información sobre la variabilidad entre píxeles, entre muestras, entre especies, así como el origen de esta variabilidad. A continuación se muestran los resultados de la aplicación de varios índices cuya función es caracterizar la respuesta espectral de imágenes procedentes de harinas animales.

3.3.1. REPETIBILIDAD DE IMÁGENES HIPERESPECTRALES DE UN MATERIAL INORGÁNICO

Una vez optimizadas las condiciones de análisis como descrito en el capítulo 2 de esta memoria, se hacía necesario evaluar si las mismas nos ayudaban a obtener imágenes híperespectrales de alta repetibilidad. Para ello, en primer lugar se analizó un ME blanco (Spectralon, Labsphere, Inc., North Sutton, NH), el mismo utilizado para los ensayos descritos en el capítulo 2 de esta memoria. Se analizó el material dos veces creando dos imágenes y se compararon entre ellas en cada longitud de onda desde 1100 hasta 1600 nm (cada 10 nm) para investigar la posible existencia de diferencias de repetibilidad entre bandas. En la Figura 28, a modo de ejemplo, se representa el diagrama de dispersión de los píxeles de las dos imágenes a la longitud de onda de 1110 nm.

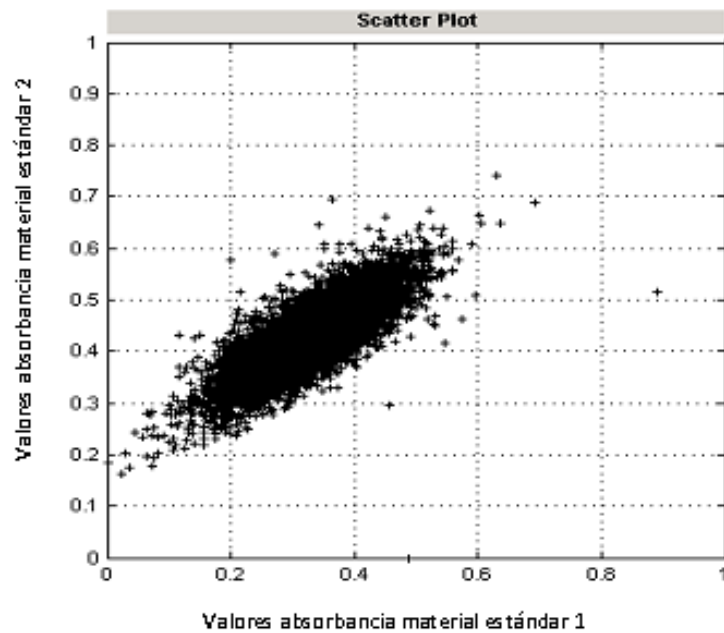


Figura 28. Diagrama de dispersión de los valores de absorbancia de dos replicas del ME (ME1 1 y ME 2) a la longitud de onda de 1110 nm.

Idealmente los valores de intensidad para las dos replicas, en adelante r_1 y r_2 , deberían ser los mismos, y la nube de puntos debería coincidir con una línea recta. El diagrama de dispersión, sin embargo, demuestra gráficamente la variabilidad de los datos tomados entre dos diferentes adquisiciones en la misma banda espectral y con pocos minutos de diferencia entre las dos capturas realizadas. Aproximadamente el mismo efecto se obtuvo en cada longitud de onda.

Del diagrama de dispersión de la Figura 28, además, se pueden observar píxeles separados de la nube central. Estos representan los píxeles “defectuosos” cuyos valores varían aleatoriamente. Es por lo tanto muy importante excluir estos píxeles antes de cualquier tratamiento de la imagen.

Además de las diferencias entre los valores de los píxeles analizados en momentos diferentes con iguales coordenadas de localización superficial, no hay que olvidar que la mayor parte de los materiales sufren los efectos provocados por una iluminación no homogénea. En el caso del instrumento MatrixNIR, la luz es proporcionada por cuatro lámparas halógenas que emiten una luz filtrada con lentes polarizadas. Las pruebas efectuadas durante la optimización del instrumento (capítulo 2) llevaron a disminuir

considerablemente las variaciones debidas a la iluminación. A pesar de ello, los efectos de diferencias en la intensidad lumínica son visibles en la Figura 29 donde se indican 50 espectros de reflectancia por cada zona de la imagen.

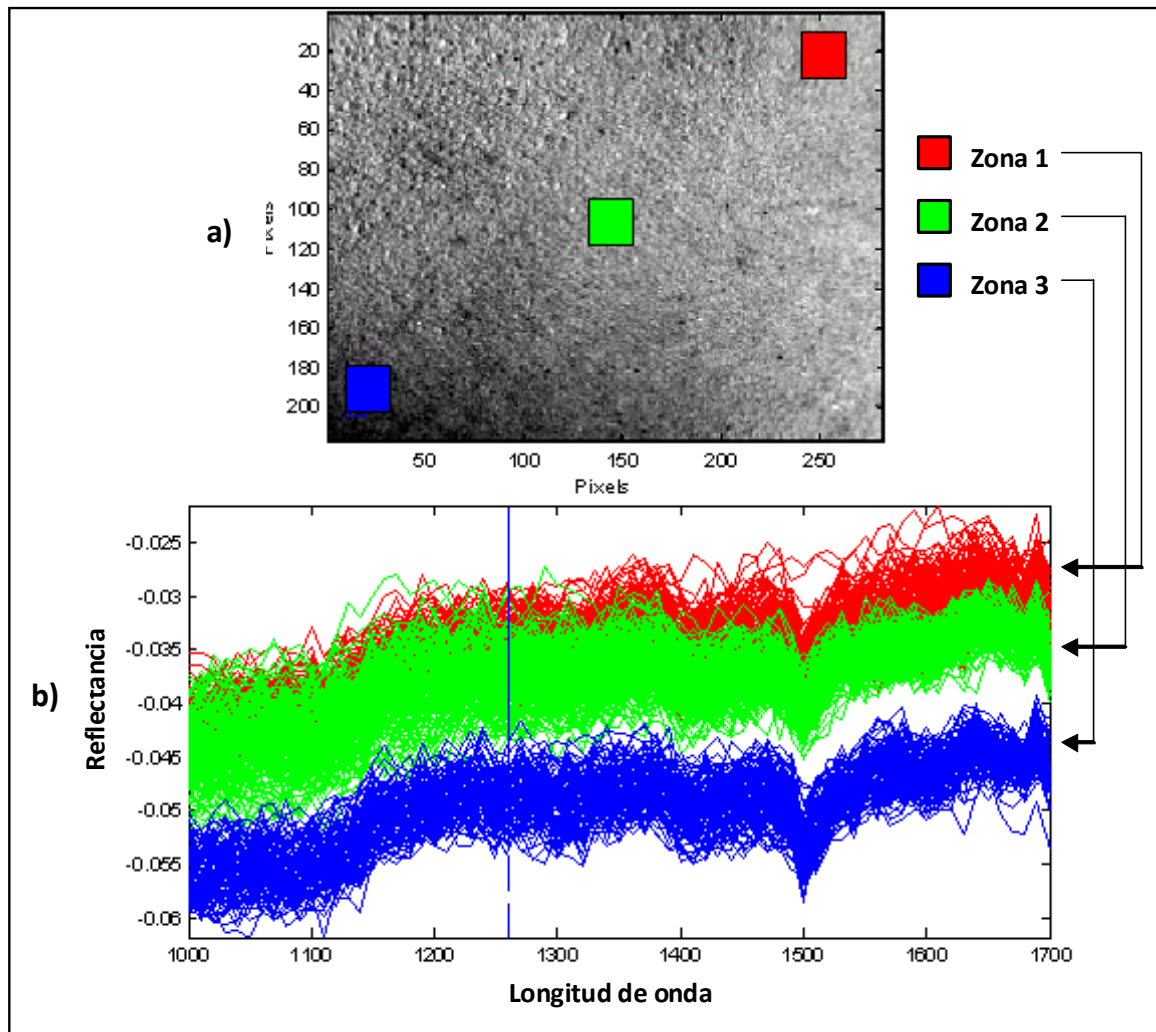


Figura 29. a) Imagen en escala de grises del ME a 1260 nm. b) espectros de reflectancia correspondientes a tres diferentes zonas de la imagen.

De la representación gráfica de los espectros se puede observar la existencia de cierta variabilidad en las diferentes zonas de la imagen. Los espectros correspondientes a los píxeles de la zona 1 presentan valores de reflectancia superiores a los de las zonas 2. Los píxeles de la zona 3 finalmente tienen valores de reflectancia aun inferiores, claramente

debido a diferencias en la interacción de la superficie del material con la fuente de iluminación.

Para cuantificar esta variabilidad se pueden utilizar varios métodos, uno de ellos es el cálculo de las distancias entre píxeles, por lo que, como paso previo al análisis de nuestro material de estudio, es decir, harinas de origen animal, se calculó la MD de todos los píxeles del material estándar r al centro de su población. El programa ISYS permitió obtener un mapa relativo a las distancias de Mahalanobis (MD) de cada píxel. La Figura 30 muestra los resultados.

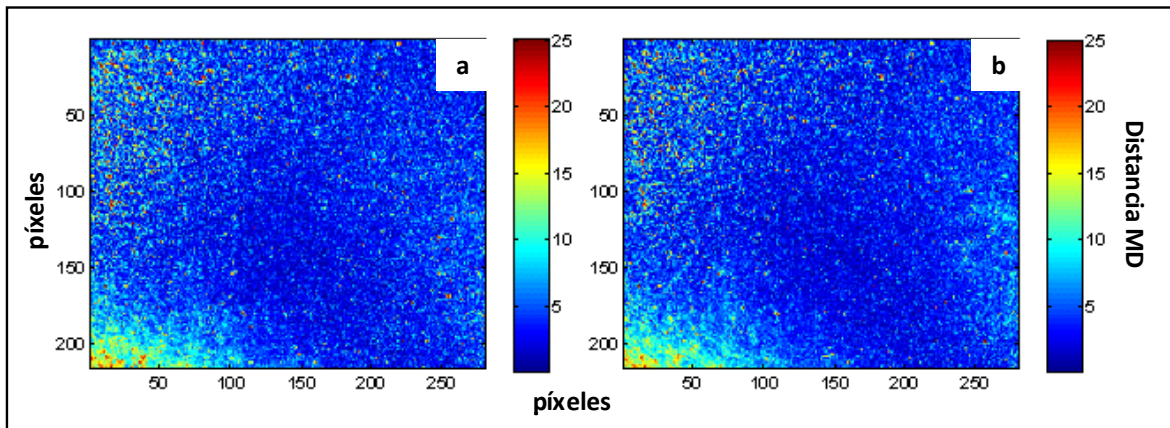


Figura 30. a: mapa de las distancias de Mahalanobis de los píxeles de r_1 al centro de su población. b: mapa de las distancias de Mahalanobis de r_1 al centro de la población de r_2 .

El valor medio de la MD de los píxeles de la imagen r_1 a su centro fue 1.12 y su STD = 0.54. En el caso de dos imágenes distintas del mismo material, es decir, calculando la distancia de los píxeles de la imagen r_1 al centro de la imagen r_2 se obtuvo un valor medio de 1.22 y STD = 0.57. Los píxeles de una imagen resultaron, por lo tanto, ser igualmente parecidos entre sí y entre los píxeles de una segunda repetición del material estándar. Los resultados hasta aquí obtenidos muestran que existe gran variabilidad en la intensidad de píxeles dentro de una imagen y que hay baja variabilidad entre análisis sucesivos del mismo material.

Estudiando el mapa de distancias de las dos imágenes en la Figura 30, también se puede observar que los puntos con menor distancia al centro de la población se localizan para ambas imágenes en la misma zona, y que los puntos más distantes correspondían con

zonas de menor reflectancia en la Figura 29 demostrando que variaciones debidas a la interacción entre la fuente de luz y la muestra afectan a la respuesta espectral de las imágenes hiperespectrales aumentando la variabilidad.

A continuación, se calcularon los parámetros S y r^2 , descritos anteriormente, para las dos imágenes del material estándar. El resultado de la comparación entre las matrices de covarianza dio un valor de $r^2=0.99$ y $S=1.04$. Considerando que $r^2 \text{ max}=1.00$ y $S \text{ max}=1$, los resultados mostraron que el material es muy homogéneo a pesar de las no uniformidades en la superficie detectadas a través del calculo de la distancia MD.

La comparación de dos replicas del material de referencia a través del RD%, dio como resultado un mapa de valores que se representan en la Figura 31.

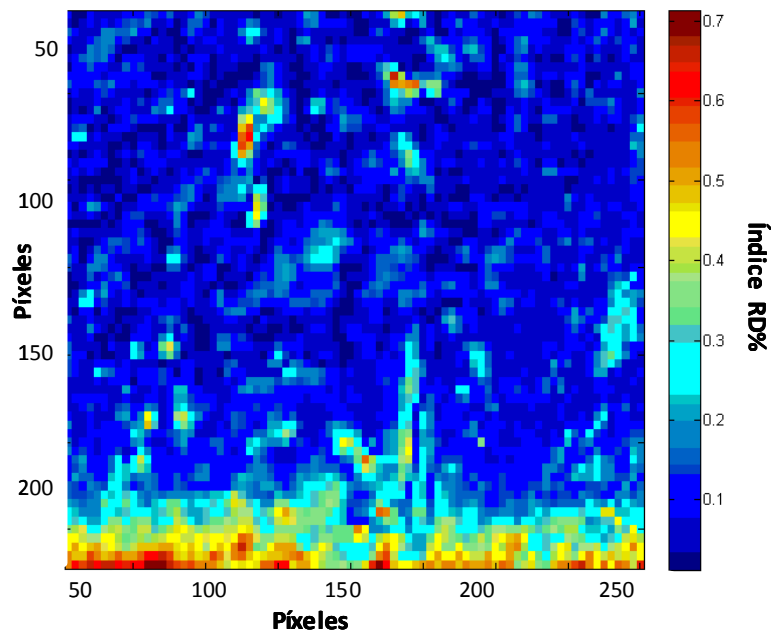


Figura 31. Mapa de RD% entre los píxeles de r_1 y r_2 .

Los valores de RD% resultaron en general muy bajos alcanzando valores máximos de 0.7% de diferencia entre los píxeles de r_1 y r_2 . El RD% medio entre los píxeles de las dos replicas del material estandar fue de 0.13%, confirmando la baja variabilidad de los píxeles del material estándar. De acuerdo con los valores de MD, se confirma que las mayores diferencia se verifican en la parte baja de la imagen aunque en este caso los valores más altos de RD% se distribuyen a lo largo de toda la parte inferior de la imagen

a diferencia de los valores de MD (Figura 28) que se localizan en una esquina de la parte inferior de la imagen.

Los resultados relativos al RD% puede ser útiles para tomar decisiones a la hora de prescindir de píxeles de la imagen, para disminuir el número de datos y así agilizar los cálculos.

3.3.2. CÁLCULO DE LAS DISTANCIAS DE MAHALANOBIS ENTRE PÍXELES DE MUESTRAS Y REPLICAS DE HARINAS DE ORIGEN ANIMAL

Una vez comprobada la eficacia de los distintos índices en muestras de material inorganico, quisimos avanzar en el conocimiento de la repetibilidad de las imágenes de muestras de Harinas animales. En la Figura 32 se pueden observar las imagenes de los valores de las distancias entre los píxeles de dos replicas. En este ensayo se utilizaron dos replicas (*a* y *b*) de doce muestras de harinas animales.

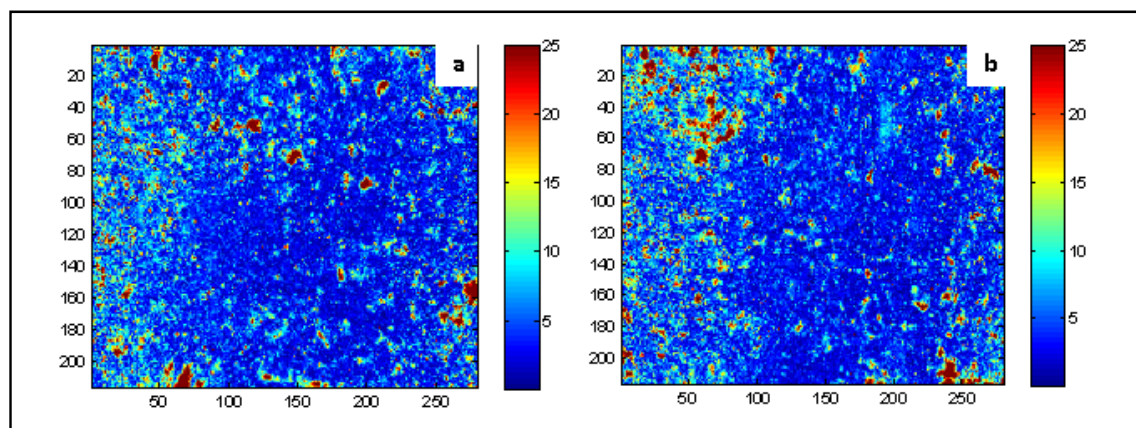


Figura 32. a: Mapa de las distancias de Mahalanobis de la imagen de la muestra 1a al centro de su población. b: Mapa de las distancias de Mahalanobis de la imagen de la muestra 1b a 1a.

Los valores de distancia de los píxeles fueron utilizados como índices de similitud entre imágenes. Tanto el valor medio de las distancias como su STD resultaron parecidos en *a* y *b* demostrando que la variabilidad entre replicas no es mayor que la variabilidad entre píxeles. Tanto en la Figura 30 como en la Figura 32 se puede apreciar una zona de menores distancias correspondiente con el centro de la imagen. Esto demuestra una relación entre las diferentes respuestas de los píxeles a la radiación y las diferentes zonas

de la imagen. En la hipótesis de un estudio sobre la homogeneidad superficial de una muestra, por ejemplo si quisiéramos saber si una clase de harina esta bien distribuida en una mezcla, las imágenes resultantes del cálculo de las MD podrían ser utilizadas para ulteriores análisis no supervisados (PCA o análisis de *clusters*).

Para poder estudiar y comparar la variabilidad entre muestras diferentes y entre especies diferentes, se calcularon todas las distancias tomando como centro de la población cada una de las muestras y replicas de las mismas. Las distancias medias de todas las muestras entre sí están representadas en la Tabla 9. En la Tabla 10 se muestran las STD de las distancias útiles para estudiar la homogeneidad de las intensidades de las muestras.

Tabla 9. Distancias de Mahalanobis medias de los píxeles de cada muestra al centro de población de cada muestra (página siguiente).

	Centr.	Rumiante						Cerdo						Ave						Mezcla					
		1a	1b	2a	2b	3a	3b	1a	1b	2a	2b	3a	3b	1a	1b	2a	2b	3a	3b	1a	1b	2a	2b	3a	3b
Rumiante	1a	1.5	1.5	3.8	4.3	22.1	19.5	2.7	2.8	2.6	2.5	2.4	2.3	4.7	4.0	5.1	4.2	4.2	4.4	7.4	7.3	8.2	9.5	7.6	8.0
	1b	1.5	1.5	3.1	3.5	22.4	19.8	2.3	2.3	2.1	2.1	2.0	1.9	4.1	3.3	4.3	3.4	3.5	3.9	6.0	5.9	6.6	7.7	6.2	6.5
	2a	3.3	3.0	1.5	1.7	25.2	22.7	3.5	3.1	3.3	3.3	2.7	2.7	4.2	3.1	4.1	3.6	3.9	4.5	4.2	4.1	5.1	6.1	5.2	4.8
	2b	3.2	2.9	1.4	1.5	23.8	21.5	3.1	2.8	3.0	3.0	2.5	2.5	3.7	2.7	3.6	3.2	3.5	4.0	3.6	3.5	4.2	5.1	4.5	4.0
	3a	11.5	11.3	11.4	11.3	1.5	2.0	10.9	10.8	10.8	10.9	11.3	11.2	1.1	10.5	10.6	10.6	10.4	10.3	13.0	13.1	13.1	13.3	13.1	13.4
	3b	7.9	7.8	8.7	8.7	2.0	1.5	7.4	7.4	7.4	7.4	7.8	7.8	7.4	7.6	7.4	7.3	7.2	7.0	9.9	9.9	9.8	10.2	9.2	10.0
Cerdo	1a	2.1	1.9	2.9	3.0	18.4	16.2	1.5	1.4	1.4	1.4	1.8	1.8	2.7	2.1	2.9	2.2	2.2	2.5	5.1	5.1	5.4	6.3	5.1	5.4
	1b	2.4	2.1	2.8	3.0	18.7	16.4	1.6	1.4	1.4	1.5	1.9	1.9	2.9	2.0	2.9	2.2	2.2	2.5	5.1	5.0	5.5	6.5	5.2	5.5
	2a	2.4	2.1	2.8	3.0	19.2	16.7	1.7	1.5	1.4	1.5	1.9	1.9	3.1	2.3	3.2	2.4	2.4	2.7	5.4	5.3	5.9	7.1	5.5	5.9
	2b	2.2	1.9	2.6	2.8	17.6	15.3	1.6	1.5	1.4	1.4	1.8	1.8	3.0	2.2	3.0	2.3	2.3	2.6	5.0	4.9	5.5	6.6	5.1	5.5
	3a	1.7	1.4	2.0	2.3	16.0	14.1	1.6	1.5	1.4	1.4	1.4	1.4	2.9	2.2	2.9	2.3	2.4	2.7	4.3	4.2	4.8	5.8	4.5	4.7
	3b	1.6	1.4	2.0	2.2	17.2	15.3	1.6	1.5	1.4	1.4	1.4	1.4	2.7	2.0	2.8	2.3	2.3	2.7	4.3	4.2	4.7	5.5	4.5	4.6
Ave	1a	1.1	1.0	1.9	1.9	11.4	10.2	0.9	0.8	0.7	0.8	1.1	1.1	1.2	0.9	1.1	0.9	0.9	1.1	3.1	3.1	2.8	3.0	2.8	3.1
	1b	2.7	2.4	2.2	2.2	16.5	14.7	1.7	1.5	1.7	1.7	1.9	2.0	2.2	1.5	2.0	1.6	1.7	2.1	3.9	3.9	4.1	4.8	3.9	4.2
	2a	2.4	2.1	1.9	1.8	9.6	8.5	1.6	1.4	1.5	1.5	1.7	1.8	1.6	1.2	1.4	1.3	1.3	1.5	2.7	2.7	2.7	3.2	2.6	2.8
	2b	2.5	2.2	2.2	2.2	13.1	11.5	1.6	1.3	1.4	1.5	1.8	1.9	1.9	1.3	1.7	1.4	1.4	1.7	3.4	3.4	3.6	4.2	3.4	3.6
	3a	2.4	2.2	2.3	2.3	12.3	10.9	1.5	1.3	1.4	1.5	1.8	1.9	1.9	1.4	1.8	1.4	1.4	1.6	3.9	3.9	4.1	4.7	3.7	4.1
	3b	1.4	1.4	2.4	2.4	11.5	10.2	1.1	1.0	0.9	1.0	1.4	1.4	1.4	1.2	1.3	1.1	1.0	1.1	3.5	3.6	3.3	3.5	3.1	3.6

	Centr.	Rumiante						Cerdo						Ave						Mezcla					
		1a	1b	2a	2b	3a	3b	1a	1b	2a	2b	3a	3b	1a	1b	2a	2b	3a	3b	1a	1b	2a	2b	3a	3b
Mezcla	1a	5.1	5.0	3.6	3.6	32.4	29.4	5.3	5.1	5.5	5.3	4.8	4.7	6.0	5.0	5.9	5.4	5.9	6.5	1.4	1.4	1.9	2.8	3.4	1.6
	1b	5.4	5.3	3.9	4.0	34.7	31.5	5.7	5.5	5.9	5.8	5.1	5.1	6.5	5.4	6.4	5.9	6.4	7.0	1.5	1.4	2.2	3.1	3.7	1.8
	2a	4.6	4.4	3.6	3.5	22.7	20.6	4.3	4.1	4.4	4.4	4.1	4.1	4.6	3.9	4.4	4.1	4.5	4.9	1.5	1.6	1.3	1.9	2.5	1.4
	2b	2.3	2.3	1.2	1.2	18.6	16.9	2.9	2.8	2.9	2.8	2.3	2.3	3.3	2.7	3.2	3.0	3.3	3.7	1.0	1.0	0.9	1.1	1.9	0.9
	3a	1.8	1.6	0.9	0.9	7.3	6.6	1.8	1.6	1.6	1.6	1.5	1.5	1.8	1.4	1.5	1.5	1.6	1.8	0.8	0.9	0.8	1.1	1.1	0.8
	3b	5.2	5.1	3.9	3.8	29.2	26.5	5.2	5.0	5.3	5.2	4.8	4.8	5.7	4.8	5.5	5.2	5.6	6.1	1.5	1.5	1.6	2.3	3.1	1.4

Tabla 10. Desviaciones estándar de las distancias de Mahalanobis de cada muestra al centro de población de cada muestra.

	Centr.	Rumiante						Cerdo						Ave						Mezcla (1%, 6%, 12,25%)					
		1a	1b	2a	2b	3a	3b	1a	1b	2a	2b	3a	3b	1a	1b	2a	2b	3a	3b	1a	1b	2a	2b	3a	3b
Rumiante	1a	0.7	0.8	1.1	1.3	2.4	2.4	1.1	1.1	1.0	1.0	1.1	1.1	2.2	1.4	2.1	1.5	1.6	1.8	1.7	1.6	1.9	3.3	2.2	1.8
	1b	0.7	0.7	1.0	1.2	2.4	2.5	1.0	1.0	0.9	1.0	1.0	1.0	2.0	1.2	1.9	1.4	1.5	1.7	1.4	1.4	1.6	2.9	1.9	1.5
	2a	0.9	1.0	0.7	0.8	2.6	2.6	1.2	1.1	1.1	1.2	1.2	1.2	1.6	1.2	1.9	1.4	1.5	1.6	1.3	1.3	1.5	2.5	2.1	1.4
	2b	0.8	0.9	0.6	0.7	2.5	2.5	1.1	1.0	1.0	1.1	1.1	1.1	1.5	1.1	1.7	1.3	1.4	1.5	1.1	1.1	1.3	2.1	1.9	1.2
	3a	0.2	0.2	0.3	0.3	0.8	0.8	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.5	0.3	0.6	0.4	0.4	0.4	0.6	0.6	0.8	1.3	1.0	0.7
	3b	0.4	0.4	0.5	0.6	0.9	0.7	0.5	0.4	0.4	0.5	0.5	0.5	0.7	0.6	0.9	0.7	0.6	0.7	0.7	0.7	0.8	1.3	1.7	0.8
Cerdo	1a	0.7	0.7	0.8	0.9	2.1	2.2	0.7	0.7	0.7	0.7	0.8	0.8	1.5	1.0	1.6	1.1	1.2	1.3	1.1	1.1	1.3	2.3	1.6	1.2

		Rumiante						Cerdo						Ave						Mezcla (1%, 6%, 12,25%)						
Centr.	1a	1b	2a	2b	3a	3b	1a	1b	2a	2b	3a	3b	1a	1b	2a	2b	3a	3b	1a	1b	2a	2b	3a	3b		
	1b	0.7	0.8	0.5	1.0	2.2	2.2	0.8	0.7	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	1.6	1.0	1.8	1.2	1.3	1.4	1.3	1.2	1.5	2.6	1.8	1.4
	2a	0.7	0.8	0.5	1.0	2.2	2.3	0.7	0.7	0.7	0.7	0.8	0.8	1.7	1.0	1.8	1.2	1.3	1.5	1.4	1.3	1.6	2.9	1.9	1.5	
	2b	0.7	0.7	0.6	0.9	2.1	2.1	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.8	1.6	1.0	1.7	1.1	1.3	1.4	1.3	1.2	1.5	2.6	1.8	1.4	
	3a	0.6	0.7	0.7	0.9	1.8	1.8	0.8	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	1.4	0.9	1.5	1.1	1.2	1.2	1.2	1.1	1.3	2.4	1.5	1.2	
	3b	0.6	0.6	0.7	0.8	2.0	1.9	0.8	0.8	0.7	0.8	0.7	0.7	1.3	0.9	1.4	1.0	1.1	1.2	1.1	1.0	1.2	2.0	1.4	1.1	
Ave	1a	0.4	0.4	0.5	0.6	1.5	1.3	0.4	0.3	0.4	0.4	0.5	0.5	0.6	0.5	0.7	0.5	0.5	0.6	0.7	0.6	0.7	0.9	1.0	0.7	
	1b	0.7	0.8	0.6	0.7	1.9	1.9	0.8	0.6	0.8	0.8	0.7	0.7	1.0	0.7	1.2	0.9	1.0	1.1	0.9	0.6	1.1	1.8	1.3	1.0	
	2a	0.5	0.6	0.5	0.5	1.2	1.1	0.5	0.4	0.5	0.5	0.5	0.5	0.7	0.5	0.7	0.5	0.6	0.7	0.6	0.5	0.7	1.2	0.8	0.6	
	2b	0.6	0.7	0.6	0.7	1.5	1.5	0.6	0.5	0.6	0.6	0.6	0.6	0.9	0.6	1.0	0.7	0.8	0.9	0.8	0.7	0.9	1.6	1.2	0.9	
	3a	0.6	0.6	0.6	0.7	1.5	1.5	0.6	0.5	0.6	0.6	0.6	0.6	0.8	0.6	1.0	0.7	0.7	0.8	0.9	0.8	1.0	1.7	1.3	0.9	
	3b	0.5	0.5	0.6	0.6	1.5	1.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.6	0.6	0.7	0.5	0.8	0.6	0.6	0.6	0.7	0.7	0.8	1.0	1.1	0.7	
Mezcla	1a	1.0	1.1	0.9	1.1	3.2	3.3	1.3	1.2	1.3	1.3	1.4	1.3	2.1	1.4	2.3	1.8	1.8	2.0	0.7	0.6	1.1	1.7	3.4	0.8	
	1b	1.1	1.2	0.9	1.2	3.3	3.5	1.4	1.3	1.4	1.4	1.5	1.5	2.2	1.5	2.5	1.9	2.0	2.2	0.8	0.7	1.2	1.8	3.6	0.9	
	2a	0.8	0.8	0.8	0.9	2.2	2.3	0.9	0.9	0.9	1.0	1.0	1.0	2.2	1.0	1.6	1.2	1.3	1.3	0.6	0.6	0.7	1.1	2.2	0.6	
	2b	0.6	0.6	0.5	0.5	2.0	1.9	0.8	0.7	0.7	0.8	0.8	0.8	1.1	0.8	1.3	1.0	1.0	1.1	0.4	0.4	0.5	0.6	1.8	0.4	
	3a	0.4	0.4	0.4	0.4	0.8	0.8	0.5	0.4	0.4	0.4	0.5	0.5	0.7	0.5	0.6	0.5	0.5	0.6	0.3	0.3	0.4	0.8	0.7	0.4	
	3b	0.9	0.9	0.9	1.0	2.8	2.9	1.1	1.1	1.1	1.2	1.2	1.2	1.7	1.2	2.0	1.5	1.6	1.7	0.7	0.6	0.9	1.4	3.0	0.7	

Del estudio de los valores representados en las Tablas 8 y 10 se deduce que la media de las distancias de cada píxel, así como la STD resultaron ser constantes al calcular las distancias dentro de una misma imagen. Este comportamiento se relacionó con la homogeneidad del tamaño de las partículas dentro de cada muestra. De hecho, las muestras de harinas animales analizadas fueron sometidas a un tratamiento de molienda por lo que el tamaño de partículas es constante. También se pudo observar que, entre dos replicas de una misma muestra, los valores medios de distancia entre los píxeles de la dos replicas son parecidos a los que se encuentran dentro de una misma replica. Este resultado demostró que las diferencias entre partículas de una misma muestra tienen una mayor contribución a la variabilidad con respecto a las diferencias provocadas por haber analizado dos replicas de una muestra.

La muestra número 3 de la especie rumiante, teniendo valores de distancia hacia las otras muestras muy superiores, fue útil para poder estudiar la variabilidad intermuestras. Se trata de una muestra que, a pesar de ser 100% rumiante, es completamente diferente en el aspecto de todas las otras muestras. La muestra en cuestión era grasienta y presentaba una textura parecida a la del tocino, compacta en vez de pulverulenta, característica que hacía imposible separar las partículas. Además, analizando visualmente la imagen híperespectral, se podían observar reflejos típicos de las superficies relucientes, ya que la grasa de la muestra estaba en estado líquido a la temperatura de análisis ($22^{\circ} \text{C} \pm 1$).

Una ulterior interpretación de los valores MD fue obtenida a través del análisis de componentes principales (PCA) aplicado a los valores de MD que las muestras y replicas de tres especies tenían hacia la cuarta. Así, se agruparon las especies de rumiante, ave y mezcla en una misma clase y se analizaron las distancias MD desde la nueva clase hasta las muestras de la especie cerdo. Sucesivamente se agruparon rumiante, cerdo y mezcla y se estudiaron sus distancias MD a las muestras de la especie ave. Las distancias MD hacia la especie mezcla fueron estudiadas por el grupo formado por rumiante, ave y cerdo. Finalmente, el grupo ave, cerdo y mezcla fue evaluado según la distancias de sus muestras a la especie rumiante. Cada submuestra de cada especie estaba así formada por 6 variables iniciales que fueron reducidas a 2 gracias al cálculo de PCA. De esta forma, resultó más fácil la interpretación de los resultados (Figura 33).

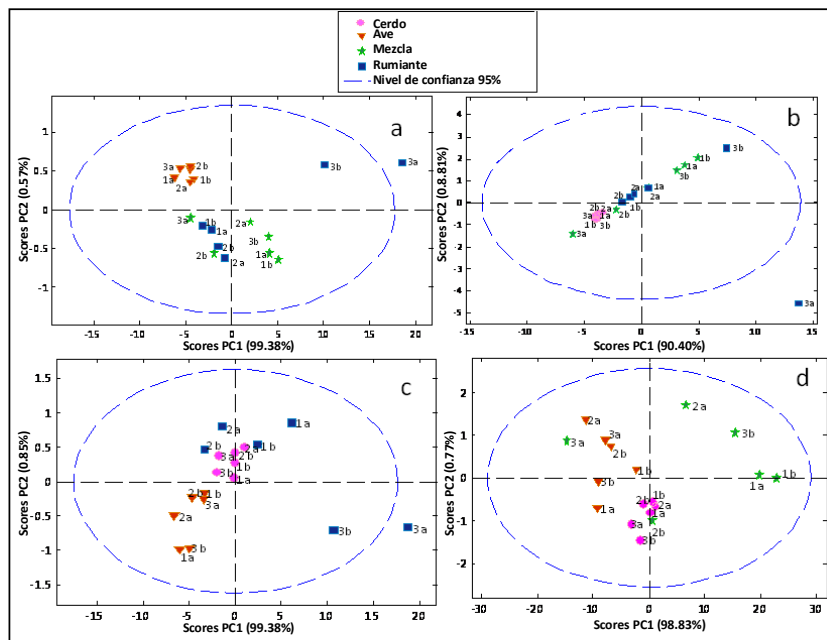


Figura 33. Representación de los *scores* de los PCs 1 y 2 correspondientes a las distancias MD de los píxeles de cada muestra. *a*: distancias MD a los píxeles de las muestras de la especie cerdo. *b*: distancias MD a los píxeles de las muestras de la especie ave. *c*: distancias MD a los píxeles de las muestras de la especie mezcla. *d*= distancias MD a los píxeles de las muestras de la especie rumiante.

La representación gráfica de la ubicación de las 18 muestras (2 réplicas x 3 muestras x 3 especies) en el espacio de las dos primeras componentes principales (PCs), confirmaron la mayor distancia de los píxeles de las submuestras *a* y *b* de la muestra 3 de rumiante al centro de la población. En particular, se pudo comprobar que la submuestra 3*a* de rumiante se encontraba fuera del intervalo de confianza del 95%. De los gráficos se observó también un agrupamiento de las muestras según su especie en el caso de las especies cerdo y ave, fenómeno que no había sido puesto en evidencia en la Tabla 7. Las muestras de rumiante, así como las mezclas, presentan una mayor dispersión espacial confirmando su mayor variabilidad. Las muestras 3*a* y 2*b* de las mezclas se situaban, en los gráficos *a*, *b* y *d*, separadas del resto de muestras mezcla. Finalmente, se notó que, aunque generalmente dos replicas de una muestra se colocan en la misma zona, no todas se encontraban más cercanas entre ellas que al resto del grupo, demostrando la complejidad del comportamiento de los píxeles dentro de una imagen como entre distintas imágenes.

El estudio de las componentes principales fue útil para resumir la información proporcionada por el cálculo de las distancias MD ya que los datos de la Tabla 7 pudieron ser resumidos y representados en dos dimensiones. En particular, se estudió la relación que cada muestra tenía con su replica, con las muestras de la misma especie y con otras especies.

Para estudiar la variabilidad intraespecie se decidió calcular la media de las distancias dentro de cada especie eliminando del cálculo la muestra 3 de rumiante, ya que su inclusión habría alterado los resultados de la variabilidad de la especie rumiante. Los resultados se indican en la Tabla 11.

Tabla 11. Media y STD de las distancias de Mahalanobis dentro de cada especie.

	Media	STD
Rumiante	2.11	0.85
Cerdo	1.54	0.75
Ave	1.45	0.73
Mezcla	1.55	0.84

A pesar de haber eliminado la muestra de rumiante que más se alejaba de las otras, los valores más altos en términos de distancia media y STD correspondieron con los pertenecientes a la especie rumiante demostrando que esta especie es la más heterogénea y variable entre las analizadas. Este resultado se puede relacionar al hecho de que en este estudio, como también en los siguientes descritos en esta memoria, la especie rumiante incluía tanto muestras de vacuno como de ovino. Los valores de STD de las distancias procedentes de muestras reales para las especies cerdo y ave confirmaron lo que se había podido observar en el análisis PCA, es decir, la menor variabilidad dentro de estas dos especies tanto a nivel de muestras como de repeticiones.

A continuación se calcularon las distancias medias de cada especie a todas las demás obteniendo los valores indicados en la Tabla 12.

Tabla 12. Promedio y STD de las distancias de Mahalanobis de cada especie a las demás.

	Media	STD
Cerdo-Rumiante	2.28	0.96
Ave-Rumiante	3.37	1.44
Mezcla-Rumiante	4.32	1.34
Rumiante-Cerdo	2.10	0.78
Ave-Cerdo	2.42	0.73
Mezcla-Cerdo	4.28	1.30
Rumiante-Ave	1.99	0.59
Cerdo-Ave	1.46	0.56
Mezcla-Ave	3.07	0.81
Rumiante-Mezcla	3.35	0.85
Cerdo-Mezcla	3.59	0.95
Ave-Mezcla	3.85	1.25

De este análisis resaltó la mayor distancia de las muestras mezcla a todas las demás. Este comportamiento era de esperar dada la composición de estas muestras. El alto porcentaje de HP provocó su mayor distancia al resto, ya que el pescado tiene un perfil lipídico y protéico diferente de las especies terrestres.

Otro resultado destacado fue la cercanía de la especie cerdo a la especie ave. Prácticamente las distancias fueron iguales a las obtenidas dentro de una misma especie. Estos resultados evidenciaron la necesidad de desarrollar métodos de estadística multivariante para poder clasificar diferentes especies animales (véase capítulo 5).

3.3.3. CÁLCULO DE LOS PARÁMETROS R^2 Y S PARA LA COMPARACIÓN ENTRE COVARIANZAS

Una vez conocidas las distancias entre píxeles dentro de una imagen, entre imágenes de una misma muestra, entre muestras de una misma especie y, finalmente, entre especies diferentes de harinas, decidimos abordar el estudio de la comparación entre covarianzas. Este análisis podría aportar información sobre variabilidad entre muestras o replicas, sin considerar la variabilidad intramuestra. En la Tabla 13 se muestran los coeficientes S y r^2 así como los errores de cada muestra expresados como la raíz cuadrada de la diferencia entre 1 y el valor absoluto de r^2 y S.

Tabla 13. Coeficientes de determinación (r^2), pendientes (S), error de $r^2 = \sqrt{1 - r^2}$ y error de $S = \sqrt{1 - S}$ resultantes de la regresión entre las matrices de covarianza de muestras y submuestras dentro de cada especie (página siguiente).

Capítulo 3. Evaluación de la repetibilidad espectral de las imágenes hiperespectrales

	r^2						S						Error r^2						Error S									
	1a	1b	2 ^a	2b	3a	3b	1a	1b	2a	2b	3a	3b	1a	1b	2 ^a	2b	3a	3b	1a	1b	2a	2b	3a	3b				
Cerdo	1a	1	0.93	0.8	0.9	0.96	0.98	1 ^a	1	1.04	1.08	1.17	1.31	1.15	1a	0	0.26	0.45	0.32	0.21	0.14	1a	0	0.19	0.29	0.41	0.56	0.38
	1b		1	0.97	0.99	0.99	0.99	1b		1	1.05	1.13	1.26	1.1	1b		0	0.18	0.07	0.08	0.12	1b		0	0.22	0.36	0.51	0.32
	2a			1	0.99	0.97	0.95	2 ^a			1	1.08	1.2	1.05	2a			0	0.1	0.18	0.23	2a			0	0.28	0.45	0.22
	2b				1	0.99	0.98	2b				1	1.12	0.98	2b				0	0.1	0.15	2b				0	0.34	0.16
	3a					1	1	3 ^a					1	0.87	3a					0	0.07	3a					0	0.36
	3b						1	3b						1	3b							0	3b					
Ave	1a	1	0.89	0.72	0.79	0.9	0.95	1 ^a	1	2.3	2.03	2.14	1.81	1.38	1a	0	0.33	0.52	0.45	0.32	0.23	1a	0	1.14	1.01	1.07	0.9	0.62
	1b		1	0.96	0.98	0.99	0.99	1b		1	0.88	0.93	0.79	0.6	1b		0	0.19	0.15	0.08	0.11	1b		0	0.34	0.27	0.46	0.63
	2a			1	0.99	0.98	0.96	2 ^a			1	1.05	0.89	0.68	2a			0	0.07	0.15	0.2	2a			0	0.23	0.33	0.57
	2b				1	0.99	0.97	2b				1	0.85	0.64	2b				0	0.12	0.16	2b				0	0.39	0.6
	3a					1	0.99	3 ^a					1	0.76	3a					0	0.08	3a					0	0.49
	3b						1	3b						1	3b							0	3b					
Mezcla	1a	1	0.93	0.83	0.92	0	0	1 ^a	1	1.17	0.81	0.35	0.51	0.88	1a	0	0.27	0.42	0.29	1	1	1a	0	0.41	0.43	0.81	0.7	0.35
	1b		1	0.61	0.85	0	0	1b		1	0.69	0.3	0.43	0.74	1b		0	0.62	0.38	1	1	1b		0	0.55	0.84	0.75	0.51
	2a			1	0.78	0.44	0.5	2 ^a			1	0.43	0.63	1.09	2a			0	0.47	0.75	0.71	2a			0	0.76	0.61	0.29
	2b				1	0	0	2b				1	1.45	2.49	2b				0	1	1	2b				0	0.67	1.22

Capítulo 3. Evaluación de la repetibilidad espectral de las imágenes hiperespectrales

		r^2						S						Error r^2						Error S								
3a		1 0.98 3*						1 1.72 3a						0 0.13 3a						0 0.85								
3b		1 3b						1 3b						0 3b						0								
		1a	1b	2 ^a	2b	3 ^a	3b	1a	1b	2a	2b	3a	3b	1a	1b	2 ^a	2b	3a	3b	1a	1b	2a	2b	3a	3b			
Ruminante	1a	1	1	0.12	0.61	0.86	0.83	1*	1	0.9	0.3	0.33	0.87	0.58	1a	0	0.06	0.94	0.62	0.38	0.42	1a	0	0.32	0.84	0.82	0.37	0.65
	1b	1		0.2	0.66	0.84	0.8	1b	1		0.34	0.36	0.97	0.65	1b	0		0.89	0.58	0.4	0.44	1b	0		0.81	0.8	0.18	0.6
	2a	1		0.93	0.48	0.44	2*	1		1.05	2.59	1.72	2a	0		0.27	0.72	0.75	2a	0		0.22	1.26	0.85				
	2b	1		0.56	0.51	2b	1		2.54	1.69	2b	0		0.66	0.7	2b	0		1.24	0.83								
	3a	1 0.99 3*						1 0.67 3a						0 0.08 3a						0 0.58								
3b		1 3b						1 3b						0 3b						0								

Dentro de la especie cerdo, los valores de r^2 variaban de 0.80 a 0.99 siendo = 1 comparando una muestra frente a sí misma. Se vio que las replicas de una misma muestra no presentaban diferencias evidentes con respecto a dos muestras diferentes. Analizando el error de r^2 , correspondiente a diferencias entre las matrices de covarianza, se observó que el valor más alto fue el correspondiente a la comparación entre las muestras 1 y 2. Esta información no coincide con la proporcionada por el cálculo de MD. Es probable que la comparación entre covarianzas proporcione información de las diferencias entre imágenes de una misma muestra y/o replica relacionada con otros factores (ej. la conformación de las partículas de las harinas de origen animal).

Los valores de S variaban de 0.87 a 1.26 y el error de S más alto, expresado como la raíz cuadrada de la diferencia entre 1 y S, se encontró entre las muestras 3 y 1. Este resultado coincide con la mayor distancia MD entre muestras dentro de la especie cerdo por lo que se deduce que el parametro S está relacionado con características de las muestras que se reflejan con la distancia MD entre píxeles.

Con respecto a la especie ave resaltó una diferencia tanto en términos de r^2 como de valores de pendiente S, entre las muestras 2 y una replica de la muestra 1. El hecho de que esta diferencia solamente se presentaba en el caso de una replica hizo pensar que la comparación entre matrices de covarianza no refleja solamente diferencias relativas a características propias de las muestras sino que esta influenciada por otros factores cuya origen es desconocida.

Del estudio de las diferencias entre matrices de covarianza en muestras mezcla los resultados más notables fueron los relativos a los valores de r^2 entre las muestras 1 y 3. Dichos valores resultaron igual a cero. Analizando las posibles causas, se vio que los valores de distancia MD también resultaron más altos de la media entre la muestra 1 y la submuestras 3a. Sin embargo, el resultado no se reflejó en los valores de S, demostrando que la pendiente de la recta de regresión entre las matrices de covarianza aporta información adicional con respecto al coeficiente de determinación r^2 .

3.3.4. CÁLCULO DE LOS ÍNDICES DE DIFERENCIA RELATIVA (RD%) ENTRE REPLICAS

Una vez que hemos comprobado la existencia de factores que provocan diferencias en las matrices de covarianza de replicas de una muestra, quisimos avanzar en el estudio de estas diferencias. El índice RD% se utilizó como herramienta para asignar un valor de semejanza entre las replicas y así estudiar posibles diferencias en el comportamiento de las muestras teniendo en consideración la clase de procedencia.

Para cada una de las doce muestras se calcularon los RD% entre los píxeles de las replicas obteniendo un valor medio por cada muestra (Tabla 14).

Tabla 14. Índices de diferencia relativa (RD%).

Muestra	RD% muestra	RD% clase
1	5.22	Cerdo: 5.01
2	4.74	
3	5.07	
1	4.57	Mix: 5.51
2	6.25	
3	5.73	
1	7.97	Ave: 7.15
2	6.36	
3	7.13	
1	4.96	Rumiante: 4.52
2	5.33	
3	3.28	

El estudio del RD% mostró que las distancias entre píxeles correspondiente a una determinada coordenada superficial de las imágenes, tienen valores que oscilan entre 4.52% para la especie rumiante y 7,15% para la especie ave. Aunque las diferencias entre RD% de distintas especies resultaron ser significativas, según el test de Fisher ($p = 0.019$), estos valores no se relacionaban directamente con la variabilidad intra-especie sino con la variabilidad inter-muestra. Comparando estos valores con los del material de

referencia (RD% = 0.35), se evidenció la heterogeneidad de las muestras en términos de diferencias entre partículas.

3.3.5. CÁLCULO ANOVA ANIDADO EN 4 NIVELES

Con el objetivo de comparar la variabilidad de los píxeles dentro de una imagen, entre dos replicas, entre distintas muestras y, finalmente, entre clases distintas, se sometieron los datos a un análisis ANOVA anidado. El resultado del análisis se muestra en la Tabla 15. El mismo análisis fue aplicado dentro de cada especie, es decir, eliminando el nivel Especie y considerando los niveles “muestra”, “réplica” y “píxel” dentro de cada especie para el análisis ANOVA anidado.

Tabla 15. ANOVA de un diseño completo anidado de cuatro factores.

	1.Especie g.l. = 3			2.Muestra g.l. = 8			3.Réplica g.l. =12			4.Píxel var
	F	p	var	F	p	var	F	p	var	
CP1	0.69	ns	0	154.72	***	0.98	12.19	***	0.01	0.17
CP2	17.15	***	0.58	11.14	***	0.10	6.84	***	0.02	0.46
CP3	5.13	*	0.22	39.11	***	0.15	1.84	*	0.00	0.70
CP4	2.61	ns	0.09	7.76	***	0.15	9.56	***	0.04	0.75
CP5	0.57	ns	0.00	14.86	***	0.34	11.46	***	0.04	0.68
CP6	7.35	*	0.52	10.35	***	0.22	20.72	***	0.05	0.37
CP7	2.26	ns	0.04	5.57	***	0.09	7.06	***	0.03	0.86
CP8	3.59	ns	0.08	4.82	*	0.07	6.90	***	0.03	0.85
CP9	1.92	ns	0.04	1.21	ns	0.02	41.91	***	0.20	0.77
CP10	1.62	ns	0.02	0.30	ns	0.00	166.10	***	0.61	0.60

***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05, ns: no significativo

Desde los resultados del análisis ANOVA anidado de 4 niveles se observó que el nivel especie resultó significativo en las PCs 2, 3 y 6, siendo la variabilidad inter-especies en los tres casos mayor que la variabilidad asociada a las diferentes muestras de una especie, a la réplicas de una muestra y a los píxeles de una réplica. Estos resultados confirmaron la existencia de diferencias en la estructura de las partículas de harinas procedentes de distintas especies animales como se había observado del análisis PCA de las distancias MD mostradas en la Figura 33 y son de gran importancia para abordar el objetivo de

desarrollo de modelos discriminantes para la detección de la especie animal en los productos de origen animal, que realizaremos más adelante en el capítulo 5 de esta memoria. Con respecto al nivel “muestra”, se destacó que la variabilidad entre muestras era significativa en las 8 primeras PCs y mayor que la variabilidad entre píxeles de una réplica solamente en la PC 1. La variabilidad entre réplicas resultó ser menor que la variabilidad entre diferentes especies, muestras y píxeles en todos los PCs, por lo que se pudo corroborar la no necesidad de analizar réplicas de la misma muestra tanto en muestras puras como en harinas constituidas por diferentes porcentajes de mezcla.

El último nivel constituido por los diferentes píxeles dentro de una réplica mostró que la variabilidad entre píxeles es mayor de la variabilidad entre réplicas y que la variabilidad entre muestras a partir de la segunda PC y menor que la variabilidad entre especies solamente en las PCs 2 y 6. Esta información indica que estas PCs poseen información importante para la discriminación entre especies. Estudiando los *loadings* de estos componentes (aplicando un análisis PCA y tratando las muestras con “autoescalado”) se observaron dos picos positivos en $\lambda=1500$ nm y $\lambda=1180$ para el *loading* 6 y un pico negativo en $\lambda=1210$ nm para el *loading* 2 (Figura 34).

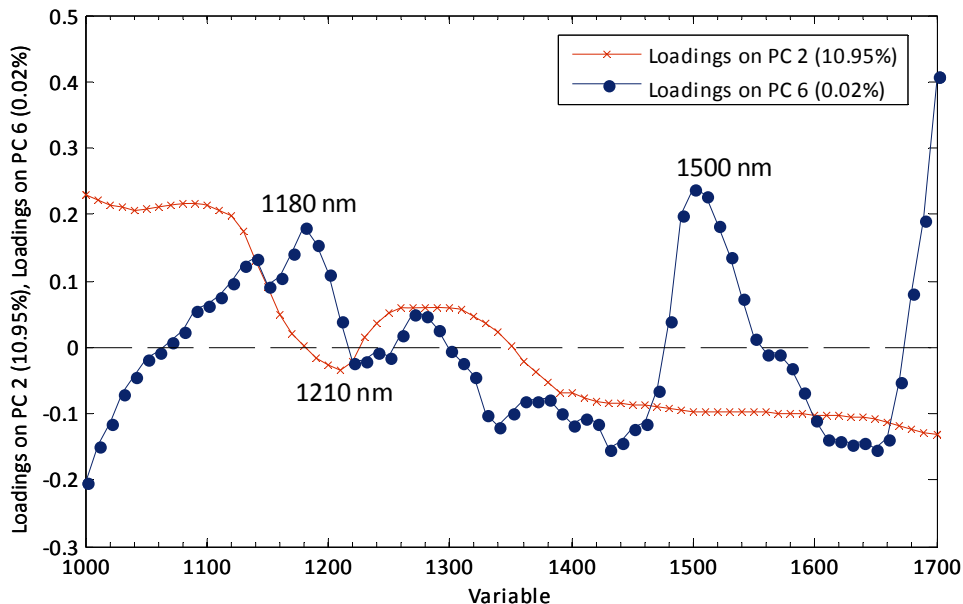


Figura 34. Loadings para las PCs 2 y 6 de los datos relativos a las 24 imágenes.

Las longitudes de onda de 1180, 1210 y 1500 indican las bandas espectrales donde hay mayor diferencia entre especies animales. Estas bandas han sido asimismo detectadas como relevantes en diferentes estudios de Harinas animales tanto mediante NIRS [14] como microscopía NIRS [15]. Las primeras, alrededor de 1200 nm, corresponden al rango de absorción de la grasa y la tercera, alrededor de 1500 nm, corresponde a la de absorción de proteínas. En los capítulos 4 y 5 de esta memoria se encuentra una descripción detallada de los espectros NIR de las harinas animales.

Analizando los resultados relativos al análisis ANOVA anidado dentro de cada especie, se observó que, para la especie rumiante, la variabilidad entre muestras fue significativa en casi todas las PCs (a exclusión de las PCs 7 y 10). La variabilidad entre muestras diferentes resultó ser mayor respecto a la variabilidad entre los píxeles de la misma muestra en las PCs 1, 2 y 5 siendo menor en todas las restantes PCs. La Figura 35 muestra las PCs 1, 2 y 5, 6 donde se pueden observar los píxeles de las dos réplicas de cada una de las tres muestras de la especie rumiante.

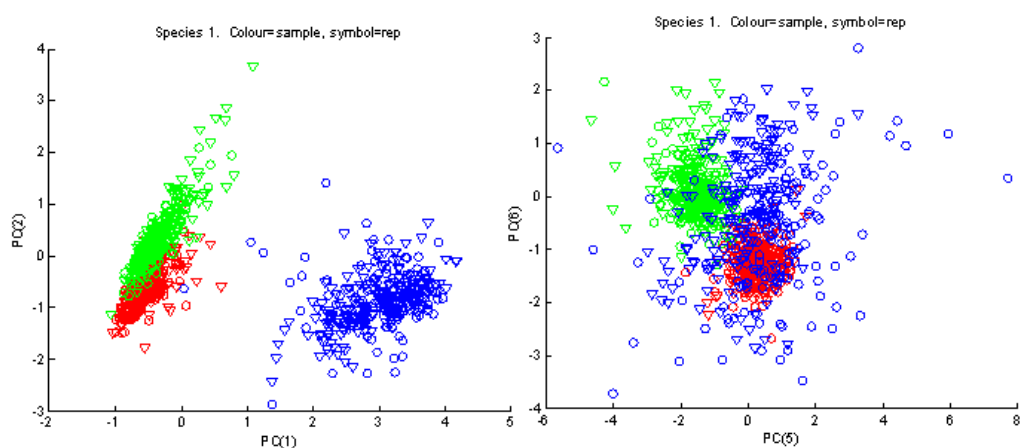


Figura 35. PCs 1, 2 y 5, 6 de las dos réplicas de las tres muestras de SPOA de rumiante. El color caracteriza la muestra y la forma de los símbolos indica las replicas.

Las dos primeras PCs mostraban una alta variabilidad entre muestras debido a que una de las muestras (píxeles de color azul en Figura 33) era muy diferente al resto, como se ha indicado anteriormente. Nuevamente la variabilidad entre réplicas resultó menor que la variabilidad entre píxeles en todos los PCs.

En el caso de la especie cerdo el único PC, donde la variabilidad entre muestras resultó mayor que la variabilidad entre píxeles de una misma réplica, fue el sexto. En la Figura 36 se pueden observar las PCs 5 y 6 para la especie cerdo.

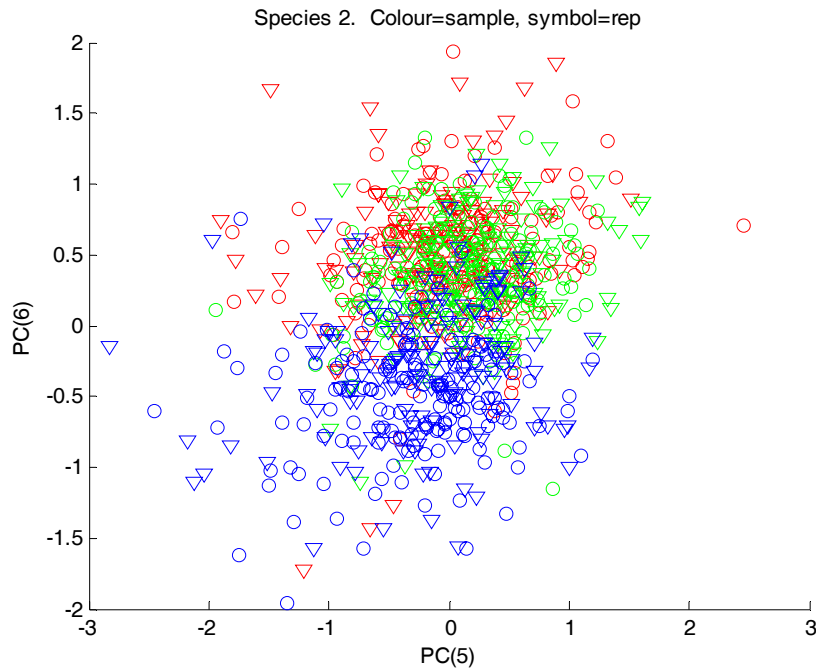


Figura 36. PCs 5 y 6 de las dos réplicas de las 3 muestras de SPOA de cerdo.

La varianza entre repeticiones resultó significativa a partir de la PC 5 y siempre menor que las varianzas entre especies y entre píxeles.

En la especie ave los únicos valores de variabilidad significativos entre muestras se encontraron en la PC 7. Estos valores, de todas formas, resultaron ser inferiores a los relativos a la variabilidad entre píxeles en todas las PCs.

Por último, dentro de la especie mezcla, la variabilidad significativa entre muestras diferentes de las PCs 3 y 5 fue menor que la variabilidad entre píxeles en los dos casos. La variabilidad entre repeticiones volvió a ser menor que la variabilidad entre píxeles en todas las PCs.

El origen de la alta variabilidad entre píxeles de una imagen se asoció tanto a diferencias entre partículas como a posibles variaciones en la superficie de la muestra analizada. Las harinas animales están constituidas por partículas muy diferentes entre ellas desde el

punto de vista espectral (pelos, carne, grasa, sangre, etc.). Esta riqueza en la variedad de las partículas que conforman las harinas está en la base de la alta variabilidad entre píxeles.

3.3.6. ANÁLISIS *CLUSTER* DE IMÁGENES HIPERESPECTRALES

Los resultados obtenidos del análisis K-means DCA se representaron en forma de mapas de *clusters* donde, a través de un análisis visual, se estudió el comportamiento de los píxeles de una imagen según sus coordenadas superficiales en base a la presencia/ausencia de zonas de agrupamiento comunes a todas las imágenes o de cualquier otra particularidad que pudiese estar relacionada con factores ajenos a las propiedades de la muestra. La Figura 37 (página siguiente) muestra los mapas de *clusters* de las cuatro muestras estudiadas para $N = 6$ *clusters* y los histogramas, indicando los porcentajes en la imagen asignados a cada *cluster*.

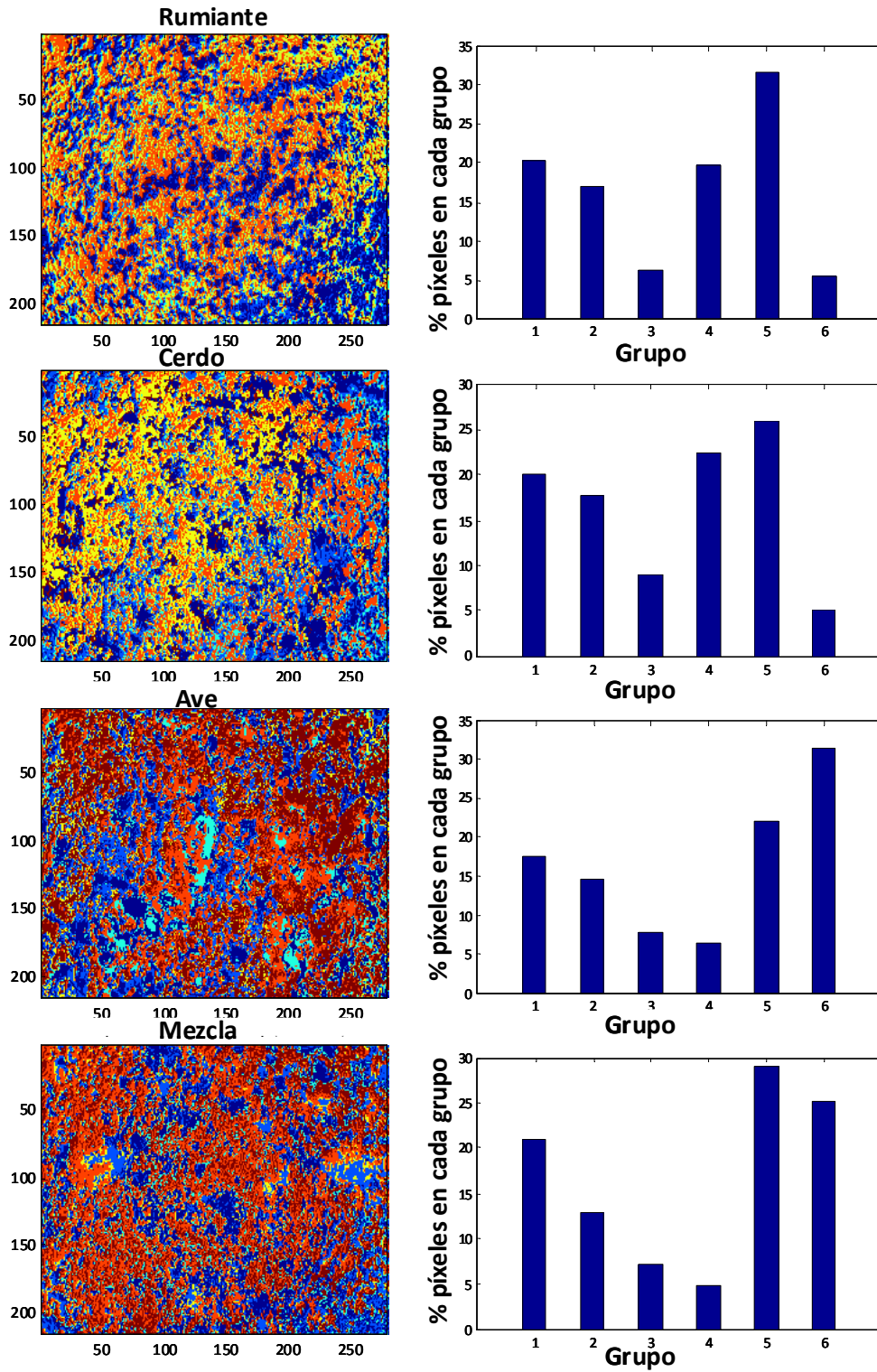


Figura 37. Izquierda: mapas de *clusters*. Derecha: histogramas de frecuencias relativos a los píxeles pertenecientes a cada grupo.

Para interpretar los mapas de *clusters* se tuvo en consideración que, en la hipotética situación en la que una imagen estuviese formada por píxeles idénticos entre ellos, esto es, con el máximo nivel de correlación entre ellos a nivel espectral, el resultado del análisis DCA habría sido un único grupo correspondiente a un mapa de un solo color. El histograma en este caso representaría el 100% de la imagen en un grupo y el 0% en los otros cinco grupos. Este sería el caso de una muestra formada por un solo tipo de partículas y sin ninguna interferencia externa ni diferencia en su superficie.

Considerando el extremo opuesto nos encontraríamos con una imagen de una muestra en la que los píxeles no tienen ninguna relación espectral entre ellos, y cada uno de ellos tiene una respuesta espectral distinta de su vecino. En este caso los píxeles de la imagen se distribuirían uniformemente en los seis grupos (Figura 38).

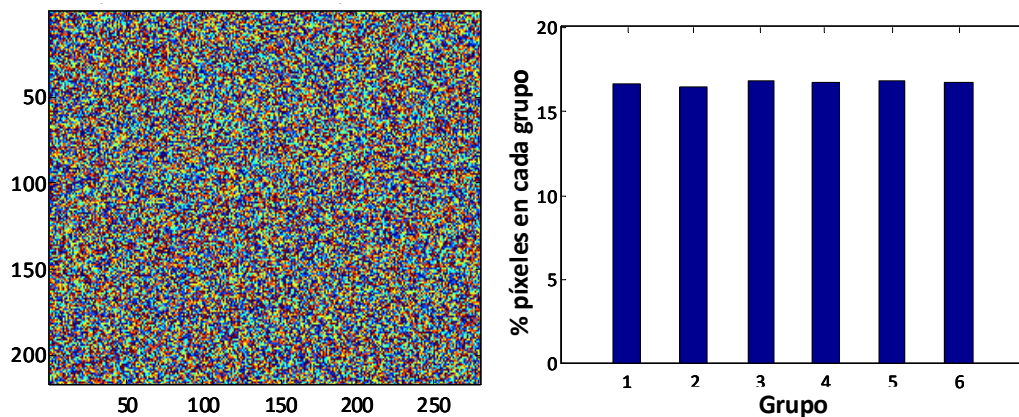


Figura 38. Izquierda: mapas de *clusters* en una muestra formada por valores aleatorios. Derecha: histogramas de píxeles pertenecientes a cada grupo.

Considerando que en una imagen formada por píxeles donde la varianza es máxima, la distribución del histograma es uniforme, se utilizó el índice de uniformidad de los histogramas para evaluar la variabilidad dentro de una imagen. Así, se comprobó que las cuatro imágenes relativas a las cuatro muestras estudiadas tenían agrupaciones de píxeles de varios tamaños confirmando la presencia de zonas en la imagen con mayor varianza. Un comportamiento común a las cuatro muestras fue la presencia de dos grupos más pequeños con respecto a los otros cuatro restantes. En las imágenes de las muestras de rumiante y de cerdo, además, se observó una zona de agrupación (esquina inferior

derecha) que podría corresponder con una zona de la imagen diferentemente iluminada o enfocada por el detector. Resulta por lo tanto evidente que, a pesar de la optimización instrumental puesta a punto en el capítulo 2 de esta memoria, hay que tener en cuenta ciertos factores de variabilidad difíciles de eliminar.

El estudio de los histogramas de los *clusters* de una imagen demostró, en definitiva, aportar información sobre la homogeneidad de intensidad, es decir, sobre cómo se distribuyen los valores de intensidad en una imagen. Los aspectos de homogeneidad relacionados con la superficie de una imagen, sin embargo, son objeto de estudio de otros tipos de aplicaciones como son las técnicas basadas en fractales, donde se buscan índices de simetrías, y el estudio de la entropía [16], para medir la dispersión entre píxeles.

3.4. CONSIDERACIONES FINALES

En el presente estudio se evaluaron varias estrategias para medir la repetibilidad espectral, elemento fundamental para individuar errores ligados a variaciones entre diferentes análisis, para informar sobre la homogeneidad de intensidad entre los píxeles que componen una imagen y, por último, para conocer la relación entre píxeles de muestras, replicas y clases diferentes. Los cinco índices estudiados (MD, relación entre covarianzas, RD%, ANOVA anidado y análisis *cluster* DCA) aportan información no solamente sobre la variabilidad descrita por una imagen híperespectral sino también sobre el origen de dicha variabilidad.

Analizando en conjunto de resultados de las pruebas desarrolladas se pueden definir unas conclusiones sobre el peso que distintos factores tienen sobre la variabilidad espectral. Estos factores pueden ser resumidos en:

1. Variabilidad debida al muestreo, iluminación no homogénea. Normalmente los errores asociados a estas variables se manifiestan entre distintas replicas y podrían ser minimizados con un apropiado pretratamiento espectral.

2. Diferencias entre las partículas dentro de una misma muestra. Esta diferencia puede ser más o menos pronunciada dependiendo del grado de homogeneidad de la muestra.
3. Variabilidad asociada a la especie o especies que forman la muestra. Este parámetro es el más importante para la discriminación entre especies animales.

Los resultados muestran que el conocimiento del peso relativo que tiene cada una de estas variables podría facilitar la posterior creación de modelos de clasificación y contribuye al entendimiento de las diferencias espectrales y del comportamiento de las partículas de una muestra en relación a las partículas de otras muestras. La elección de un índice u otro dependerá del tipo de muestra estudiado así como de los recursos disponibles en cuanto a hardware y paquetes estadísticos asociados.

Los índices estudiados mostraron una mayor variabilidad existente entre píxeles de una misma imagen con respecto a la que hay entre muestras diferentes y esto llevó a suponer que, dada la gran variabilidad (información sobre características químicas y físicas) proporcionada por los píxeles de una muestra, el análisis hiperespectral podría proporcionar resultados válidos y robustos incluso con un volumen de muestras inferior al que normalmente estamos acostumbrados a considerar en un análisis NIRS clásica. Esta hipótesis requeriría ser profundizada a través del mismo tipo de análisis aplicado a un mayor número de muestras para comprobar la estabilidad de los resultados.

3.5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] De la Haba, M.J. (2006). Trazabilidad de los productos de origen animal no destinados al consumo humano (SANDACH) mediante el uso de la tecnología NIRS. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba.
- [2] Mao, J., Xu, J. (2006). Discrimination of herbal medicines by molecular spectroscopy and chemical pattern recognition. *Spectrochimica Acta Part A* 65, 497–500.
- [3] Meuret, M., Dardenne, P., Biston, R., Poty, O. (1993). The use of NIR in predicting nutritive value of Mediterranean tree and shrub foliage. *J. Near Infrared Spectrosc.* 1, 45-54.
- [4] Shenk, J.S., Westerhaus, M.O., (1991). *Crop Science* 31, 6.
- [5] Riccioli, C., Saeys, W, Vallesquino-Laguna, P., Pérez-Marín, D., Guerrero-Ginel, J.E. and Garrido-Varo A. (2009) Calibration pixel selection for hyperspectral discrimination of ruminant and fish animal by-products. *Proceedings of the 14th International Conference on Near Infrared Spectroscopy*. In press. Bangkok, Thailand.
- [6] Anderson, G.L., Peleg, K. (2007). Quantification and reduction of erroneous differences between images in remote sensing. *Environ. Ecol. Stat.* 14: 113-127.
- [7] Caldolfi, A., Massart, D. L., Heuerding, S. (1997). Investigation of sources of variance which contribute to NIR-spectroscopic measurement of pharmaceutical formulations. *Analytica Chimica Acta*, 345, 1-3.
- [8] Rousseeuw, P.J., Kaufman, L. (1990). *Finding Groups in Data: An Introduction to Cluster Analysis*. Wiley.
- [9] De la Torre, F., Kanade, T. (2006). Discriminative cluster analysis. *ICML 2006 - Proceedings of the 23rd International Conference on Machine Learning, Volume 2006*, Pages 241-248.

- [10] MacQueen, J. B. (1967). Some Methods for classification and Analysis of Multivariate Observations, Proceedings of 5-th Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability, Berkeley, University of California Press, 1:281-297.
- [11] Kennedy, L. S., Naaman, M. (2008). Generating diverse and representative image search results for landmarks. In World Wide Web Conference, pages 297–306.
- [12] Masood, K., Rajpoot, N., Rajpoot K., Qureshi, H. (2006). Hyperspectral Colon Tissue Classification using Morphological Analysis. IEEE--ICET 2006 2nd International Conference on Emerging Technologies Peshawar, Pakistan.
- [13] Mojaradia, B., Emamib, H., Varshosazc, M., Jamali, S. (2008). The International Archives of the Photogrammetry, Remote Sensing and Spatial Information Sciences. Vol. XXXVII. Part B7, Beijing.
- [14] Garrido-Varo, A., Pérez-Marin, D., Guerrero, J.E., Boix, A, Slowikowski, B., Fernandez, J.A., Baeten, V. y Dardenne, P. (2008). Wavelength range optimization for multivariate discrimination of species in animal by-product meals analysed by NIR-microscopy. . Proceedings of the 11th international conference on chemometrics for analytical chemistry, p. 103 Vol 4. Montpellier (France).
- [15] De la Haba, M.J., Fernández Pierna, J.A., Fumière, O., Garrido-Varo, A. Guerrero, J.E., Pérez-Marín, D.C., Dardenne, P., Baeten, V. (2007). Discrimination of fish bones from other animal bones in the sedimented fraction of compound feeds by near infrared microscopy. J. Near Infrared Spectrosc. 15, 81–88.
- [16] Schlamm, A., Messinger, D., Basenerb, W. (2009). Geometric estimation of the inherent dimensionality of single and multi-material clusters in hyperspectral imagery. Journal of Applied Remote Sensing, 3, 033527.

CAPÍTULO 4. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE COMPRESIÓN Y REDUCCIÓN DE DATOS PARA LA DISCRIMINACIÓN DE ESPECIES ANIMALES

4.1. OBJETIVOS

A través de este estudio se buscó el método más adecuado para la selección de datos hiperespectrales para crear un colectivo de calibración con el que se puedan construir modelos sólidos para la discriminación entre harinas de pescado y harinas de animales terrestres (ave, cerdo, rumiante) en SPOAs. Para ello, se dividió el estudio en dos partes. En la primera parte se evaluó el poder de clasificación logrado utilizando el algoritmo PLSDA y el espectro medio de cada muestra analizada. En la segunda parte, se compararon cuatro diferentes métodos de selección de píxeles: dos basados en la dimensión espectral del cubo de imagen (utilizando la MD y el método de Kennard-Stone modificado) y dos basadas en la dimensión espacial del hipercubo (utilizando las funciones de Binning y de interpolación espacial).

4.2. METODOLOGÍA

4.2.1. MUESTRAS E INSTRUMENTO

Se analizaron un total de 135 muestras de Harinas animales pertenecientes a distintas categorías: 70 muestras de harinas terrestres o HT (30 de harina de aves de corral o HSA, 30 de cerdo, 10 de rumiantes incluidos vacas y ovejas) y 65 harinas de pescado o HP. Las muestras examinadas se obtuvieron en una planta de procesamiento y contenían

partículas de escamas, pelos, plumas, sangre, grasa, piel, músculo y hueso de peces o animales terrestres y. Del conjunto total de 135 muestras, 90 muestras fueron usadas como colectivo de calibración (de ahora en adelante CAL) y 45 como colectivo de validación (de ahora en adelante VAL). La elección de las muestras VAL fue llevada a cabo mediante la selección aleatoria de nueve muestras de harinas de cerdo, dos muestras de harinas de rumiante, nueve muestras de harinas de ave y 25 muestras de harinas de pescado.

Para el análisis se utilizó una muestra de 1 gr. de cada harina. Las muestras fueron analizadas con una cámara NIR (MatrixNIR, Malvern Instruments, Maryland, USA). La cámara, provista de detector de matriz de plano focal de Arseniuro de galio indio (InGaAs), proporciona imágenes de 240 x 320 píxeles con una resolución de 97,8 $\mu\text{m}/\text{píxel}$ en la región NIR de 900-1700 nm. En este estudio, sin embargo, se consideraron solamente las longitudes de onda entre 1000 y 1700 nm evitando así el ruido provocado por la primera y la última parte del espectro. De hecho, alrededor de 900 nm, el detector pierde sensibilidad provocando la obtención de intensidades inferiores ya que serían necesarios tiempos de integración más altos [1]. Los bordes de las imágenes fueron eliminados seleccionando una zona de interés (ROI, del inglés *Region Of Interest*) de 216 x 280 píxeles. Esta medida es útil para descartar posibles anomalías cerca de los bordes de la muestra, ya que en muchas imágenes no todo el FOV estaba cubierto por la muestra. Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando los siguientes paquetes de software: ISYS 4.0 (Malvern, Inc., Olney, MD, USA), MatLab R2008a (The Mathworks, MA, USA), PLS_Toolbox y MIA_toolbox (Eigenvector Technologies, Manson, Washington, USA).

4. 2. 2. ANALISIS DISCRIMINANTE

Preprocesamiento espectral

El ruido espectral debido a variaciones en el instrumento, junto con el desplazamiento en la línea de base debido a la dispersión de la luz, afectan la calidad de las mediciones. Por lo tanto, un adecuado preprocesamiento espectral es imprescindible. En este estudio, la

combinación de DT, SNV y *Mean Center* fue utilizado como preprocesamiento espectral. El tratamiento de DT elimina los efectos debidos a variaciones en la línea de base y a fenómenos de curvilinalidad, que generalmente se encuentra en los espectros de reflectancia de muestras en polvo. El enfoque del *Standard Normal Variate* (SNV) elimina eficazmente las interferencias multiplicativas de dispersión y los efectos debidos al tamaño de partículas. Este tratamiento calcula la STD de todas las variables agrupadas en la muestra.

Así, todas las muestras vienen normalizadas con este valor, asignando al conjunto una STD de una unidad [2]. El *Mean Center* traduce los ejes del sistema de coordenadas al centro de gravedad de los datos. Después de la aplicación del *Mean Center*, cada fila de datos solamente explica la forma en que esta difiere de la línea media de la muestra de la matriz de datos originales.

Análisis PLSDA

En primer lugar se calculó el espectro medio de cada muestra. Utilizando el espectro medio, no se encontraron valores atípicos. Posteriormente se desarrolló el análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLSDA) y el modelo fue evaluado a través de los estadísticos “sensibilidad”, “especificidad”, y a través del error de clasificación. La sensibilidad de un modelo de clasificación se define como la proporción de objetos pertenecientes a esa clase correctamente identificados por el modelo matemático, mientras que la especificidad se refiere a la proporción de objetos que no pertenecen a la clase clasificada como externa [3]. El análisis PLSDA puede ser considerado una extensión de los métodos de proyección y se basa en la técnica PLS.

Validación externa

El colectivo de validación (VAL) estaba formado por 45 muestras. Para cada muestra del colectivo de validación se predijeron 3780 píxeles. Estos píxeles se obtuvieron después de un tratamiento de un tratamiento binning 4x4 que fue aplicado a todas las muestras del colectivo VAL durante todas las pruebas realizadas. Estetratamiento permitió evitar problemas de cálculo debido al gran tamaño del conjunto de datos además de eliminar

los píxeles anómalos. El olectivo VAL fue utilizado para evaluar la exactitud tanto del modelo construido usando los espectros medios como de los modelos creados a partir de los cuatro diferentes colectivos de calibración.

4. 2. 3. SELECCIÓN DE PIXELS REPRESENTATIVOS

Con el objetivo de evaluar diferentes tipos de selección de píxeles representativos, se diseñaron cuatro estrategias diferentes que fueron estudiadas para evaluar su potencial de rendimiento para futuros análisis discriminantes.

Los dos primeros métodos (binning e interpolación espacial) tienen en cuenta exclusivamente la información espacial de cada muestra. Los otros dos métodos (sección por el método Kennard-Stone y cálculo de la MD), al contrario, se basan en la información espectral sin tener en cuenta la información espacial. Se consideró que una cantidad de entre 200 y 250 píxeles por imagen representaba un compromiso efectivo entre el manejo del conjunto de datos en términos de tiempos de computación y un la capacidad de los píxeles de representar la variabilidad de la muestra original.

Método Binning

El tratamiento de Binning (Bin de ahora en adelante) suele ser aplicado a datos de sensores remotos [4], donde el volumen de los datos de imágenes satelitares necesitaba ser reducido antes de que la información fuera enviada a la Tierra. En el presente estudio, se aplicó un Bin 16x16 a las imágenes. De esta manera se consiguió incrementar, la resolución espectral al reducir la resolución espacial. Al aplicar el tratamiento de Bin 16x16, se promediaron los valores de aborbanciade los espectros de el un área de 256 píxeles adyacentes, obteniendo un total de 221 píxeles por muestra. Esta cantidad de datos por muestra La información espacial fue tomada en cuenta por todas las diferentes regiones de la imagen se representa. No hay valores extremos fueron retirados de píxeles, ya que hurgar en la basura implica la dilución de los valores atípicos debido a la media del tratamiento aplicado a los píxeles. De esta forma, la información espacial fue también tenida en cuenta ya que todas las zonas de cada imagen estaban representadas en el

colectivo CAL. Considerado que el tratamiento Bin de por sí elimina los valores anómalos promediando los valores de los espectros correspondientes a cada píxel, no se procedió al estudio de eventuales *outliers*.

Método de interpolación espacial

La función de interpolación espacial disponibles en el programa ISYS 4.0 permite cambiar la densidad de puntos en un cubo de imagen en de las dos dimensiones espaciales utilizando una función de interpolación bilineal. Por lo general, la interpolación espacial se emplea para mejorar la calidad de una imagen sin perder resolution [5]. Pokrajac et al. [6] propusieron el uso de esta técnica para la predicción espacio-temporal de bases de datos en el campo de la agricultura de precisión. En el presente estudio la función de interpolación espacial fue utilizada para crear un nuevo píxel entre un vecindario de 16x16 píxeles adyacentes con espectro conocido. En este caso, los valores anómalos fueron estudiados mediante el análisis de los *scores* del modelo de PCA, utilizando los estadísticos *Hotelling's T2-statistic* y *Q-statistic* (Eigenvector Research, Wenatchee, WA). De esta manera se obtuvo un número de 252 píxeles para cada imagen. Así se garantizaba una amplia representación de la variabilidad espacial de toda la muestra (p.e. la variabilidad debida a posibles diferencias en la iluminación en la superficie de la muestra o a variaciones en el espesor de la muestra en el area del FOV).

Método basado en la distancia de Mahalanobis

El cálculo de la MD ampliamente utilizado [7] para asegurar la selección de los espectros más representativos en NIRS. La técnica utilizada en el presente estudio incluyó la creación de un modelo de PCA en el que el 99% de la varianza de la base de datos original fue explicada por los primeros ocho componentes principales. La MD fue calculada para estos ocho componentes principales (PC). Los píxeles fueron clasificados en orden creciente en función de su distancia del centro de la población. En este caso, se seleccionaron los 230 píxeles más cercanos al núcleo de población para su inclusión en el modelo. Al igual que en el tratamiento de Bin, los espectros anómalos no fueron investigados ya que los píxeles seleccionados a través de la MD, por su proximidad al

centro de la población, tienen valores de Hotelling's T²- statistic and Q-statistic dentro de los niveles de confianza del 95%.

Método de Kennard-Stone

El método de Kennard-Stone representa una estrategia alternativa propuesta por Naes et al. [8] para la selección de un colectivo de muestras. En el presente estudio se comprobó su eficacia como método basado en la información espectral. La distancia euclídea originalmente utilizada en este algoritmo, fue sustituida por la MD y los píxeles que fueron seleccionados en base a los primeros cinco PCs que explicaban el 99% de la varianza del conjunto de datos original. De esta forma se redujo el volumen de datos a analizar disminuyendo el número de variables de 71 a 5. En un estudio previo [9] esta versión modificada del método de Kennard-Stone demostró ser más eficaz que el método original para la de selección de píxeles. La selección de los 230 píxeles por muestra involucró los siguientes pasos:

- (1) Se individuaron los dos puntos más distantes del centro de la población.
- (2) Se calcularon las menores distancias de los píxeles candidatos seleccionados en el paso (1).
- (3) Entre las distancias más cortas, se calculó la mayor.
- (4) El punto identificado fue incluido en el colectivo CAL.

Estos pasos se repitieron hasta seleccionar los 230 píxeles.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. ANÁLISIS EXPLORATORIO PCA Y EVALUACIÓN DE PLSDA UTILIZANDO EL ESPECTRO MEDIO DE CADA MUESTRA

Como paso previo a la creación de modelos predictivos, se realizó un análisis PCA con ya que la representación gráfica de los componentes principales a menudo ayuda a proporcionar una idea visual de las diferencias entre las especies animales. Se escogieron al azar nueve muestras de HP y nueve muestras de harina de animales terrestres (de ahora en adelante HT). La concatenación de las imágenes de las 18 muestras produjo una imagen única. El examen de los valores de absorción de esta imagen en todo el rango espectral NIR demostró ser útil para comprobar que longitud de onda es la más adecuada para discriminar la especie animal. Para este propósito se utilizaron los histogramas de frecuencia de absorbancia, donde es fácil identificar la banda espectral en la que el pico de los píxeles correspondientes a las muestras de pescado estaba más alejado de el pico pertenecientes a las muestras de HT. La banda de 1190 nm proporcionó la discriminación más alta después de pretratar los espectros con DT, SNV y *Mean Center*. A continuación, se examinaron más detalladamente los PCs para evaluar su potencial discriminante. El segundo PC demostró ser el mejor candidato para este propósito. La Figura 39 muestra las imágenes de las 18 muestras sin pretratamiento a 1190 nm, las mismas imágenes con pretratamientos de DT, SNV y *Mean Center* también a la λ de 1190 nm, y finalmente las imágenes de la segunda PC después del cálculo de PCA.

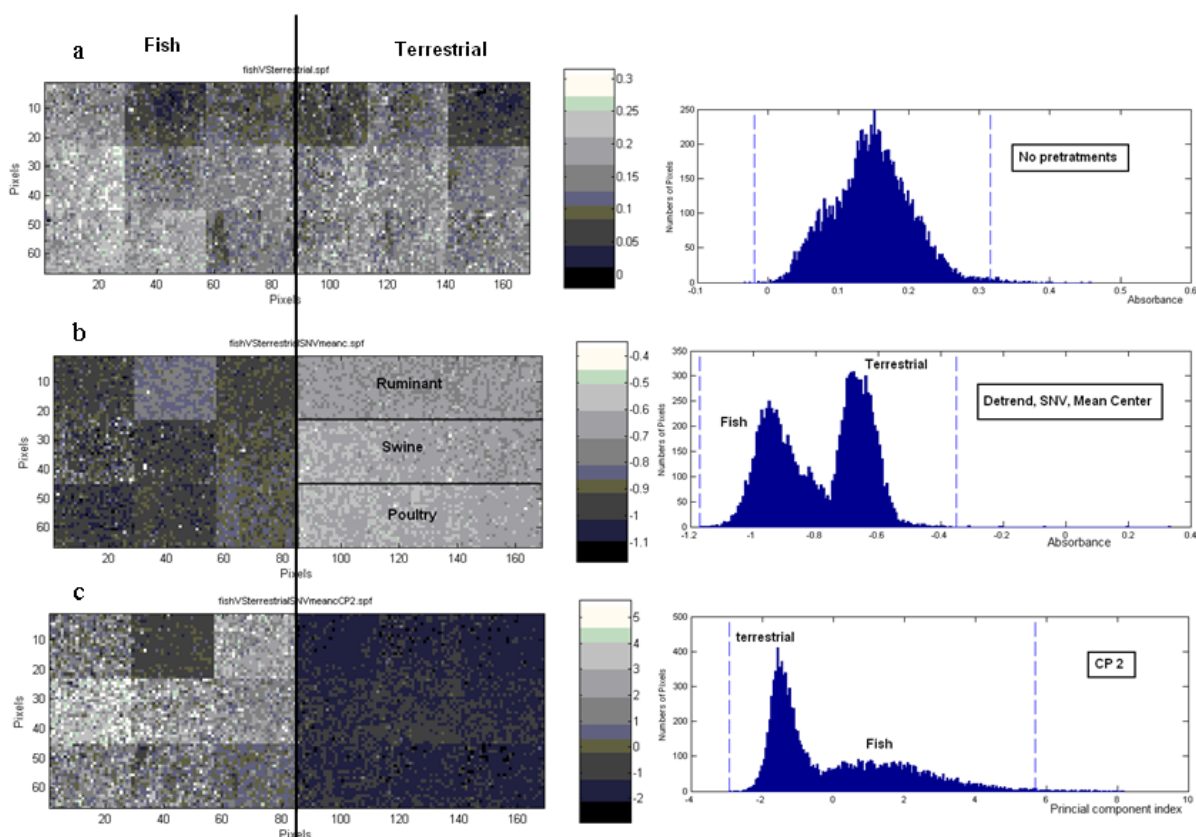


Figura 39. Izquierda: Imágenes concatenadas de 18 muestras [(a) valor de absorbancia a 1190 nm, (b) valor de absorbancia a 1190 nm después de los pretratamientos espectrales, (c) *scores* para el PC2]. Derecha: Histogramas de frecuencia de intensidad.

Como muestra la Figura 39, sin pretratamientos espectrales es imposible distinguir las muestras de HP de las muestras HT, incluso a la λ de 1190 nm. Sin embargo, mediante la aplicación de DT, SNV, y *Mean Center*, los dos picos se vuelven claramente visibles en el histograma indicando que las muestras de HP se distinguen de las muestras de harina carnica en 1190 nm. También se puede observar que el pico para muestras de HT es más alto y más estrecho que el pico de la HP, lo que refleja una mayor homogeneidad entre las muestras, aunque solamente se hayan utilizado 9 muestras por clase. El estudio de los espectros medio de todas las muestras de los dos colectivos CAL y VAL, confirmó que 1190 nm es una de las dos bandas relevantes en los espectros de la HP y las muestras terrestres (Figura 40).

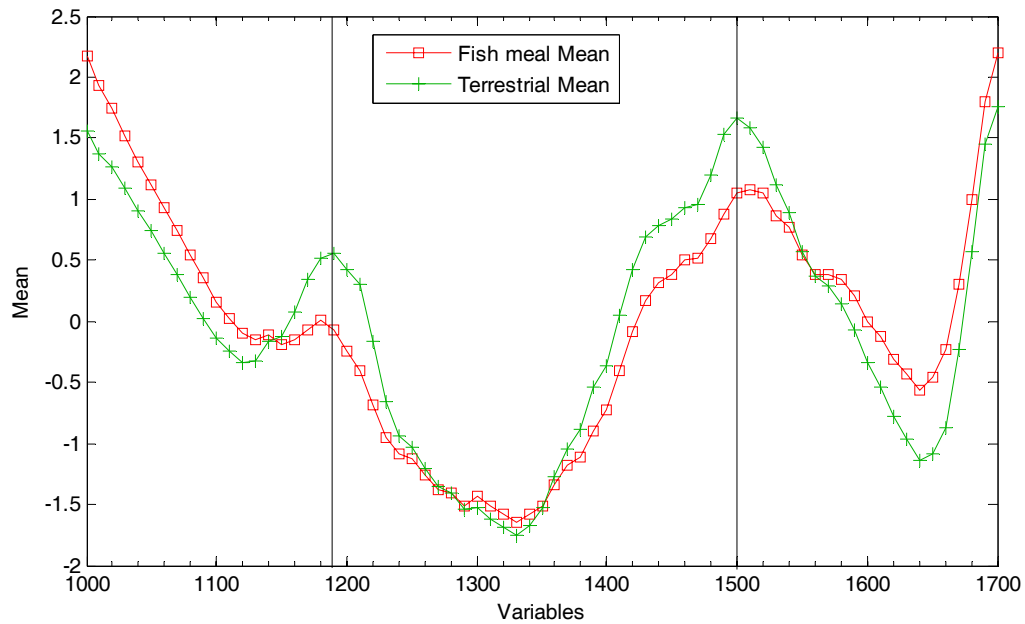


Figura 40. Espectros medios de harinas de pescado y de terrestres después de los pretratamientos DT, SNV y Mean Center.

Las dos regiones de máxima diferencia entre la HP y los espectros terrestres son visibles en torno a 1190 y 1500 nm. Estas regiones son características de la absorción de grasa (1200 nm) y proteínas (1500 nm) [10]. El siguiente paso en el proceso de análisis de datos fue el empleo de un procedimiento de reconocimiento supervisado de patrones (*Supervised Pattern Recognition Procedures*) para detectar la variación en la composición específica de la muestra según la especie animal. El modelo PLSDA mostró una buena capacidad predictiva con el uso de la información proporcionada por cinco variables latentes (LVs) sobre la base de la validación cruzada (error de clasificación). La validación cruzada llevada a cabo con el sistema *leave-one-out* mostró una sensibilidad de 0.99 en calibración y 0.98 en validación. Los mismos valores se obtuvieron para la especificidad. El error de clasificación en validación cruzada fue de 0,022. En la Figura 41 se representan las muestras del colectivo CAL y las predicciones para cada muestra.

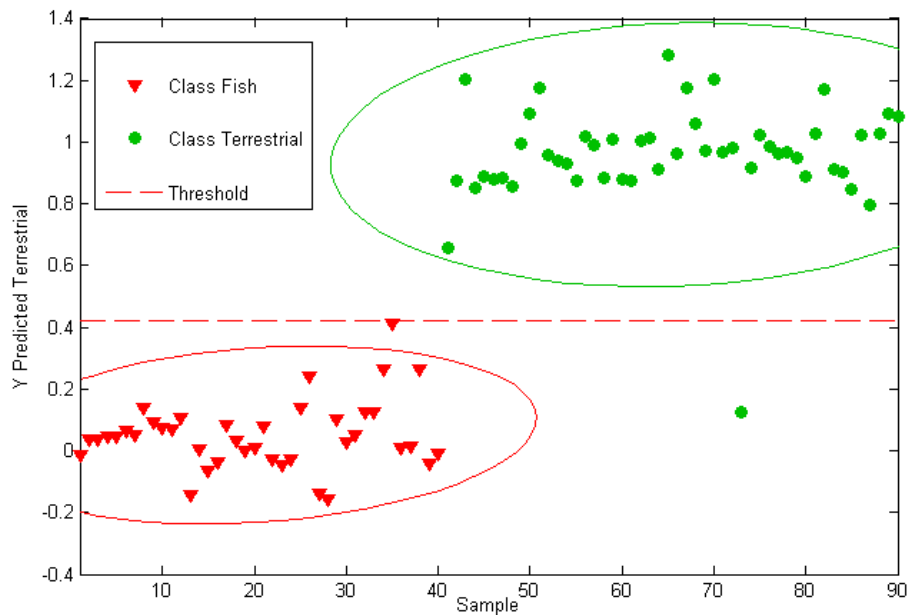


Figura 41. Representación grafica de los valores de la variable discriminatoria para cada muestra del colectivo CAL para la discriminación entre pescado y rumiante.

El algoritmo PLSDA clasificó correctamente 99% de las muestras del colectivo CAL. Como muestra Figura 41 muestra, sólo una muestra de harina terrestre fue clasificada erróneamente como HP, lo que indica que las muestras de HP son muy distinguibles de las muestras terrestres con el uso de la tecnología NIR-CI. El modelo fue validado utilizando un colectivo externo llamado VAL. Durante la validación externa, se midió la capacidad de predicción, definida como el porcentaje de muestras del colectivo VAL correctamente clasificado por los modelos. El número de píxeles correctamente clasificados para cada una de las muestras se indica en la Tabla 16 en forma de porcentaje.

Tabla 16. Porcentaje de pixels correctamente clasificados utilizando el modelo PLSDA. En negrita las predicciones con valores de exactitud inferiores al 90%.

VAL	% pixeles corr. class.	VAL	% pixeles corr. class.
*HP. 1	99.81	HT 1 (rumiante)	99.84
HP. 2	99.84	HT 2 (cerdo)	99.89
HP. 3	99.58	HT 3 (cerdo)	99.76
HP. 4	100.00	HT 4 (cerdo)	99.63

VAL	% píxeles corr. class.	VAL	% píxeles corr. class.
*HP. 1	99.81	HT 1 (rumiante)	99.84
HP. 5	100.00	HT 5 (ave)	99.84
HP. 6	99.44	HT 6 (cerdo)	99.76
HP. 7	99.66	HT 7 (ave)	99.50
HP. 8	83.81	HT 8 (cerdo)	99.79
HP. 9	97.22	HT 9 (ave)	99.68
HP. 10	100.00	HT 10 (cerdo)	100.00
HP. 11	92.35	HT 11 (ave)	99.97
HP. 12	99.31	HT 12 (cerdo)	99.95
HP. 13	68.54	HT 13 (ave)	100.00
HP. 14	91.51	HT 14 (ave)	99.97
HP. 15	97.41	HT 15 (ave)	99.88
HP. 16	91.32	HT 16 (ave)	99.89
HP. 17	49.36	HT 17 (ave)	87.33
HP. 18	99.55	HT 18 (cerdo)	99.92
HP. 19	98.86	HT 19 (cerdo)	99.95
HP. 20	99.07	HT 20 (rumiante)	99.84
HP. 21	99.84		
HP. 22	98.76		
HP. 23	97.54		
HP. 24	63.36		
HP. 25	76.56		
Error HP %	7.89	Error HT %	0.78

*HP.: harina de pescado. HT.: harina de animales terrestres.

Un total de 92,11% de los píxeles de las muestras de HP fueron clasificados correctamente, mientras que el 99,22% de los píxeles pertenecientes a muestras de HT fueron correctamente clasificados (valores medios). Los píxeles de seis muestras fueron predichos con una exactitud inferior al 90%, pero sólo una muestra (pesc. 17) fue incorrectamente clasificados ya que más del 50% desus píxeles fueron clasificados como prertenecientes a la especie terrestre. La variabilidad de los resultados obtenidos,

calculado en términos de STD, fue mayor para las predicciones de las harinas de pescado de clase debido a la incorrecta clasificación de la muestra 17 de pescado.

4. 3. 2. SELECCIÓN DE COLECTIVOS REPRESENTATIVOS

Como hemos visto anteriormente, el análisis exploratorio proporcionó resultados satisfactorios en términos de porcentaje de muestras correctamente clasificadas. Sin embargo, utilizando únicamente el espectro medio de cada muestra del colectivo CAL, la técnica NIR-CI es similar a la espectroscopía NIRS clásica. Como hemos indicado en la revisión bibliográfica, un aspecto crítico del análisis NIR-CI es la selección de píxeles que sean representativos de la muestra que se está analizando. Una ventaja de NIR-CI es, en efecto, que una sola muestra se divide en muchas submuestras (los píxeles), cada una de ellas representada por un espectro. En muestras de harinas animales, se pueden encontrar muchos píxeles correspondientes a una partícula de un tejido específico (pelo, plumas, sangre, grasa, piel, músculo y hueso) y estas partículas son las que conforman las características de la muestra.

Teniendo en cuenta esto, parece conveniente apoyar la selección de píxeles representativos como un método adecuado para la construcción de un colectivo CAL capaz de generar un sólido modelo PLSDA. Como se ha indicado anteriormente, se probaron cuatro métodos diferentes: dos basados en la información espacial (método de interpolación y método de agrupación por binning) y los otros dos basados en la información espectral (cálculo de la MD y método de Kennard-Stones). La Figura 42 muestra los dos primeros componentes principales de una muestra de HP y los píxeles seleccionados utilizando los cuatro diferentes métodos.

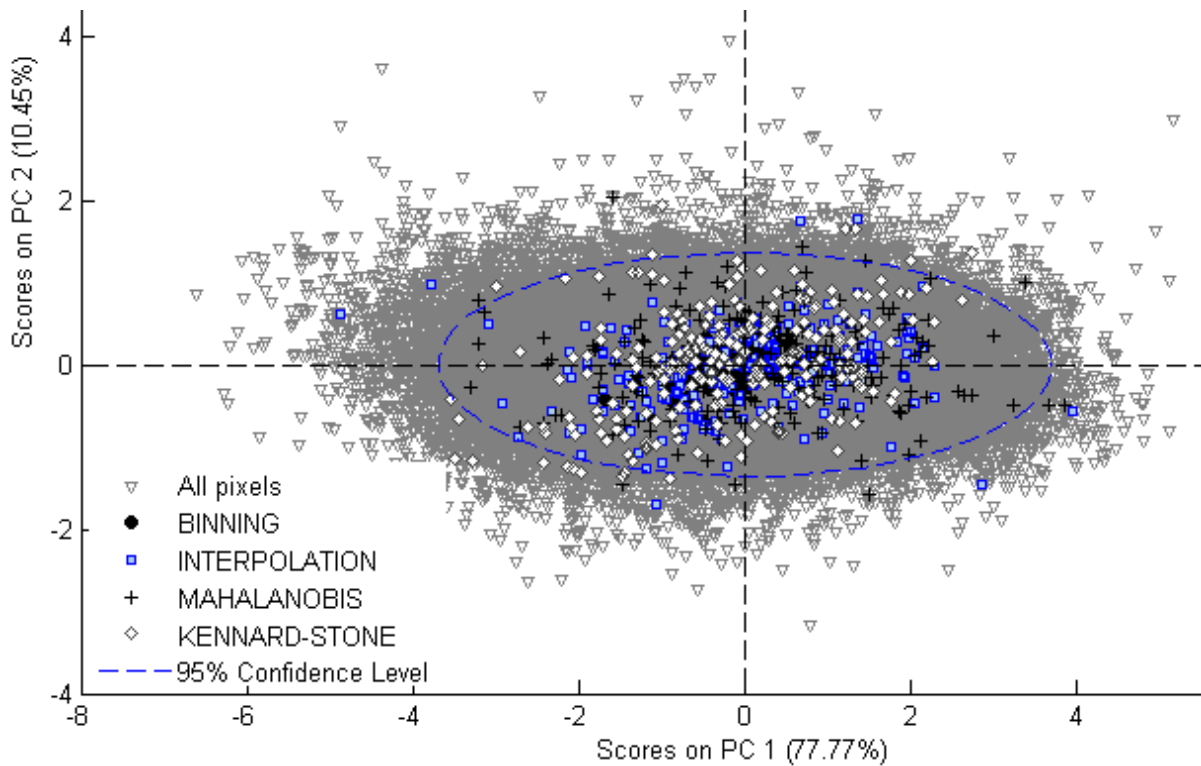


Figura 42. PC1 vs. PC2 de una muestra de HP. Píxeles seleccionados utilizando 4 diferentes métodos de selección de píxeles.

Como mostrado en la la Figura. 42, el método de interpolación espacial dio lugar a la mayor variabilidad espectral de los dos primeros PCs, ya que los píxeles aparecen son más ampliamente distribuidos en el espacio con respecto al resto de los grupos. Para estudiar la similitud entre la variabilidad del nuevo sub-grupo y la variabilidad del colectivo original, se estudió la similitud entre los valores de media y varianza de los dos colectivos mediante el uso del estadístico llamado *Lambda de Wilks* [11] obtenido a seguito de un análisis de correlación canónica considerando cada colectivo como un grupo. El estadístico *Lambda de Wilks* está constituido por la relación de la suma dentro del grupo de los cuadrados y suma total de cuadrados y se suele utilizar para la selección de características [12] o para estudiar las diferencias entre medias en el análisis discriminante, de forma que cuanto menor sea el valor *Lambda* para una variable independiente, más esta variable contribuye a la función discriminante. Everitt y Dunn [13] y Polit [14] proporcionan más detalles sobre el uso y la interpretación del estadístico *Lambda de Wilks*. Los píxeles obtenidos tras el tratamiento de Bin muestran los valores de *Lambda de Wilks* más altos tanto para las harinas de pescado como para las HTs.

(Tabla 15), seguidos por los píxeles seleccionados con el método de interpolación espacial, lo que muestra que estos dos métodos tienen la mayor capacidad para conservar la variabilidad original de los datos en su conjunto.

Tabla 17. Valores de Wilk's Lambda values for pixels selected with four different methods.

	BIN ¹	INT	KEN	MD
HP	1.000	0.999	0.996	0.998
HT	1.000	0.999	0.997	0.998

¹ BIN: Binning. INT= Interpolación espacial. KEN= Kennard-Stone.

Este resultado es muy valioso, ya que ayuda a explicar el comportamiento espectral de los píxeles que pertenecen a una muestra heterogénea, donde las partículas son muy similares entre sí, pero no es exactamente las mismas para cada componente de una muestra.

4. 3. 3. RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN EXTERNA

El análisis PLSDA fue aplicado a los cuatro colectivos CAL y al colectivo VAL. Los pretratamientos espectrales incluyeron DT, SNV, y *Mean Center*. La Figura 43 muestra las contribuciones de las variables expresadas como pesos de los *loadings* en las cuatro primeras variables latentes identificados por PLSDA. Las longitudes de onda con valores más grandes de peso son importantes para discriminar entre las dos clases de harinas.

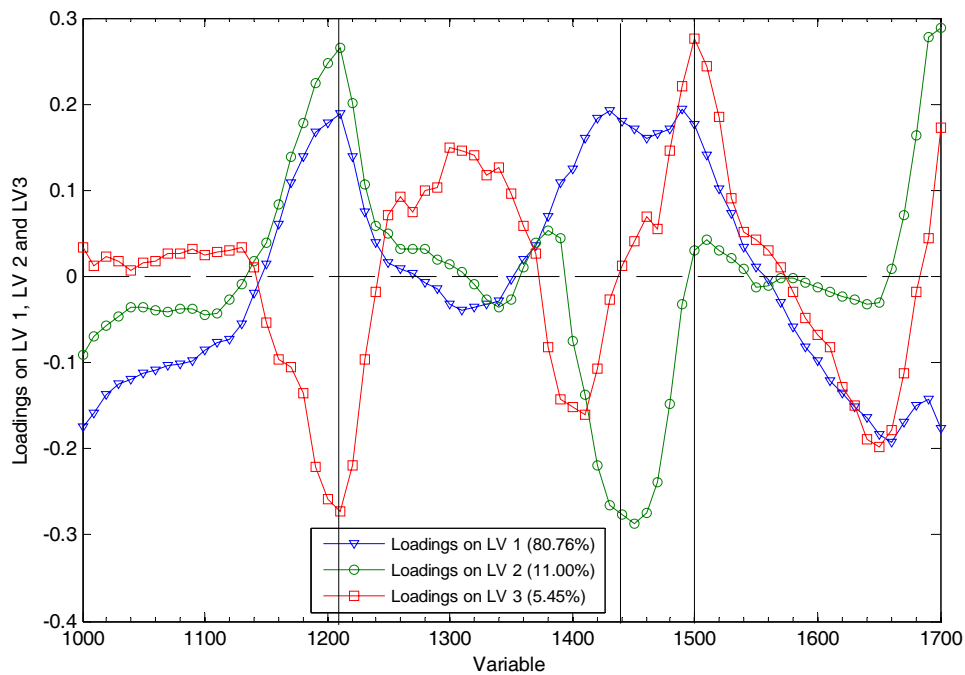


Figura 43. Peso de las variables par alas primeras tres variables latentes (LVs) en el modelo PLSDA.

Las variables con mayor peso en sus *loadings* correspondían a la zona del espectro alrededor de 1200 nm para todas las LVs y alrededor de 1500 nm para la primera y para la tercera LV. En torno a 1450 nm se observa otro pico tanto en la LV primera como en la tercera, probablemente debido a diferencias en el contenido de humedad ya que la región de absorción de agua se encuentra en esta zona del espectro. Los resultados del análisis de los *loadings* confirmaron que las longitudes de onda arriba indicadas son las que proporciona más información acerca de las diferencias espectrales entre la HP y de HT. La longitud de onda de 1200 nm se asocia a la absorción de grasa, mientras que la longitud de onda nm 1500 se asocia con la absorción de aminoácidos. Las diferencias entre los espectros refleja la composición química de las muestras; la HP difiere de la HT, principalmente en términos de grasas y de proteínas. Esta información es útil para posibles investigaciones sobre la reducción de variables como tratamiento alternativo o adicional a la reducción de píxeles.

La Figura 44 muestra los *scores* de las dos primeras LVs del modelo PLSDA. Las muestras de HP se pueden distinguir de las muestras de HT razonablemente bien, aunque algunas muestras de HT parecen estar incluidos en el grupo de la HP.

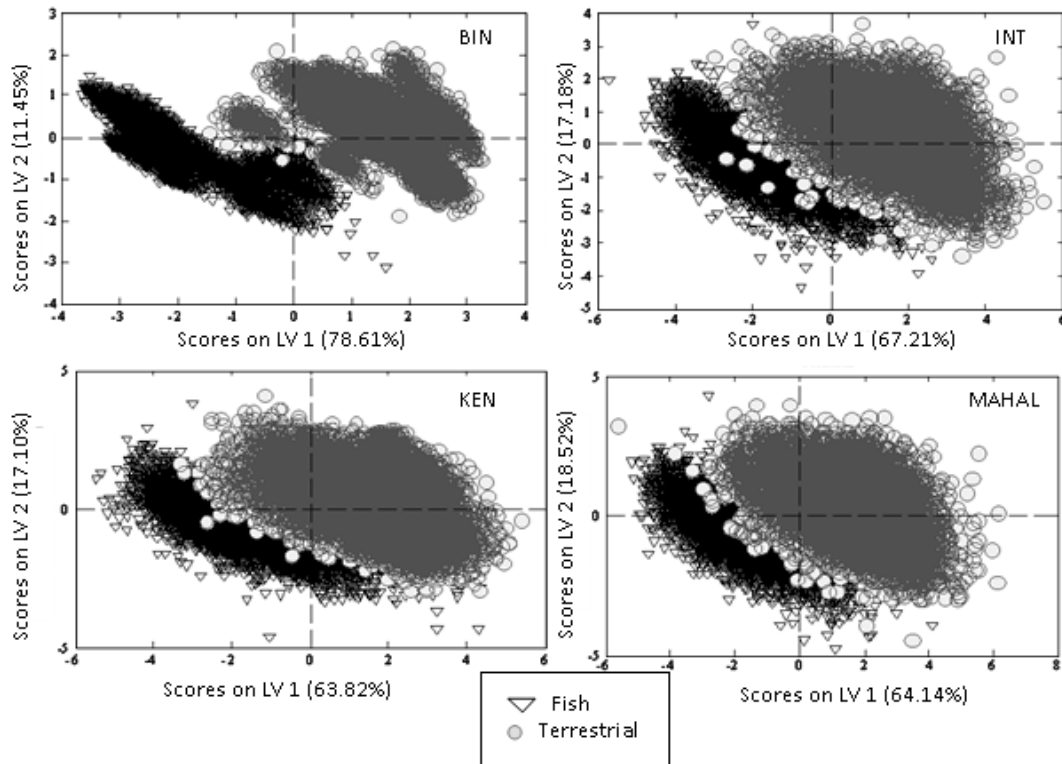


Figura 44. Diagrama de los *scores* de las dos primeras LVs para los cuatro colectivo de calibración (píxeles seleccionados utilizando cuatro diferentes métodos).

Los píxeles correspondientes al tratamiento Bin parecían tener una mayor distancia entre las dos clases. (Tabla 18). Los estadísticos obtenidos en cada modelo creado con los cuatro diferentes colectivos indican una considerable exactitud y una baja tasa de píxeles no correctamente clasificados en calibración.

Tabla 18. Estadísticos para la discriminación de harinas de pescado y terrestres usando PLSDA.

Método selección píxeles	BIN	INT	KEN	MD
Número espectros	19890	22680	20700	20700
Pretratamiento		DT, SNV, Mean Center		
Num. LVs	8	9	8	8
CV		Bloques contiguos		

Método selección pixels	BIN	INT	KEN	MD
Modeled Class		1: HP, 2: HT		
Sensibilidad (Cal)	1.000	0.993	0.992	0.990
Especificidad(Cal)	1.000	0.993	0.992	0.990
Sensibilidad (CV)	0.998	0.986	0.985	0.984
Especificidad (CV)	0.998	0.986	0.985	0.984
Class. Err (Cal)	0.000	0.007	0.008	0.009
Class. Err (CV)	0.001	0.013	0.014	0.016

Cal: calibración. CV: validación cruzada.

Los estadísticos obtenidos para cada modelo creado con los diferentes colectivos de calibración indican que el modelo creado con el método Bin proporciona los mejores valores de sensibilidad y especificidad tanto en calibración como en validación cruzada. Estos resultados concuerdan con los valores de *Lambda de Wilk*, lo que confirma que el sub-grupo más parecido al colectivo original en términos de media y la varianza proporciona una mayor exactitud. Los cuatro modelos se utilizaron para predecir el el colectivo VAL. La Figura 46 muestra graficamente los resultados de los modelos PLSDA y los resultados para la predicción de HT.20 (rumiante), perteneciente al colectivo VAL.

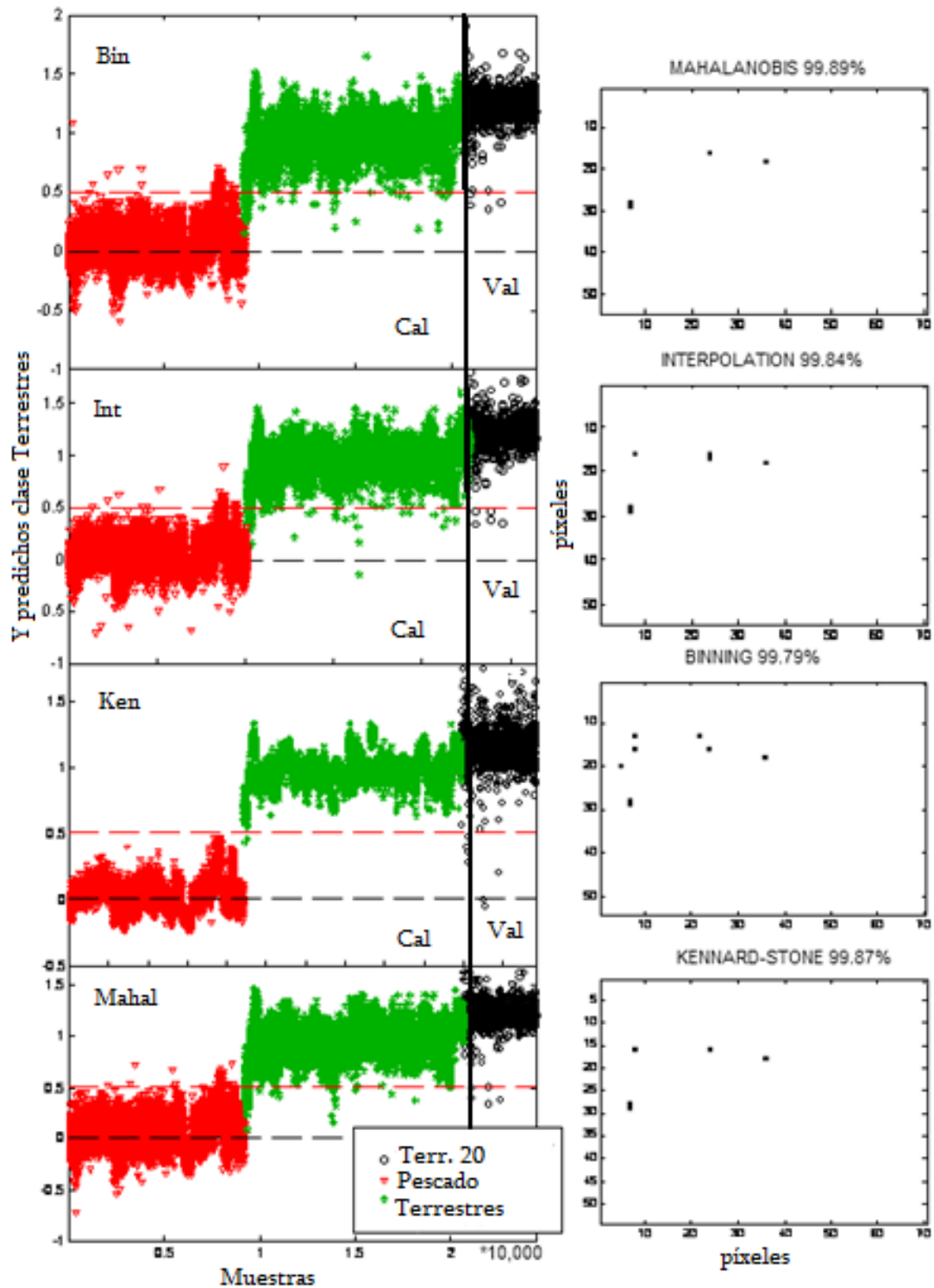


Figura 45. Izquierda: muestras CAL vs. predichas (clase pescado=0, clase terrestre=1) y muestra VAL HT. 20. Derecha: mapa de predicciones de la muestra Terr. 20 (en negro: píxeles predichos como clase HP, en blanco: píxeles predichos como clase HT).

En el colectivo CAL, las muestras de HT son perfectamente distinguibles de las muestras de pescado (Tabla 15). El porcentaje más alto de píxeles correctamente clasificados se obtuvo usando el método de la MD: sólo cuatro píxeles entre 3780 fueron clasificados erróneamente como HP (es decir, el 99,89% de los píxeles fueron clasificados correctamente). El examen de la distribución espacial de la predicción muestra que los píxeles mal clasificados se agrupan identificando partículas específicas en los cuatro modelos, lo que confirma la consistencia de los resultados. Estos píxeles pueden haber sido afectados por un efecto de dispersión de la luz debido a las diferencias de tamaño entre partículas, o puede corresponder a partículas de un componente que tiene características comunes entre los dos tipos de harinas. La clasificación de los píxeles fue realizada para todas las muestras del colectivo VAL y los resultados se muestran en la Tabla 16.

Tabla 19. Resultados de la predicción del colectivo CAL, expresado como % de píxeles correctamente clasificados. Comparación entre modelos contruidos utilizando diferentes colectivos CAL.

VAL	BIN	INT	KEN	MD	VAL	BIN	INT	KEN	MD
HP 1	100.00	100.00	100.00	100.00	HT 1	99.89	100.00	99.97	99.97
HP 2	99.97	100.00	100.00	100.00	HT 2	99.97	100.00	99.97	100.00
HP 3	99.68	100.00	100.00	100.00	HT 3	99.92	99.97	100.00	100.00
HP 4	100.00	100.00	100.00	100.00	HT 4	99.84	99.92	99.95	99.95
HP 5	100.00	100.00	100.00	100.00	HT 5	99.97	100.00	99.97	100.00
HP 6	99.79	99.95	99.92	99.95	HT 6	99.97	100.00	100.00	100.00
HP 7	99.81	100.00	100.00	100.00	HT 7	99.73	99.71	99.76	99.73
HP 8	99.92	99.95	99.92	99.81	HT 8	99.79	99.95	99.95	99.95
HP 9	99.95	99.97	99.97	99.97	HT 9	99.92	99.97	99.95	99.97
HP 10	100.00	100.00	100.00	100.00	HT 10	100.00	100.00	100.00	100.00
HP 11	99.95	100.00	99.97	99.97	HT 11	100.00	100.00	100.00	100.00
HP 12	99.95	99.97	99.95	99.97	HT 12	100.00	100.00	100.00	100.00
HP 13	99.87	99.97	99.92	99.92	HT 13	99.97	100.00	100.00	100.00
HP 14	99.92	100.00	100.00	100.00	HT 14	99.92	99.97	99.97	99.97
HP 15	99.71	100.00	100.00	100.00	HT 15	100.00	100.00	100.00	100.00

VAL	BIN	INT	KEN	MD	VAL	BIN	INT	KEN	MD
HP 16	99.95	100.00	100.00	100.00	HT 16	99.89	99.95	99.97	100.00
HP 17	98.46	99.97	99.66	99.95	HT 17	95.69	97.59	96.40	97.75
HP 18	99.97	99.97	100.00	100.00	HT 18	99.92	100.00	100.00	100.00
HP 19	100.00	100.00	100.00	100.00	HT 19	99.97	99.97	99.97	99.97
HP 20	99.97	100.00	100.00	100.00	HT 20	99.79	99.84	99.87	99.89
HP 21	99.92	100.00	100.00	100.00					
HP 22	99.97	100.00	99.97	99.97					
HP 23	99.89	100.00	99.95	100.00					
HP 24	95.35	97.09	96.22	95.08					
HP 25	96.43	99.73	99.23	99.34					
Error HP %	0.46	0.14	0.21	0.24	Error HT %	0.29	0.16	0.21	0.14

Unicamante dos muestras (HP 24 y HT 17) de las 45 muestras del colectivo VAL dieron lugar a un error de clasificación superior al 1%. El el valor medio de error de clasificación fue de 0,2% para los cuatro modelos. La predicción fue, por lo tanto, más exacta con respecto al modelo creado utilizando el espectro medio de las muestras del colectivo CAL (ver Tabla 14), y todas las muestras fueron predichas con una exactitud superior al 90%. La muestra HP 17, clasificada como HT por el modelo creado con los epspectros medios, fue clasificada como HP con un error de tan sólo el 0,3% por los nuevos modelos creados. El resto de las muestras clasificadas anteriormente con una exactitud inferior al 90% (muestras HP 8, 13, 24 y 25 y HT 17) fueron clasificadas con una exactitud mucho mayor.

El método de selección de píxeles que mostró el valor medio de píxeles correctamente clasificados más alto fue el basado en la interpolación espacial, que registró una exactitud media en predicción del 99,86%. En el caso de la predicción de muestras terrestres, el modelo creado con los píxeles seleccionados a través de la MD pareció ser más preciso que el resto, aunque el valor medio (99,86%) era muy similar al obtenido con el método de interpolación espacial (99,84%). En cuanto a la exactitud de la predicción, la

interpolación espacial proporcionó los resultados más estables para la predicción de las muestras de HP (STD = 0.58), mientras que el método basado en la MD proporcionó en todos los casos mejores resultados (STD = 0.50) para la predicción de HT.

Los resultados obtenidos en este estudio son similares a los reportados utilizando técnicas basadas en en DNA [15]. En el estudio citado, las partículas de harinas de rumiantes fueron detectados en harinas carne de cerdo y MBM. La tecnología NIR-CI tiene, sin embargo, la ventaja de ser no destructiva, por lo que puede ser utilizada como paso previo a las técnicas basadas en el estudio del DNA.

4.4. CONSIDERACIONES FINALES

En este capítulo se describe un método para distinguir las diferentes especies de Harinas animales a través del estudio de sus imágenes hiperespectrales. Un aspecto clave puesto en evidencia en este estudio fue que el poder discriminante de los modelos PLSDA alcanzado utilizando el espectro medio de cada muestra fue inferior que el obtenido utilizando los espectros más representativos de cada muestra. Esto pone de manifiesto la ventaja de utilizar los datos hiperespectrales en lugar de un solo punto espectro, lo que confirma que NIR-CI es un valido candidato para el análisis de muestras pulverulentas como las harinas animales.

Por otra parte, de los cuatro diferentes métodos de selección de píxeles comparados, los resultados más exactos de clasificación se obtuvieron con los dos modelos creados con píxeles seleccionados con el método de interpolación espacial de las imágenes de la muestra original y con los píxeles seleccionados con el método basado en la MD. El método de interpolación espacial fue finalmente considerado el más idóneo por su mayor simplicidad con respecto al cálculo de la MD. Estos resultados son muy prometedores e indican claramente el poder de NIR-CI para la discriminación de especies en Harinas animales.

4.5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Geladi, P., Burger J. and Lestander, T. (2004). Hyperspectral imaging: calibration problems and solutions. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. Volume 72, Issue 2, Pages 209-217.
- [2] 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: 772-777.
- [3] Derde, M. P., Kaufman, L. and Massart, D. L. (1989). A non-parametric class modelling technique. *Journal of Chemometrics* Volume 3, Issue 2, pages 375-395.
- [4] Wold, S., Sjostrom, M. and Eriksson, L. (2001). PLS-regression: A basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, vol.58, 109-130.
- [5] Livens, S. and Kleihorst, R. (2009). Compression of Remote Sensing Images for the PROBA-V Satellite. *MissionAdvanced. Concepts for Intelligent Vision Systems. Lecture Notes in Computer Science*, 5807, 577-586.
- [6] Pokrajac, D., R. Hoskinson, A. Lazarevic, and Z. Obradovic. 2002a. Spatial-Temporal Techniques for Prediction and Compression of Soil Fertility Data. *Proceedings of the Sixth International Conference on Precision Agriculture and other Precision Resource Management*. Minneapolis, MN, in press.
- [7] Shenk, J.S. and Westerhaus, M.O. (1991). Population definition, sample selection, and calibration procedures for near-infrared reflectance spectroscopy. *Crop Science* 31, 469-474.
- [8] Naes, T., Isaksson, T., Fearn, T. and Davies, T. (2002) *A User-Friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification*. NIR Publications: Chichester.

- [9] Riccioli, C., Saeys, W, Vallesquino-Laguna, P., Pérez-Marín, D., Guerrero-Ginel, J.E. and Garrido-Varo A. (2009) Calibration pixel selection for hyperspectral discrimination of ruminant and fish animal by-products. Proceedings of the 14th International Conference on Near Infrared Spectroscopy. In press. Bangkok, Thailand.
- [10] Garrido-Varo, A., Pérez-Marin, D., Guerrero, J.E., Boix, A, Slowikowski, B., Fernandez, J.A., Baeten, V. y Dardenne, P. (2008). Wavelength range optimization for multivariate discrimination of species in animal by-product meals analysed by NIR-microscopy. . Proceedings of the 11th international conference on chemometrics for analytical chemistry, 103 Vol 4. Montpellier (France).
- [11] Krzanowski, W. J. (1998). Principles of Multivariate Analysis (Oxford University Press).
- [12] El Ouardighi, A., El Akadi, A., Aboutajdine, D. (2007). Feature Selection on Supervised Classification Using Wilk's Lambda Statistic. In 3rd International Symposium on Computational Intelligence and Intelligent Informatics – ISCIII (Agadir, Morocco).
- [13] Everitt B. S., Dunn G. (1991). Applied Multivariate Data Analysis (Edward Arnold, London).
- [14] Polit, D. F. (1996).Data Analysis and Statistics for Nursing Research (Appleton and Lange, Stamford, CT).
- [15] Huby-Chilton F, Murphy J, Chilton NB, Gajadhar AA, Blais BW. (2010). Detection of prohibited animal products in livestock feeds by single-strand conformation polymorphism analysis. J Food Prot. 73(1):119-24.

CAPÍTULO 5. COMPARACIÓN DE MÉTODOS MULTIVARIANTES PARA LA DETECCIÓN DE COMPOSICIÓN DE HARINAS DE ORIGEN ANIMAL

5.1. OBJETIVOS

El objetivo de este estudio fue comparar diferentes herramientas de estadística multivariante, entre las cuales se encuentra el algoritmo PLSDA, el método SIMCA y el método CART, cuyo funcionamiento ha sido descrito en el capítulo 1 de esta tesis, para determinar cuál de ellas maximiza el rendimiento en la clasificación entre especies animales en harinas cárnicas.

5.2. METODOLOGÍA

5.2.1. SELECCIÓN DE PÍXELES

En el capítulo anterior se mostró como una adecuada selección de píxeles por cada muestra para construir el colectivo CAL contribuye a incrementar los resultados en clasificación. En este estudio se eligió el algoritmo de interpolación espacial que es el que mejores resultados obtuvo en dicho capítulo, como método para seleccionar píxeles representativos. Se aplicó una interpolación de 16 x 16 obteniendo $N = 252$ píxeles por cada imagen. Los algoritmos PLSDA, SIMCA y CART fueron utilizados para la clasificación de 125 muestras del colectivo procedente del Banco de Alimentos Valorados de la UCO.

Se dividió el set de datos en colectivo CAL formado por 91 muestras y colectivo VAL formado por 34 muestras. Las muestras pertenecían a tres clases diferentes según la especie animal que las conformaba. La Tabla 20 muestra el número de píxeles que constituyen cada uno de los grupos de los colectivos CAL y VAL.

Tabla 20. Número de píxeles por cada especie de los colectivos CAL y VAL.

	CAL	VAL	TOT
Clase 1: Cerdo	9576	3780	13356
Clase 2: Ave	9576	3528	13104
Clase 3: Rumiante	3780	1260	5040
Total	22932	8568	31500

La metodología empleada para el análisis de las muestras así como los parámetros elegidos (cantidad de muestra, rango espectral, resolución espectral) fueron los mismos ya puestos a punto en el capítulo 2.

5.2.2. PLSDA

Para la aplicación del algoritmo PLSDA, se utilizó la combinación de pretratamientos espectrales SNV - DT - *Mean Center*, la misma utilizada en el capítulo 4 de esta tesis y en trabajos preliminares [1]. El número óptimo de variables latentes a emplear fue elegido a través del error de clasificación en validación cruzada. La validación se calculó utilizando bloques contiguos ya que, debido a la gran cantidad de datos, los otros métodos de validación cruzada impiden el desarrollo de los cálculos. La comparación entre diferentes modelos en términos de exactitud y capacidad predictiva se llevó a cabo a través del estudio de los estadísticos de sensibilidad, especificidad y error de clasificación en validación cruzada. También se calcularon los porcentajes de píxeles correctamente clasificados aplicando los modelos a un colectivo externo de validación.

En relación al estudio de sensibilidad y especificidad, nos detuvimos en las curvas ROC [2] para evaluar sensibilidad y especificidad en función del umbral elegido para cada clase o especie animal.

5.2.3. SIMCA

Se estudió la viabilidad del algoritmo SIMCA construyendo modelos PCA, uno por cada clase del colectivo CAL. A cada clase se asignó un número diferente de componentes principales (PC), dependiendo de la estructura de los datos de cada clase. En este estudio se eligieron 6 PCs para las clases 1 y 2 (cerdo y ave) y 5 PCs para la clase 3 (rumiante) basándose en los valores de RMSECV. Una vez construido el modelo SIMCA, se procedió a la clasificación de las muestras del colectivo VAL. En este caso no se utilizaron pre-tratamientos espectrales a parte del *Mean Center* ya que, después de probar diferentes combinaciones, se vio que cualquier otro tipo de tratamiento disminuía la capacidad predictiva de los modelos.

5.2.4. CART

El tercer y último método estudiado para probar su viabilidad en la clasificación de harinas animales según la especie fue el Árbol de Clasificación y Regresión (CART). A partir de un nodo raíz, que incluía todas las especies, el árbol fue ramificándose en diferentes nodos “hijo” que contenían un subgrupo de casos. El criterio óptimo de ramificación (o partición) fue seleccionado después de examinar todos los posibles valores de todas las variables predictivas disponibles. En los nodos terminales (hojas del árbol) se obtuvo una agrupación homogénea de los casos en cuanto al valor de la variable dependiente.

Se creó el árbol de clasificación t a partir de los espectros pretratados y de la información Y (clases). El pretratamiento elegido fue el uso exclusivo de SNV, ya que, después de varias pruebas, se vio que el uso de DT y *Mean Center* empeoraba las clasificaciones de las muestras VAL.

Entre los parámetros usados para evaluar el modelo, se evaluó el costo del árbol de decisiones en validación cruzada calculado como la suma de los costes de clasificación errónea de las observaciones en ese nodo. La validación cruzada utilizada fue por bloques de 10 e implicó los siguientes pasos:

1. Se dividió la muestra en diez grupos mutuamente excluyentes y que tuvieran aproximadamente igual tamaño.
2. Se sacó un conjunto a la vez y se construyó el árbol con los datos de los grupos restantes. El árbol fue posteriormente usado para predecir la respuesta del conjunto eliminado.
3. Se calculó el error estimado para cada subconjunto.
4. Se repitieron los puntos 2 y 3 para cada tamaño de árbol.
5. Se seleccionó, por último, el árbol con la menor tasa de clasificación incorrecta.

5.2.5. OTROS ESTADÍSTICOS

El estadístico Hotelling's T^2 fue propuesto originariamente por Hotelling [3] y mide la variación de cada muestra dentro del modelo PCA. Se calcula como la suma de los cuadrados de los *scores* según la ecuación siguiente:

$$T_i^2 = x_i P_k \lambda^{-1} P_k^T x_i^T$$

Donde x_i es el vector de respuestas para la muestra i , P_k es la matriz de *loadings* y λ es una matriz diagonal que contiene los valores propios asociados a los vectores propios incluidos en el modelo PCA. El límite de control del gráfico T^2 se calcula según:

$$T_{k,m,\alpha}^2 = \frac{k(m-1)}{m-k} F_{k,m-k,\alpha}$$

Donde m es el número de análisis de la muestra que se han utilizado para construir el modelo PCA, k el número de PCs incluidos en el modelo PCA y $F_{k,m-k,\alpha}$ el valor de la distribución F para k y $m-k$ grados de libertad y una probabilidad α de cometer un error. El gráfico T^2 monitoriza la distancia de una nueva medida al valor de referencia en el espacio reducido de los factores PCA. Permite detectar si la variación incluida en los PCs considerados es más grande que la que le correspondería si solo influyeran variaciones

aleatorias. Las muestras fuera de control poseen un valor de T^2 superior al límite, y aparecen más allá de la línea de control.

Por otro lado, el estadístico Q-Residuals mide la falta de ajuste de la nueva muestra al modelo PCA desarrollado. Se calcula mediante la ecuación siguiente [4]:

$$Q_i = e_i e_i^T = x_i (I - P_k P_k^T) x_i^T$$

Donde e_i es la fila i de la matriz de los residuales (E), I es la matriz identidad, P_k la matriz de los k vectores de *loadings* incluidos en el modelo PCA y x_i es el vector fila de la respuesta de la muestra i . El límite de control del gráfico Q [5] se calcula según:

$$Q_\alpha = \Theta_1 \left[\frac{c_\alpha \sqrt{2\Theta_2 h_0^2}}{\Theta_1} + 1 + \frac{\Theta_2 h_0 (h_0 - 1)}{\Theta_1^2} \right]^{\frac{1}{h_0}}$$

Donde:

$$\Theta_i = \sum_{j=k+1}^n \lambda_j^i \quad \text{para } i = 1, 2, 3$$

y

$$h_0 = 1 - \frac{2\Theta_1 \Theta_3}{3\Theta_2^2}$$

k es el número de componentes principales retenidos en el modelo, λ_j el valor propio asociado al componente principal j , n el número total de componentes principales y c_α la STD normal correspondiente a un error (α) fijado. El valor de Q indica el grado de ajuste de cada muestra al modelo PCA y da una medida de la variación de la muestra no incluida en el modelo.

Otro parámetro utilizado en el presente estudio para conocer las variables influyentes en los modelos PLSDA es la Proyección de Variables Importantes (VIP, del inglés *Variables*

Important Projection) que identifica las longitudes de onda (λ) claves en el análisis [6]. VIP mide las variables X en base a su importancia relativa para todas las variables Y y todas las variables latentes. El cálculo desarrollado es el siguiente:

$$VIP_k = \left[\sum_{a=1}^A (w_{ak})^2 * SSY_a * \frac{K}{SSY_{tot,expl} * A} \right]^{1/2}$$

Donde SSY_a es la suma de cuadrados de Y explicado en el vector latente a , $SSY_{tot,expl}$ es la suma total de cuadrados de Y explicado en todos los vectores latentes A , y K es el número total de variables latentes en X. Una regla general para los valores VIP es que las variables en X con valores VIP inferiores a 0.8 no son importantes mientras que las variables con valores $VIP > 1$ son importantes [7].

5.3. RESULTADOS

Las muestras analizadas poseen características tanto físicas como químicas similares entre ellas: el tamaño de las partículas que componen las muestras es similar así como el color. Estos rasgos comunes a todas las harinas animales hacen que sea difícil apreciar diferencias visibles en algunas de las 71 longitudes de onda disponibles (1000-1700 nm /10 nm). La Figura 29 muestra las imágenes de 9 muestras, tres por cada especie, a la longitud de onda de 1200 nm.

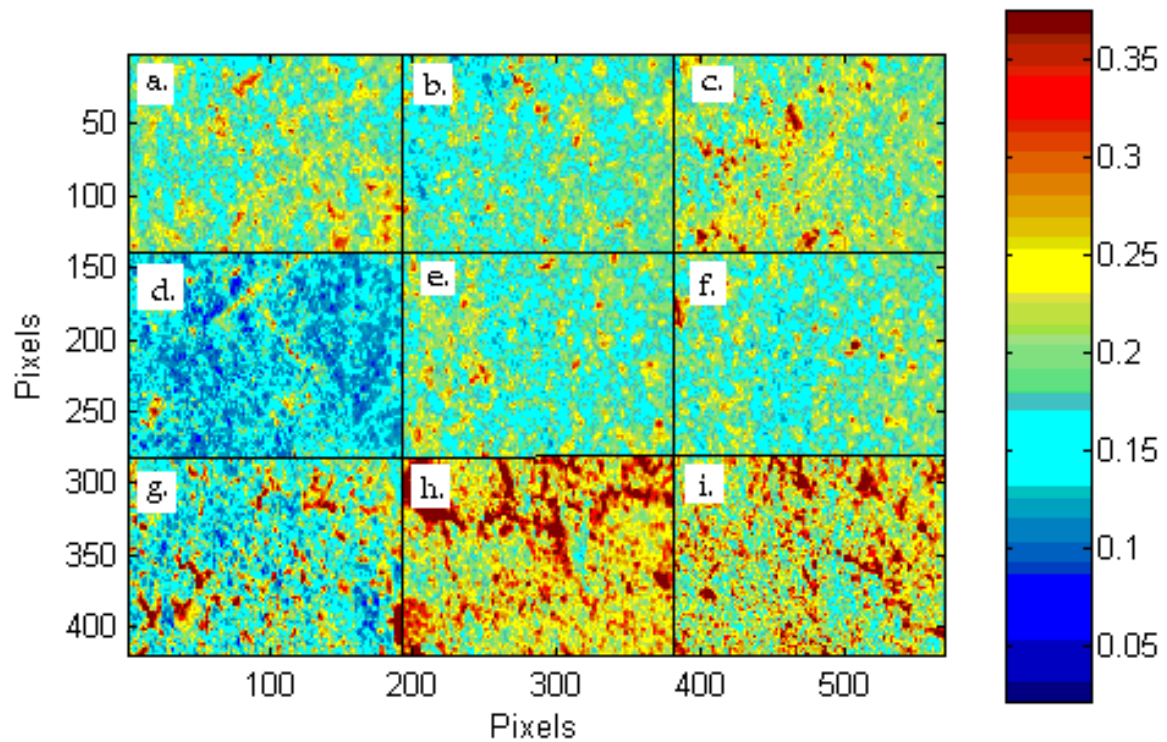


Figura 46. Muestras de harinas de ave (a, b, c), cerdo (d, e, f) y rumiante (g, h, i) a la longitud de onda de 1200 nm. Valores de absorbancia.

De un análisis visual de los valores de absorbancia de las muestras a 1200 nm, se notan ciertas diferencias entre las muestras, por ejemplo las muestras h. e i. de rumiante parecen tener valores de absorbancia más altos respecto al resto de las muestras y la muestra d. de harina de cerdo, al contrario, parece tener valores de absorbancia más bajos. A parte de esto, no se aprecian diferencias significativas que puedan aportar información sobre las distintas especies animales. Repitiendo la observación de los valores de absorbancia en todas las longitudes de onda, no se observaron longitudes de onda significativas, incluso probando diferentes pretratamientos espectrales. Llegamos por lo tanto a la conclusión que el uso de herramientas quimiométricas era necesario.

5.3.1. PLSDA

Con el total de píxeles procedentes de las muestras analizadas se procedió a calcular el valor medio de muestras no correctamente clasificadas utilizando validación cruzada, a fin de utilizar el error de clasificación obtenido para seleccionar el número de variables latentes (indicadas como LVs del inglés *Latent Variables*) a emplear en los modelos de clasificación.

En la Figura 47 se representan los errores de clasificación de cada clase en las primeras 20 LVs.

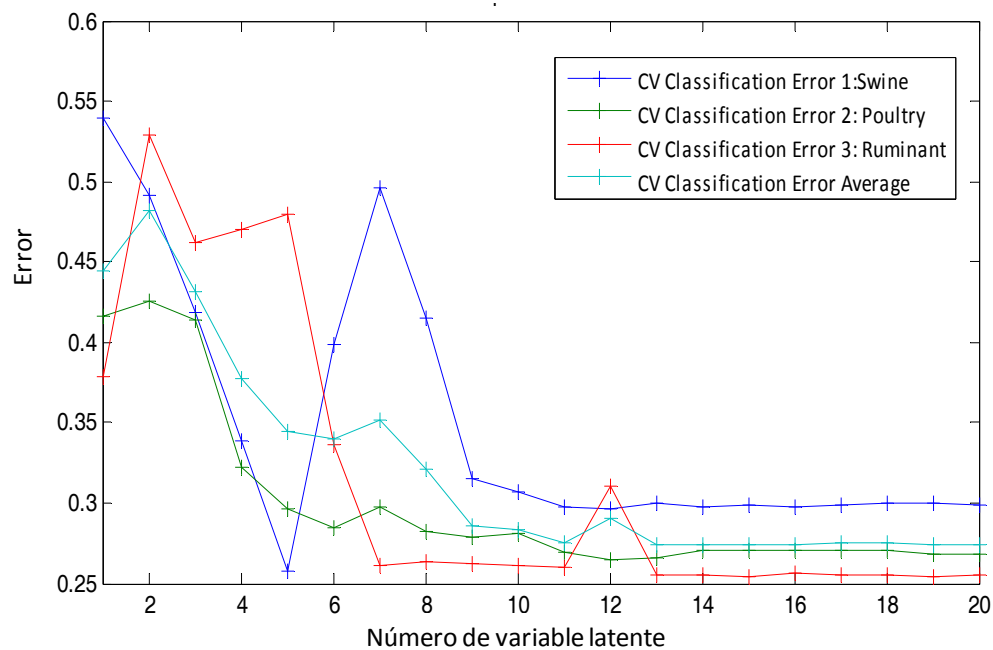


Figura 47. Error de clasificación 1 (cerdo), 2 (ave) y 3 (rumiante) y valores medios en función del número de LVs.

Para la especie, el menor error se obtuvo con un número de LVs = 5, sin embargo, para este número de VL, la especie rumiante presentaba un error en CV alrededor de 0.5 (50% de los píxeles incorrectamente clasificados). Para 7 LVs el error en la clasificación de la especie rumiante era relativamente bajo, sin embargo, el error relativo a la especie cerdo aumentaba. Esta tendencia a tener valores especulares, sea probablemente debida a la semejanza muy alta entre estas dos especies, ambas pertenecientes a la clase de los

mamíferos y consecuentemente más parecidas entre ellas que a la especie ave. Se decidió por lo tanto seleccionar el número de LVs donde el valor medio del error de clasificación fuera menor ($N = 13$).

Seguidamente se procedió a la creación del modelo PLSDA1 que produjo los resultados que se detallan en la Tabla 21.

Tabla 21. Estadísticos del modelo PLSDA1 ($N=22932$).

Clase	Pretrat.	CV	Sens. (Cal)	Espec. (Cal)	Sens. (CV)	Espec. (CV)	Class. Err (Cal)	Class. Err (CV)
Cerdo ($N=9576$)	SNV, DT, Mean Center	25 Bloques contiguos	0.81	0.75	0.78	0.69	0.20	0.28
Ave ($N=9576$)			0.84	0.79	0.78	0.72	0.19	0.25
Rumiante ($N=3780$)			0.86	0.66	0.91	0.89	0.11	0.22

Pretrat.: Pretratamiento. Sens.: Sensibilidad, Espec.: Especificidad, Class. Err.: Error de Clasificación.

Considerado el elevado error de clasificación en validación cruzada (entre 22 y 28%), y antes de proceder a la creación de los modelos, se decidió analizar el colectivo CAL para detectar datos anómalos. El método de selección de píxeles elegido (interpolación espacial) se basa en la elección de espectros según su localización en la imagen, sin embargo, no tiene en cuenta en ningún momento la información espectral. Esto implica la presencia de numerosos espectros anómalos (*outliers*), como se aprecia de la Figura 48, donde se muestran las proyecciones de los *scores* en las primeras dos variables latentes y el elevado número de espectros que se encuentran fuera del intervalo de confianza del 95%.

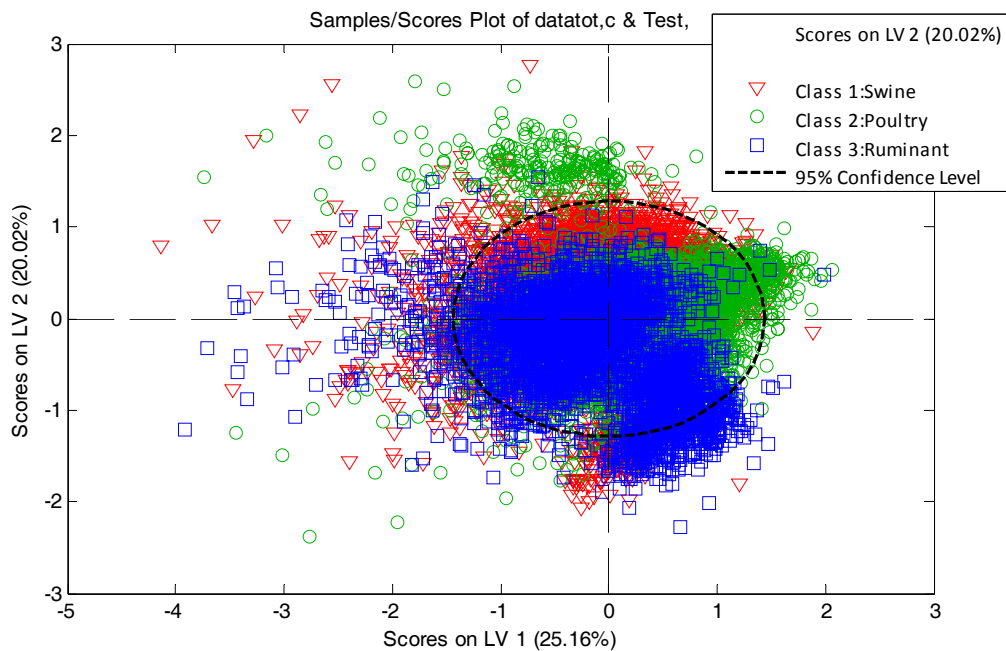


Figura 48. Detección de *outliers*. Limite de confianza 95%

Algunos autores [8] consideran que, dado el elevado número de espectros generados en el análisis NIR-CI, la eliminación de los *outliers* no es necesaria en cuanto a que no influye en la performance del modelo. Otros autores [9], al contrario, eliminan una gran cantidad de espectros correspondientes a píxeles anómalos con el fin de obtener una base de datos que tenga solamente la información relevante para el análisis que se quiera llevar a cabo.

Para comprobar la influencia de los *outliers* en las muestras de harinas animales, en este estudio se compararon dos modelos PLSDA. Al primer modelo creado con los píxeles originales sin la eliminación de *outliers* se le llamó PLSDA1. El segundo (PLSDA2) fue creado después de haber eliminado los anómalos espectrales a través del estudio individualizado de cada clase. Para conseguirlo se procedió a la aplicación de un análisis de componentes principales de las muestras pertenecientes a cada grupo por separado. Para la eliminación de los píxeles correspondientes a espectros anómalos se analizaron los estadísticos Hotelling's T^2 y Q-Residuals.

En total se eliminaron 663 píxeles (2,8% del total de píxeles pertenecientes al colectivo CAL): 221 de la clase cerdo, 379 de la clase ave y 63 de la clase rumiante.

Después de haber eliminado del modelo los píxeles indicados, se recalculó el modelo con los datos reducidos a 22269 espectros. Para el modelo PLSDA2 el número de variables latentes elegido para el cálculo del modelo fue nuevamente $N = 13$. La Tabla 22 muestra los estadísticos del modelos obtenidos en calibración y validación cruzada..

Tabla 22. Estadísticos del modelo PLSDA2 (N=22269).

CLASE	Preproc.	CV	Sens. (Cal)	Espec. (Cal)	Sens. (CV)	Espec. (CV)	Class. Err (Cal)	Class. Err (CV)
Cerdo (N=9355)	SNV, DT, Mean Center	25 Bloques contiguos	0.81	0.81	0.76	0.72	0.19	0.26
Ave (N=9197)			0.85	0.80	0.81	0.73	0.17	0.23
Rumiante (3717)			0.86	0.91	0.90	0.89	0.11	0.11

Para poder conocer las variables más influyentes en la discriminación, es decir, las longitudes de onda donde se explique una mayor diferencia entre las tres especies animales, se empleó la Proyección de Variables Importantes (VIP), obtenida de la clasificación PLSDA, como alternativa al análisis de los *loading*.

La VIP para el modelo PLSDA aparece representada en Figura 49.

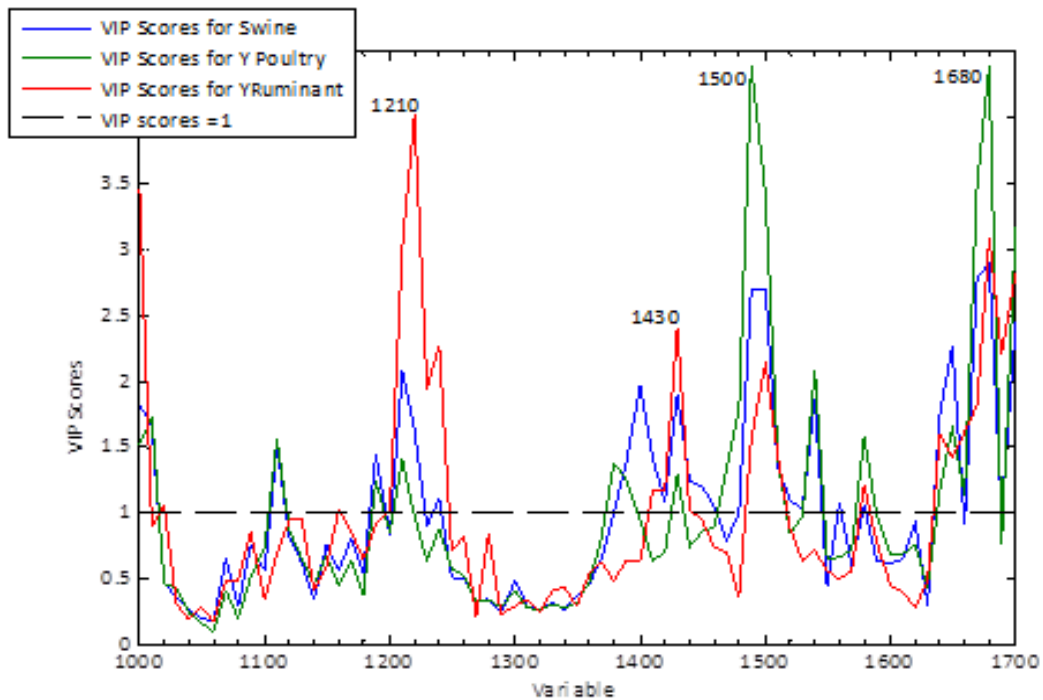


Figura 49. Valores VIP de las variables espectrales para las tres clases.

Analizando los valores VIP se detectaron 35 λ con valores VIP superiores a 1, es decir, influyentes, entre las 3 clases. De estas las más destacadas para las tres clases están situadas entre 1500 y 1510 nm, en 1210 nm, en 1430 nm y en 1680 nm. La zona alrededor de los 1210 nm se relaciona con absorciones de compuestos lipídicos, ya que allí se encuentra el segundo sobretono del enlace C-H. Concretamente, el pico localizado en 1215 nm se ha relacionado por otros autores [10] con el enlace CH₂. El primer sobretono del enlace O-H, también relacionado con el contenido en humedad, se localiza en torno a los 1455 nm. Otros autores [11], analizando carne de pollo con la misma instrumentación utilizada en esta tesis han observado las mismas bandas de absorción. La zona alrededor de 1500 nm está caracterizada por la absorbancia de aminoácidos [12]. La longitud de onda en la proximidad de 1700 nm ha sido citada por varios autores para describir diferencias en las características de perfil de ácidos grasos de una determinada grasa y, en particular, en la relación de ácidos grasos saturados vs. insaturados [13, 14].

Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con los expuestos en el apartado 3.3.5. del capítulo 3 de esta tesis donde se estudiaron los *loadings* de las componentes

principales y se observaron dos picos positivos en $\lambda=1500$ nm y $\lambda=1180$ y un pico negativo en $\lambda=1210$ nm.

Una de las estrategias utilizada frecuentemente para reducir el volumen de datos en imágenes hiperespectrales es la disminución de variables [15]. En este estudio se procedió a la construcción de un nuevo modelo utilizando las 35 variables resultados del análisis VIP lo que permitió reducir el volumen de datos casi a la mitad.

Aunque no se muestre gráficamente, el análisis PLSDA con las 35 λ seleccionadas dio lugar a un modelo con menor poder predictivo para la especie rumiante teniendo menor especificidad (0.64) y mayor error de clasificación en CV (0.36) con respecto al modelo creado con las 71 variables originales. Esto sugirió que la discriminación entre especies animales en harinas requiere la información proporcionada por todo el espectro NIR.

Los dos modelos creados con todas las variables (PLSDA1 y PLSDA2) fueron empleados para la validación del colectivo VAL. Para cada muestra se calcularon los porcentajes de pixeles clasificados como cerdo, ave y rumiante. La predicción de las muestras del colectivo VAL proporcionó los resultados mostrados en las Tablas 23, 24 y 25.

Tabla 23. Matriz de clasificación de la validación de los modelos PLSDA1 y PLSDA2 de la especie CERDO.

		Clasificado como...					
		Cerdo		Ave		Rumiante	
VAL		PLSDA2	PLSDA1	PLSDA2	PLSDA1	PLSDA2	PLSDA1
13457	val1	99.82	99.71	0.16	0.21	0.03	0.08
13828	val2	87.8	85.11	12.09	14.63	0.11	0.26
14002	val3	97.49	95.93	2.43	4.02	0.08	0.05
14146	val4	80.24	69.63	19.63	30.03	0.13	0.34
14220	val5	91.35	89.42	8.36	10.48	0.29	0.11
14321	val6	86.96	88.47	11.88	10.26	1.16	1.27
14347	val7	64.18	58.1	34.26	40.19	1.56	1.72
14500	val8	49.23	58.28	47.12	30.19	3.65	11.53
14503	val9	67.46	71.24	30.05	24.95	2.49	3.81
14587*	val10	48.91	41.51	50.58	57.99	0.5	0.5

14758	val11	90.53	87.59	9.21	11.98	0.26	0.42
14810	val12	95.95	93.47	3.49	5.9	0.56	0.63
14863	val13	92.94	91.24	6.35	7.33	0.71	1.43
14982	val14	56.59	56.01	43.25	43.44	0.16	0.56
15112	val15	79.66	72.22	20.16	27.62	0.19	0.16

* Muestras incorrectamente clasificadas.

En el caso de la especie cerdo, el porcentaje de píxeles correctamente clasificados fue de 83.92% en el caso del modelo PLSDA2 y 79.74% en el caso del modelo PLSDA1. Los falsos positivos (píxeles de otras especies clasificados como pertenecientes a la especie cerdo) representaron un 13.31% del total de los píxeles en el caso del modelo PLSDA2 y un 13.44% en el caso del modelo PLSDA1.

Tabla 24. Matriz de clasificación de la validación de los modelos PLSDA1 y PLSDA2 de la especie AVE.

		Clasificado como...					
		Cerdo		Ave		Rumiante	
VAL		PLSDA2	PLSDA1	PLSDA2	PLSDA1	PLSDA2	PLSDA1
13432	val1	3.39	2.96	96.22	96.32	0.40	0.71
13609	val2	2.70	3.25	95.71	94.44	1.59	2.30
14222	val3	2.78	2.28	97.04	96.43	0.19	1.30
14346	val4	4.26	3.94	94.87	92.94	0.87	3.12
14392	val5	22.51	25.05	74.81	64.66	2.67	10.29
14501	val6	4.18	3.97	93.52	95.03	2.30	10.53
14695	val7	12.20	11.98	87.70	87.62	0.11	0.40
14759	val8	19.71	19.39	79.81	79.23	0.48	1.38
14800	val9	15.90	17.04	83.76	80.87	0.34	2.09
14801	val10	47.17	44.10	52.25	54.05	0.58	0.85
14802	val11	43.20	40.79	54.60	56.51	2.20	2.70
14803	val12	7.49	6.77	91.80	91.38	0.71	1.85
14805*	val13	53.36	48.73	44.13	46.64	2.51	4.63
16756	val14	13.60	22.88	86.38	77.06	0.03	0.05

* Muestras incorrectamente clasificadas.

En el caso de la especie ave, el porcentaje de píxeles correctamente clasificados fue de 83.73% en el caso del modelo PLSDA2 y 82.04% en el caso del modelo PLSDA1. Los falsos positivos representaron un 14.97% del total de los píxeles en el caso del modelo PLSDA2 y un 16% en el caso del modelo PLSDA1.

Tabla 25. Matriz de clasificación de la validación de los modelos PLSDA1 y PLSDA2 de la especie rumiante.

VAL		Clasificado como...					
		Cerdo		Ave		Rumiante	
		PLSDA2	PLSDA1	PLSDA2	PLSDA1	PLSDA2	PLSDA1
13555	val1	0.03	0.00	0.05	0.00	99.92	100.00
13557	val2	0.11	0.05	0.03	0.05	99.87	99.89
13660	val3	0.03	1.14	0.00	0.00	99.97	98.86
13664	val4	0.24	1.06	0.27	0.66	99.50	98.28
16751	val5	0.00	0.05	0.07	0.03	99.97	99.92

Finalmente, en el caso de la especie ave, el porcentaje de píxeles correctamente clasificados fue de 99.85% en el caso del modelo PLSDA2 y 99.39% en el caso del modelo PLSDA1. Los falsos positivos representaron un 0.93% del total de los píxeles en el caso del modelo PLSDA2 y un 1.95% en el caso del modelo PLSDA1.

Además de calcular el porcentaje de píxeles clasificados en cada clase por cada muestra, se procedió a la remodelación de los valores Y predichos para la obtención de un mapa que indicara las coordenadas superficiales de los píxeles clasificados como clase 1 (cerdo), clase 2 (ave) y clase 3 (rumiante). A título de ejemplo se muestran los mapas de clasificación de las muestras “Cerdo val6” y “Ave val4” en la Figura 50.

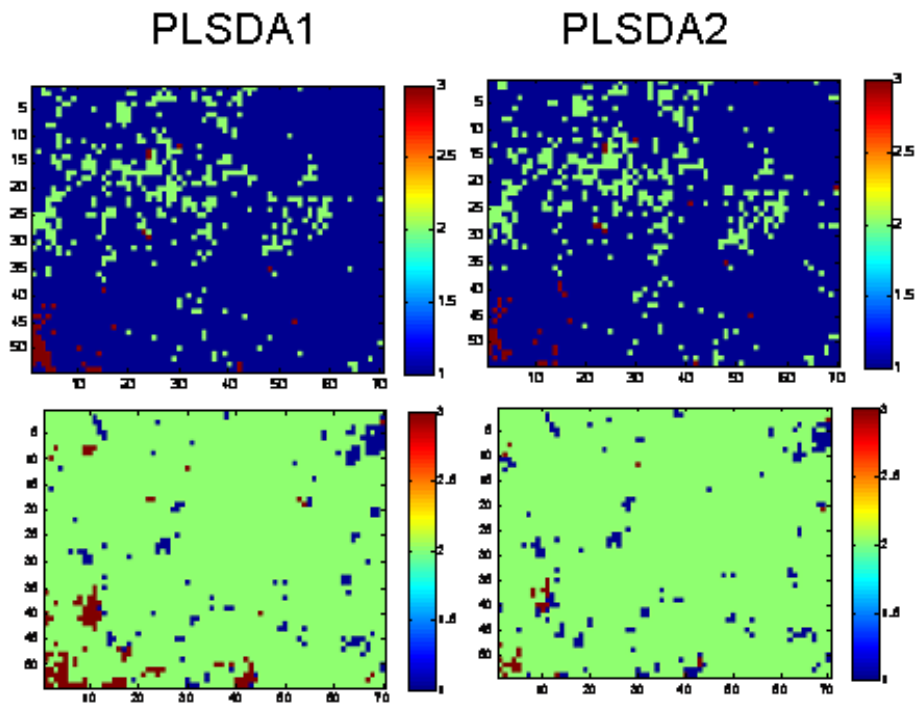


Figura 50. Mapa de predicciones de los píxeles de las muestras Cerdo Val 6 (arriba) y Ave Val 4 (abajo). En azul: píxeles pertenecientes a la especie cerdo. En verde: píxeles pertenecientes a la especie ave. En rojo oscuro: píxeles pertenecientes a la especie rumiante.

Del mapa de clasificación se nota que las partículas incorrectamente clasificadas prácticamente coinciden en los dos modelos.

Desde la perspectiva de la capacidad discriminadora del modelo en el caso de las muestras del colectivo VAL, tanto el modelo PLSDA1 como el PLSDA2 predijeron correctamente 32 muestras sobre 34. Este resultado sigue el criterio de la mayoría, es decir, si el mayor porcentaje de los píxeles de una muestra están clasificados en una clase, esto implica que la muestra pertenece a la clase susodicha. Esta interpretación tiene en cuenta el aspecto meramente discriminativo e implica el hecho de considerar las harinas animales como un material pulverulento sólido homogéneo.

Considerando el porcentaje total de píxeles correctamente clasificados (Tablas 23, 24 y 25), se nota que, en general, el poder predictivo de los modelos es alto. En particular el modelo PLSDA2, creado después de la eliminación de los 663 píxeles *outliers*, tiene un poder predictivo mayor que el modelo PLSDA1 (89.16% y 87% respectivamente de

píxeles correctamente clasificados) y confirma que, a pesar del elevado número de espectros disponibles para la construcción de los modelos, los anómalos espectrales influyen sobre el modelo y su eliminación es clave para la correcta clasificación de las muestras. Fijándose en la clase 3 (rumiante) hay que destacar, además del alto número de píxeles correctamente clasificados, los bajos niveles de píxeles de otras clases clasificados como ruminantes, esto es, los falsos positivos.

En este punto cabe abrir una paréntesis sobre el funcionamiento del cálculo de los valores límites que el modelo asigna a cada clase.

5.3.2. SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y CURVAS ROC

El algoritmo PLSDA utilizado tanto en este estudio como a largo de toda la tesis, calcula el valor límite o umbral (en inglés *threshold*), con el método de Bayes que considera el valor umbral para el cual los errores son mínimos. El cálculo bayesiano del nivel umbral asume que los valores Y predichos siguen una distribución parecida a la que será observada en muestras futuras [16]. Utilizando distribuciones estimadas, el sistema selecciona un umbral en el punto donde convergen las dos distribuciones estimadas. Este valor Y representa el punto donde el número de falsos positivos y falsos negativos debería ser minimizado para futuras predicciones. El cálculo asume que la distribución de los valores Y predichos es normal.

En este estudio, la distribución de los valores Y observados así como la especificidad y la sensibilidad del modelo PLSDA2 aparecen representadas gráficamente en la Figura 51 a través de las curvas ROC (del inglés *Receiver Operating Characteristics*) que representan gráficamente la sensibilidad frente a (1 – especificidad) según se varía el umbral [2].

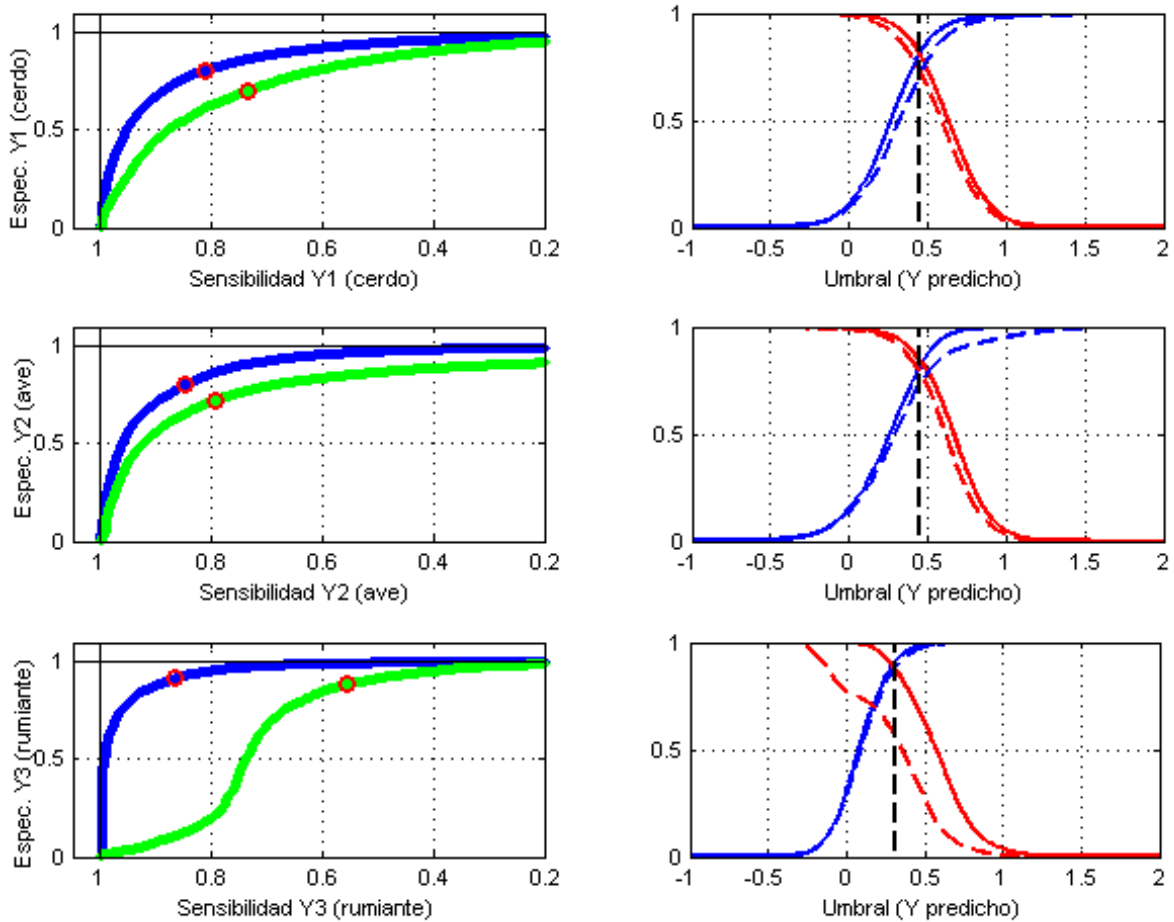


Figura 51. Izquierda: Curvas ROC estimadas (azul) y validadas (verde). El círculo rojo indica la posición del umbral. Derecha: Respuestas estimadas (línea discontinua) y validada (línea continua) para el modelo PLSDA2. Rojo: sensibilidad. Azul: Especificidad.

Los diagramas o curvas ROC representan especificidad y sensibilidad en función de los umbrales. Idealmente las curvas ROC estimadas y validadas deberían coincidir en el valor 1 para que no hubiera falsos negativos y falsos positivos. Sin embargo, se observa que en la clase 3 (rumiante) el umbral intermedio (0.5) supone un nivel de sensibilidad muy bajo, es decir, un alto número de falsos positivos. Por esta razón, el sistema hace que el umbral se desplace del valor medio (0.5) hacia un valor $N = 0.32$. Este comportamiento puede ser debido al menor número de muestras que forman el colectivo CAL de rumiante ($N=3717$) frente a las clases ave ($N=9197$) y cerdo ($N=9355$) o a una mayor variabilidad dentro de las muestras de harinas procedentes de rumiante. El valor umbral puede, de todas formas, ser modificado según el tipo de análisis desarrollado. En este

estudio, cuyo objetivo era comparar varios métodos discriminatorios utilizando un mismo colectivo muestras, se consideró adecuado el sistema de establecimiento de los valores límites propuesto por [16]. Sin embargo, en términos de seguridad alimentaria, se tiende a optar para análisis que favorezcan la sensibilidad, es decir, se prefiere obtener fasos positivos en lugar de falsos negativos. Con este tipo de medida, en el caso de las harinas de MBM, se puede maximizar en nivel de detección de harinas procedentes de rumiantes en piensos animales.

Comparando estos resultados con los obtenidos en estudios anteriores, hay que destacar que de la Haba et al. [17] en MO, clasificaron correctamente el 94% de las muestras procedentes de harinas animales de rumiantes y no-rumiantes. Este resultado, siendo mejor en términos absolutos contra el 89.16% de muestras correctamente clasificadas obtenido con NIR-CI, no tiene sin embargo en cuenta el factor del tiempo de análisis de una muestra por MO, aproximadamente de 8. El análisis NIR-CI de una muestra, por otro lado, implica un tiempo de aproximadamente dos minutos.

Los resultados relativos al análisis NIRS clásico (tiempo de análisis de una muestra cercano a dos minutos y un solo espectro por cada muestra) mostrados en [18] muestran un porcentaje global de muestras correctamente clasificadas muy parecido al obtenido con NIR-CI (89.8%). Considerando los resultados de cada especie por separado, hay que destacar que NIR-CI clasifica mejor las muestras de rumiante (99.85% frente a 86.36%) mientras que NIRS clásico clasifica mejor las muestras de ave y cerdo (96.3 y 92% respectivamente con NIRS; 83.92 y 83.73% respectivamente con NIR-CI).

5.3.2. SIMCA

Otros de los métodos estudiados para probar su eficacia en la discriminación de harinas animales con NIR-CI fue el SIMCA. A diferencia del PLSDA, en este caso se utilizó directamente el colectivo reducido eliminando desde el principio los anómalos ya que en el estudio anterior se ha comprobado el aumento de la capacidad discriminante con la eliminación de los anómalos espectrales. Las Tabla 26, 27 y 28 muestran los resultados de la aplicación del modelo SIMCA para la clasificación de las muestras del colectivo VAL.

Tabla 26. Matriz de clasificación de validación del modelo SIMCA en cerdo (N= 22269).

		Clasificado como...		
VAL		Cerdo	Ave	Rumiante
13457	val1	98.81	0.03	1.16
13828	val2	82.88	8.02	9.10
14002	val3	80.00	16.40	3.57
14146	val4	84.47	8.78	6.75
14220	val5	85.24	2.78	11.98
14321	val6	75.32	3.39	21.30
14347	val7	54.87	34.97	10.16
14500	val8	54.63	2.22	43.15
14503	val9	45.77	21.98	32.25
14587	val10	73.89	19.63	6.48
14758	val11	95.00	3.55	1.46
14810	val12	75.16	6.48	18.36
14863	val13	91.30	2.59	6.11
14982	val14	91.03	5.00	3.97
15112	val15	96.14	1.59	2.28

* Muestras incorrectamente clasificadas.

El porcentaje de muestras de cerdo correctamente clasificadas fue del 78.97% y las muestras pertenecientes a otras especies incorrectamente clasificadas como pertenecientes a la especie cerdo (falsos positivos) representaron el 18.53% del total de los píxeles estudiados.

Tabla 27. Matriz de clasificación de validación del modelo SIMCA en ave(N= 22269).

		Clasificado como...		
VAL		Cerdo	Ave	Rumiante
13432	val1	3.10	92.41	4.50
13609	val2	5.82	81.22	12.96

		Clasificado como...		
		Cerdo	Ave	Rumiante
14222	val3	5.13	83.44	11.43
14346	val4	2.51	86.01	11.48
14392*	val5	19.55	33.99	46.46
14501	val6	5.24	83.10	11.67
14695	val7	8.62	85.37	6.01
14759	val8	17.83	73.52	8.65
14800	val9	16.88	73.62	9.50
14801*	val10	67.78	19.97	12.29
14802*	val11	28.49	37.51	33.99
14803	val12	6.75	77.43	15.82
14805*	val13	74.52	5.71	19.76
16756*	val14	89.63	1.93	8.44

* Muestras incorrectamente clasificadas.

El porcentaje de muestras de ave correctamente clasificadas fue del 77.36%% y las muestras de otras especies incorrectamente clasificadas como pertenecientes a la especie ave representaron el 6.87% del total de los píxeles estudiados.

Tabla 28. Matriz de clasificación de validación del modelo SIMCA en ave(N= 22269).

		Clasificado como...		
VAL		Cerdo	Ave	Rumiante
13555	val1	0.08	0.00	99.92
13557	val2	0.11	0.00	99.89
13660	val3	0.00	0.00	100.00
13664	val4	0.10	0.00	99.92
16751	val5	0.00	0.00	100.00

El porcentaje de muestras de rumiante correctamente clasificadas fue del 99.95% y las muestras de otras especies incorrectamente clasificadas como pertenecientes a la especie rumiante representaron el 19.06% del total de los píxeles estudiados.

Este último resultado relativo al alto porcentaje de píxeles de muestras de cerdo y ave erróneamente clasificados como rumiante evidencia el comportamiento “conservativo” del modelo SIMCA, es decir, que tiende a anteponer falsos positivos a falsos negativos.

Al igual que en el caso del estudio de la localización superficial desarrollado en el análisis PLSDA y mostrado en la Figura 50, en este caso también se estudió la localización de los píxeles correctamente clasificados. Se indican en la Figura 50 los mapas de clasificación de las dos muestras se indican en la Figura 52 (Cerdo val6 y Ave val4).

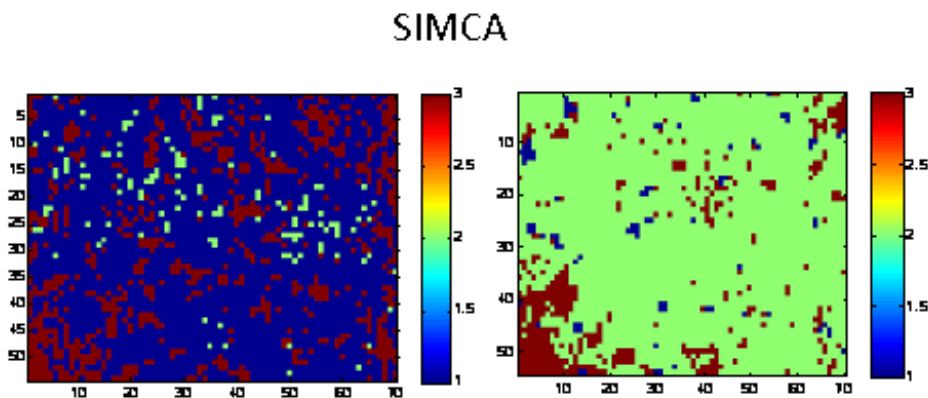


Figura 52. Mapa de predicciones de los píxeles de las muestras Cerdo Val 6 (izquierda) y Ave Val 4 (derecha) con SIMCA. En azul: píxeles pertenecientes a la especie cerdo. En verde: píxeles pertenecientes a la especie ave. En rojo oscuro: píxeles pertenecientes a la especie rumiante.

De los resultados de las Tablas 26, 27 y 28 cabe destacar que el número de muestras no correctamente clasificadas incrementó con respecto a los modelos PLSDA1 y PLSDA2 pasando de 2 a 5 muestras incorrectamente clasificadas. Todas las muestras erróneamente clasificadas pertenecían a la clase ave y la mayoría de los píxeles de estas muestras fueron clasificados como clase cerdo.

En general, las predicciones resultaron ser peores que las de los modelos PLSDA 1 y 2 con la excepción de los píxeles de las muestras VAL de rumiante, correctamente

clasificadas en el 99.95% de los casos. El número de falsos positivos, sin embargo, subió sobretodo en el caso de la especie rumiante donde el número de píxeles pertenecientes a las clases ave y cerdo, clasificados como rumiante, se incrementó del 0.93% del modelo PLSDA2 al 19.06% del modelo SIMCA. En la Figura 52 se observan precisamente dos casos en los que el número de píxeles clasificados como rumiante se incrementa sustancialmente con el modelo SIMCA. Esto puede ser explicado por el diferente método de calcular los límites entre clases que el algoritmo SIMCA tiene con respecto al PLSDA: mientras el primero no realiza ninguna hipótesis sobre la distribución de las variables sino que el modelo de cada categoría se calcula de manera independiente sin información externa de otras categorías, el segundo calcula un umbral de clasificación para cada clase utilizando la estadística bayesiana y la distribución observada de los valores predichos; una muestra u objeto pertenece a la clase cuya probabilidad calculada es mayor.

La muestra Cerdo val10, incorrectamente clasificada por los modelos PLSDA1 y 2, fue correctamente clasificada por el modelo SIMCA. Esto puede llevar a pensar que el algoritmo SIMCA pueda ser utilizado como análisis complementario al método PLSDA esto es una aplicación del análisis PLSDA + SIMCA permitiría aumentar el porcentaje de píxeles correctamente clasificados analizando mediante SIMCA exclusivamente las muestras muy cercanas al umbral del modelo PLSDA o viceversa.

5.3.3. CART

El criterio de fraccionamiento adecuado entre los índices de Gini, Towing y el índice de desviación, fue investigado creando 3 diferentes árboles de clasificación y utilizando cada uno de ellos para la clasificación de las muestras del colectivo VAL. Un árbol de clasificación tiene la estructura mostrada en Figura 53, donde se muestran, a título de ejemplo, los primeros 11 niveles del árbol de clasificación obtenido utilizando el índice Gini como criterio de fraccionamiento.

Cada nodo proporciona la siguiente información:

- La variable que influye en la discriminación.
- El valor límite de la variable.
- El rango que la variable tiene.
- El número de espectros/píxeles asociados a cada clase.
- La probabilidad de cada espectro/píxel tiene de pertenecer a cada clase.

En el árbol de la Figura 53, el primer nodo (el más alto) indicó que la variable $\lambda=1500$ nm (banda característica de aminoácidos) era la que dividía el conjunto de datos en dos partes. Para un valor de $\lambda=1500$ mayor de 1.36, la rama pasaba al nodo 3 (siguiente nivel, lado derecho), mientras que para $\lambda=1500$ menor de 1.36 la clasificación seguía hacia el nodo 2 (siguiente nivel, lado izquierdo).

Del análisis de los árboles creados con los tres índices anteriormente citados, se observó que las primeras variables discriminantes, las más importantes para la clasificación, varían según el índice utilizado, siendo:

- 1500, 1200, 1220, 1380 y 1400 nm en el árbol creado con el índice Gini,
- 1490, 1200, 1380, 1390 y 1570 nm en en el árbol creado con el índice Towing,
- 1500, 1200, 1380, 1220 y 1570 nm en el árbol creado con el índice de desviación.

Las zonas alrededor de 1500 y 1200 nm coinciden con las variables discriminatorias más importantes (VIP) del modelo PLSDA aunque es posible que, debido a que los espectros utilizados para la creación de los árboles de clasificación han sido tratados exclusivamente con SNV, mientras que los espectros usados para el modelo PLSDA fueron tratados con DT y *Mean Center* además de SNV, los picos de los espectros se hayan podido desplazar ligeramente.

Para la elección del número de niveles óptimo, se calculó el coste (error de clasificación) del árbol calculado como la suma de los costes en cada nodo. Se eligió el número de nodos correspondiente al primer valor que estuviese debajo del error mínimo de clasificación (Figura 54).

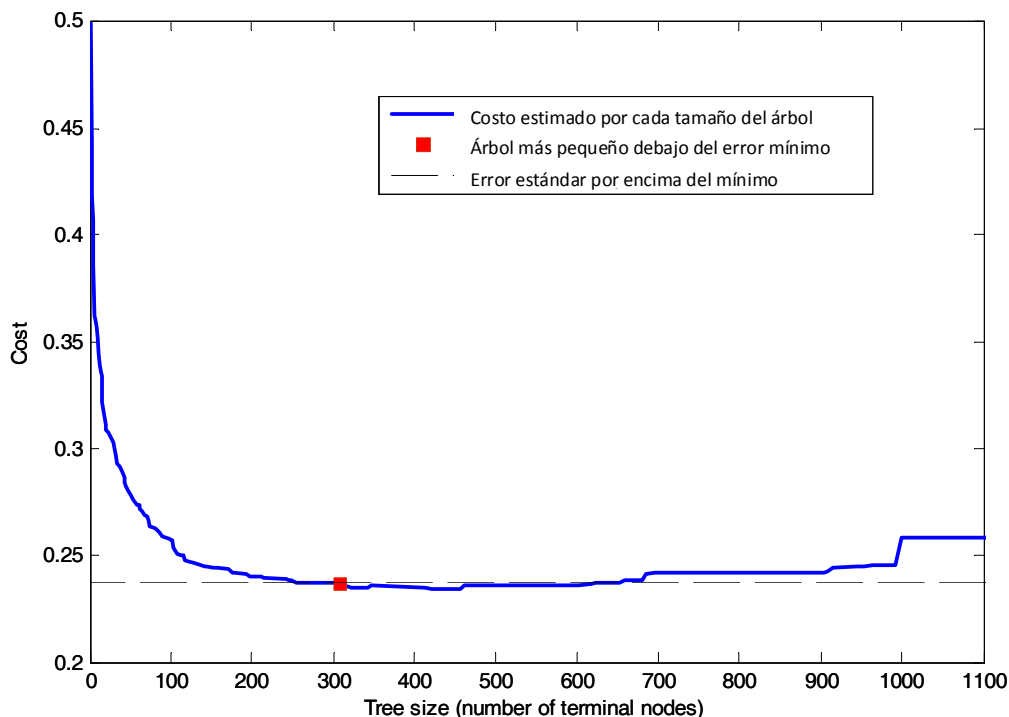


Figura 54. Coste por cada tamaño del árbol de clasificación utilizando el índice de Gini.

En el caso del árbol obtenido con el índice de Gini, el nivel óptimo correspondía a $N=300$ nodos (67 niveles). El mismo cálculo se aplicó para los otros dos árboles obteniendo 57 niveles para el árbol creado con el índice Towing y 62 niveles para el árbol creado con el índice de desviación.

Una vez creados los árboles, se procedió a la evaluación de su poder predictivo utilizando el colectivo VAL. De la misma forma que los modelos PLSDA y SIMCA, se calculó el porcentaje de píxeles de cada muestra clasificados en cada clase y se crearon los mapas de clasificación de cada muestra. Las Tabla 29, 30 y 31 muestran los resultados de las clasificaciones para los tres árboles.

Tabla 29. Matriz de clasificación del modelo CART para el colectivo VAL de la especie cerdo.

VAL		Clasificado como...								
		Cerdo			Ave			Rumiante		
		Gini	Towing	Deviance	Gini	Towing	Deviance	Gini	Towing	Deviance
<u>13457</u>	val1	89.84	95.21	95.45	10.11	4.76	4.42	0.05	0.03	0.13
<u>13828</u>	val2	89.52	86.16	84.95	8.94	12.88	13.49	1.53	0.95	1.56
<u>14002</u>	val3	79.74	77.65	80.95	19.87	22.01	18.60	0.40	0.34	0.45
<u>14146</u>	val4	78.70	85.56	82.46	21.03	14.29	17.09	0.26	0.16	0.45
<u>14220</u>	val5	85.98	88.57	84.15	13.20	10.74	14.50	0.82	0.69	1.35
<u>14321</u>	val6	86.19	89.60	83.60	12.33	8.47	13.68	1.48	1.93	2.72
<u>14347</u>	val7*	42.59*	43.07*	44.84*	56.88	56.88	55.16	0.53	0.05	0.00
<u>14500</u>	val8	77.88	75.77	70.53	19.97	18.68	21.93	2.14	5.56	7.54
<u>14503</u>	val9	43.44*	59.10	54.74	56.32	40.50	44.92	0.24	0.40	0.34
<u>14587</u>	val10	33.91*	52.69	62.49	65.95	37.41	37.43	0.13	0.00	0.08
<u>14758</u>	val11	90.03	93.33	95.40	9.84	6.53	4.47	0.13	0.13	0.13
<u>14810</u>	val12	77.94	76.80	78.23	21.40	22.49	20.95	0.66	0.71	0.82
<u>14863</u>	val13	91.46	93.36	91.64	8.31	6.03	6.46	0.24	0.61	1.90
<u>14982</u>	val14	89.52	87.04	92.30	7.75	12.54	5.42	2.72	0.42	2.28
<u>15112</u>	val15	92.70	94.74	94.87	6.96	5.13	4.87	0.34	0.13	0.26

* Muestras incorrectamente clasificadas.

En el caso de la especie cerdo, el porcentaje de píxeles correctamente clasificados fue de 85.79% en el caso del modelo creado con el índice de Gini, 82.54% en el caso del modelo creado con el índice de Towing y 82.27% en el caso del modelo creado con el índice Deviance. Los falsos positivos (píxeles de otras especies clasificados como pertenecientes a la especie cerdo) representaron un 25.88% del total de los píxeles en el caso del modelo creado con índice de Gini, un 30.49% en el caso del modelo creado con índice de Towing y un 24.24% en el caso del modelo creado con el índice Deviance.

Tabla 30. Matriz de clasificación del modelo CART para el colectivo VAL de la especie ave.

VAL		Clasificado como...								
		Cerdo			Ave			Rumiante		
		Gini	Towing	Deviance	Gini	Towing	Deviance	Gini	Towing	Deviance
<u>13432</u>	val1	6.16	8.28	8.94	93.73	91.64	90.98	0.11	0.08	0.08
<u>13609</u>	val2	5.19	9.89	6.85	94.71	88.94	92.86	0.11	1.16	0.29
<u>14222</u>	val3	10.50	13.12	10.66	89.39	86.80	89.05	0.11	0.08	0.29

VAL		Clasificado como...								
		Cerdo			Ave			Rumiante		
		Gini	Towing	Deviance	Gini	Towing	Deviance	Gini	Towing	Deviance
<u>14346</u>	val4	5.03	6.56	6.08	94.87	93.23	93.78	0.11	0.21	0.13
<u>14392</u>	val5	45.93	37.35	45.32	52.49	61.77	51.67	0.59	0.87	3.02
<u>14501</u>	val6	14.76	12.46	14.34	85.08	87.43	85.29	0.16	0.11	0.37
<u>14695</u>	val7	11.80	15.56	15.58	88.12	83.94	84.23	0.08	0.50	0.19
<u>14759</u>	val8	15.45	25.69	19.55	84.55	74.02	80.40	0.00	0.29	0.05
<u>14800</u>	val9	18.31	30.90	22.43	81.48	68.78	77.28	0.21	0.32	0.29
<u>14801</u>	val10*	60.16	69.37	61.93	38.49	29.42	36.63	1.35	1.22	3.44
<u>14802</u>	val11	23.39	29.66	26.88	76.01	68.68	72.65	0.61	1.67	0.48
<u>14803</u>	val12	8.65	10.34	8.78	91.27	88.68	90.95	0.08	0.98	0.26
<u>14805</u>	val13*	93.15	89.87	91.35	3.99	7.67	5.87	2.86	2.46	2.78
<u>16756</u>	val14	56.59	94.15	1.14	43.41	5.19	98.86	0.00	0.66	0.00

* Muestras incorrectamente clasificadas.

En el caso de la especie ave, el porcentaje de píxeles correctamente clasificados fue de 84.7% en el caso del modelo creado con el índice de Gini, 81.27% en el caso del modelo creado con el índice de Towing y 84% en el caso del modelo creado con el índice Deviance. Los falsos positivos representaron un 18.14% del total de los píxeles en el caso del modelo creado con índice de Gini, un 15.25% en el caso del modelo creado con índice de Towing y un 14.8% en el caso del modelo creado con el índice Deviance.

Tabla 31. Matriz de clasificación del modelo CART para el colectivo VAL de la especie rumiante.

VAL		Clasificado como...								
		Cerdo			Ave			Rumiante		
		Gini	Towing	Deviance	Gini	Towing	Deviance	Gini	Towing	Deviance
<u>13555</u>	val1	4.41	5.29	7.83	0.79	0.08	0.08	94.39	94.63	92.09
<u>13557</u>	val2	12.80	27.94	25.95	0.45	0.48	0.42	86.75	71.59	73.62
<u>13660</u>	val3	15.24	23.07	18.70	1.11	0.48	0.34	83.65	23.07	80.95
<u>13664</u>	val4*	64.66	58.33	68.28	18.84	24.29	11.48	16.51	17.38	20.24
<u>16751</u>	val5	19.52	11.46	0.03	2.83	0.34	0.29	77.65	88.20	99.69

* Muestras incorrectamente clasificadas.

Por último, en el caso de la especie rumiante, el porcentaje de píxeles correctamente clasificados fue de 85.61% en el caso del modelo creado con el índice de Gini, 69.37% en

el caso del modelo creado con el índice de Towing y 86.59% en el caso del modelo creado con el índice Deviance. Los falsos positivos representaron un 0.62% del total de los píxeles en el caso del modelo creado con índice de Gini, un 0.78% en el caso del modelo creado con índice de Towing y un 1.09% en el caso del modelo creado con el índice Deviance.

Un primer análisis de los resultados obtenidos con el análisis CART muestra que para las tres clases animales (cerdo, ave y rumiante) existe un alto porcentaje de píxeles correctamente clasificados. Con respecto a los diferentes criterios de fraccionamientos estudiados, el basado en el índice Deviance es el que proporciona un menor número de muestras incorrectamente clasificadas ($N = 4$) comparado con el índice Gini y Towing ($N = 7$ y $N = 5$ respectivamente). Sin embargo, considerando el porcentaje de píxeles correctamente clasificados por cada clase animal, los resultados son constantes y parecidos entre ellos para los tres criterios (todos los porcentajes de muestras correctamente clasificadas oscilan entre un mínimo de 82.27 y un máximo de 86.59).

Comparando los resultados con los obtenidos con los anteriores algoritmos (PLSDA y SIMCA), hay que destacar que, en el caso de CART, la mayor parte los píxeles de la muestra de Rumiante Val4 fue clasificada como clase cerdo. El número de falsos negativos para la especie rumiante resultó por lo tanto significativamente superior con respecto a los resultados obtenidos con PLSDA y SIMCA. Los falsos positivos o píxeles incorrectamente clasificados como pertenecientes a la clase rumiante, resultaron, sin embargo, inferiores a los obtenidos con SIMCA. En la Figura 55 se muestran las muestras Cerdo Val6 y Ave Val4 después de la aplicación del algoritmo discriminante.

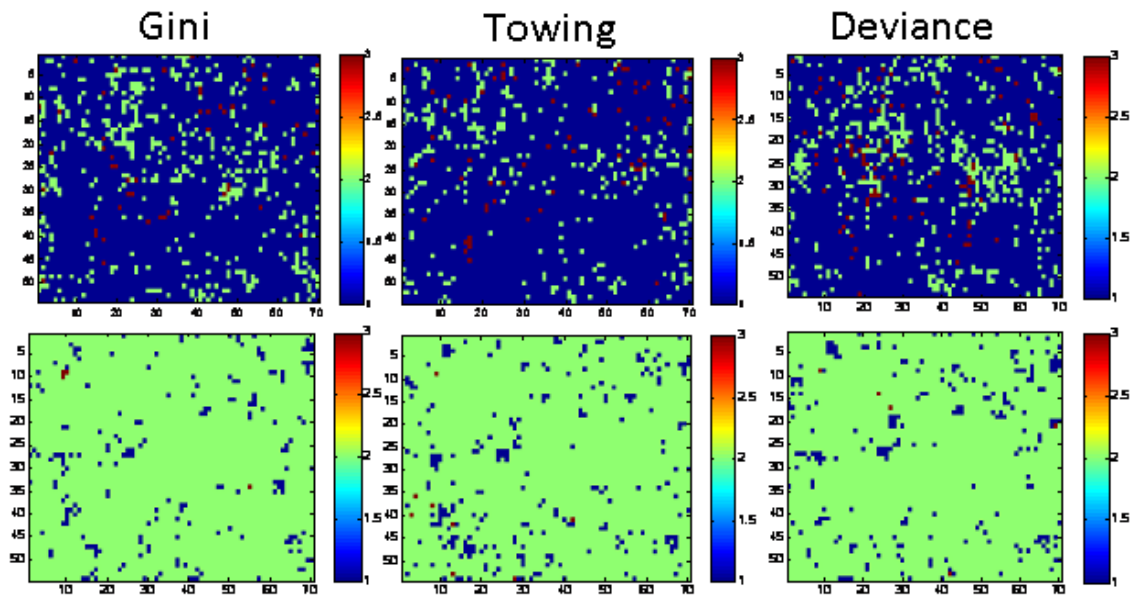


Figura 55. Mapa de predicciones de los pixeles de las muestras Cerdo Val 6 (arriba) y Ave Val 4 (abajo) con CART y los índices Gini, Towing y Deviance. En azul: píxeles pertenecientes a la especie cerdo. En verde: píxeles pertenecientes a la especie ave. En rojo oscuro: píxeles pertenecientes a la especie rumiante.

De los mapas de clasificación se vio cómo el número de pixeles clasificados como rumiante disminuía con respecto a la predicción SIMCA. Comparando los mapas de clasificación resultantes de los tres algoritmos estudiados, se identificaron partículas específicas, identificadas como agrupación de pixeles, clasificadas erróneamente por los tres tipos de algoritmos. Esto sugiere que los métodos permitieron poner a punto una metodología de aislamiento de dichas partículas.

Sería interesante, después de haber aislado estas partículas en las muestras estudiadas, analizarlas con otra técnica analítica como por ejemplo con la técnica PCR como sugiere [19] para poder confirmar su origen, ya que todas las muestras analizadas pueden haber sufrido, en algún momento de su análisis o almacenamiento, contaminación cruzada. Pero, en principio, asumiendo la no existencia de contaminación cruzada y teniendo en cuenta los resultados obtenidos con PLSDA y SIMCA, se puede concluir que el modelo que permite alcanzar mejor resultados es el creado con PLSDA.

5.4. APLICACIÓN DE PLSDA PARA LA DISCRIMINACIÓN ENTRE HARINAS DE AVE, CERDO Y RUMIANTE

En base a los resultados obtenidos en la comparación entre diferentes modelos discriminantes, el algoritmo PLSDA fue considerado el más apropiado debido al mayor porcentaje de píxeles correctamente clasificados. Así, se procedió a la creación de modelos PLSDA para la predicción de:

- ✓ Cerdo vs. Ave
- ✓ Ave vs. Rumiante
- ✓ Cerdo vs. Rumiante
- ✓ Rumiante vs. No Rumiante

Como se ha puesto de manifiesto en la revisión el distinguir entre harinas de diferentes orígenes animales tiene importantes repercusiones económicas. Por este motivo a continuación se muestran los resultados de diferentes combinaciones de discriminación entre varias especies animales.

5.4.1. DISCRIMINACIÓN CERDO VS. AVE

Los estadísticos correspondientes a los modelos PLSDA desarrollados para la discriminación entre muestras puras de harina de cerdo y muestras puras de HSA se recogen en las Tablas 32 y 33. Analizando los valores de error de clasificación en validación cruzada para varios pretratamientos espectrales, se observó que el uso exclusivo de *Mean Center* proporcionaba errores parecidos a los obtenidos con la combinación SNV, DT y *Mean Center*, pero con un número inferior de variables latentes. Se compararon, por lo tanto, en este estudio, los dos pretratamientos espectrales. El número de VLs elegido fue $N = 6$ para el modelo creado utilizando solamente *Mean Center* y $N = 9$ para el modelo creado con SNV, DT y *Mean Center*. La validación cruzada se calculó mediante la predicción de grupos de 10 muestras

pertenecientes al colectivo CAL. El mayor número de grupos con respecto al modelo creado anteriormente con todas las muestras fue posible gracias al menor número de píxeles con respecto al modelo anterior. Se procedió a eliminar los anómalos espectrales reduciendo el colectivo CAL de 19152 a 18552 muestras utilizando el procedimiento evaluado anteriormente para la eliminación de anómalos espectrales.

Tabla 32. Estadísticos para el modelo PLSDA (N=18552) para la discriminación de cerdo vs. ave utilizando *Mean Center* como pretratamiento

Clase	Preproc.	Sens. (Cal)	Espec. (Cal)	Sens. (CV)	Espec. (CV)	Class. Err (Cal)	Class. Err (CV)
Cerdo (N=9270)	<i>Mean Center</i>	0.81	0.87	0.78	0.85	0.16	0.16
Ave(N=9282)		0.87	0.81	0.85	0.78		

Tabla 33. Estadísticos para el modelo PLSDA (N=18552) para la discriminación de cerdo vs. ave utilizando SNV, DT y *Mean Center* como pretratamientos.

Clase	Preproc.	Sens. (Cal)	Espec. (Cal)	Sens. (CV)	Espec. (CV)	Class. Err (Cal)	Class. Err (CV)
Cerdo (N=9270)	SNV, DT, <i>Mean Center</i>	0.88	0.86	0.81	0.80	0.13	0.20
Ave (N=9282)		0.86	0.88	0.80	0.81		

Los valores de sensibilidad, especificidad y error de clasificación, mostraban que el modelo creado con la combinación de pretratamientos espectrales SNV, DT y *Mean Center*, proporcionaba mejores resultados con respecto al pretratamiento exclusivamente por *Mean Center* en calibración. Sin embargo, si se consideran los resultados en validación cruzada, se observa que el error de clasificación del modelo creado con el uso exclusivo de Mean Center es inferior al obtenido utilizando la combinación de los tres pretratamientos arriba citados. En la Figura 56 se muestran la totalidad de píxeles analizados frente a los clasificados como cerdo (valor *dummy* asignado: 0) y ave (valor *dummy* asignado: 1).

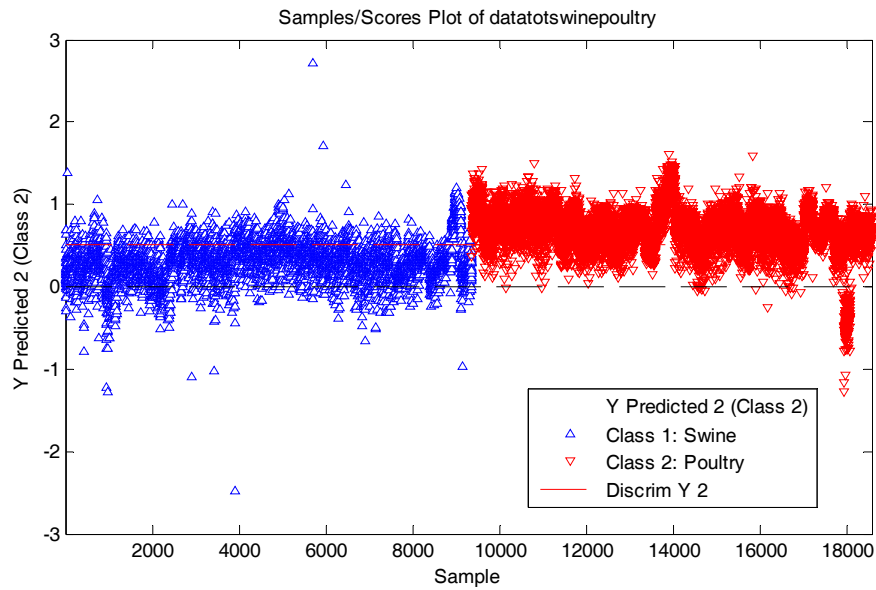


Figura 56. Representación gráfica de los valores de la variable discriminatoria para cada muestra del colectivo CAL para la discriminación entre cerdo (Swine) y ave (Poultry).

De la representación gráfica de las muestras clasificadas en las dos clases, se observaron varias muestras de ave con valores cercanos a cero, así como muestras de cerdo con valores cercanos a 1. Este análisis visual confirmó los valores de sensibilidad y especificidad que reflejan unos errores correspondientes al 20% de las muestras aproximadamente. La predicción de cada píxel de las muestras del colectivo VAL proporcionó los resultados mostrados en las Tablas 34 y 35.

Tabla 34. Matriz de clasificación de las muestras del colectivo VAL de cerdo tras la aplicación del modelo PLSDA generados con diferentes pretratamientos espectrales del modelo cerdo vs. ave PLSDA.

MEAN CENTER				SNV, DT, MEAN CENTER			
		Clasificado como...				Clasificado como...	
VAL		Cerdo	Ave	Muestras VAL		Cerdo	Ave
13457	val1	99.50	0.05	13457	val1	99.79	0.21
13828	val2	66.32	33.68	13828	val2	91.06	8.94
14002	val3	97.35	2.65	14002	val3	93.94	6.06
14146*	val4	21.53	78.47	14146	val4	63.92	36.08
14220	val5	83.65	16.35	14220	val5	94.37	5.63
14321	val6	77.17	22.83	14321	val6	95.53	4.47

MEAN CENTER				SNV, DT, MEAN CENTER			
VAL		Clasificado como...		Muestras VAL		Clasificado como...	
		Cerdo	Ave			Cerdo	Ave
14347*	val7	45.53	54.47	14347*	val7	42.14	57.86
14500	val8	91.00	8.99	14500	val8	78.89	21.11
14503	val9	72.94	21.06	14503	val9	66.85	33.15
14587*	val10	9.60	90.40	14587*	val10	41.77	58.23
14758	val11	84.18	15.82	14758	val11	93.57	6.43
14810	val12	96.14	3.86	14810	val12	94.79	5.21
14863	val13	77.54	22.46	14863	val13	97.46	2.54
14982*	val14	31.08	68.92	14982	val14	74.39	25.61
15112	val15	72.49	25.51	15112	val15	79.21	20.79

* Muestras incorrectamente clasificadas.

En el caso de la especie cerdo, el porcentaje de píxeles correctamente clasificados fue del 68.4% en el caso del modelo creado utilizando el pretratamiento *Mean Center* y del 80.51% en el caso del modelo creado utilizando la combinación de SNV, DT y *Mean Center*.

Tabla 35. Matriz de clasificación de las muestras del colectivo VAL de ave tras la aplicación del modelo PLSDA generados con diferentes pretratamientos espectrales del modelo cerdo vs. ave PLSDA.

MEAN CENTER				SNV, DT, MEAN CENTER			
VAL		Clasificado como...		Muestras VAL		Clasificado como...	
		Cerdo	Ave			Cerdo	Ave
13432	val1	3.39	94.61	13432	val1	2.12	97.88
13609	val2	3.15	96.85	13609	val2	3.36	96.64
14222	val3	3.39	96.61	14222	val3	1.64	98.36
14346	val4	4.50	95.50	14346	val4	2.78	97.22
14392	val5	47.06	52.94	14392	val5	21.16	78.84
14501	val6	2.09	97.91	14501	val6	5.5	94.5
14695	val7	15.19	84.81	14695	val7	8.81	91.19
14759	val8	26.69	73.31	14759	val8	17.2	82.8

MEAN CENTER				SNV, DT, MEAN CENTER			
VAL		Clasificado como...		Muestras VAL		Clasificado como...	
		Cerdo	Ave			Cerdo	Ave
14800	val9	22.17	77.83	14800	val9	16.22	83.78
14801	val10	32.35	67.65	14801*	val10	60.63	39.37
14802	val11	31.19	68.81	14802	val11	32.57	67.43
14803	val12	12.22	87.78	14803	val12	5.56	94.44
14805	val13	22.94	77.06	14805*	val13	71.85	28.15
16756	val14	3.47	96.53	16756*	val14	58.57	41.43

* Muestras incorrectamente clasificadas.

En el caso de la especie ave, el porcentaje de píxeles correctamente clasificados fue del 83.44% en el caso del modelo creado utilizando el pretratamiento *Mean Center* y del 78% en el caso del modelo creado utilizando la combinación de SNV, DT y *Mean Center*.

El modelo creado tratando los espectros exclusivamente con *Mean Center* proporcionó mejores resultados en la clasificación de la especie ave, sin embargo, los resultados para la especie cerdo indicaron que la combinación de tratamientos SNV, DT y *Mean Center* mejora la clasificación de las muestras de harina de cerdo.

A partir de los datos predichos para cada píxel es posible representar el mapa de distribución de valores de porcentaje de cada especie encontrada en la muestra predicha. Este análisis proporcionó una más amplia información acerca de las diferencias en las predicciones de los dos modelos creados (Figura 57).

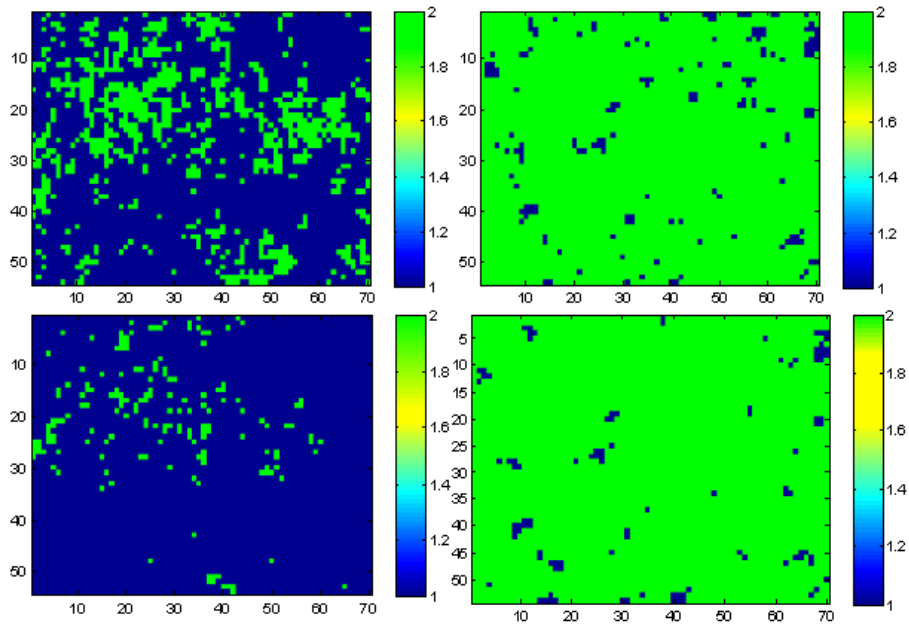


Figura 57. Mapa de predicciones de los píxeles de las muestras Cerdo Val 6 (izquierda) y Ave Val 4 (derecha). Arriba: píxeles clasificados con el modelo “Solo *Mean Center*”. Abajo: píxeles clasificados con el modelo “SNV, DT, *Mean Center*”. En azul: píxeles pertenecientes a la especie cerdo. En verde: píxeles pertenecientes a la especie ave.

La clasificación de la muestra Cerdo Val 6 por el modelo que utiliza como pretratamiento *Mean Center*, muestra varias agrupaciones de píxeles incorrectamente clasificados, fenómeno que no se verifica para el modelo que utiliza como pretratamiento SNV, DT y *Mean Center*. La predicción de la muestra de ave, sin embargo, proporciona resultados similares para los dos tipos de pretratamientos y en la misma localización espacial. En base a este aspecto y también en base al porcentaje global de muestras correctamente clasificadas (79.25% en el caso de los modelos que utilizan la combinación de los tres pretratamientos frente a 75.92% en el caso de los modelos que utilizan solamente *MeanCenter*), se consideró el modelo creado con SNV, DT y *Mean Center* como el más apropiado. Esto llevó a elegir la combinación de los tres pretratamientos para las siguientes discriminaciones entre especies animales.

5.4.2. DISCRIMINACIÓN AVE VS. RUMIANTE

Para la discriminación entre las especies ave y rumiante se utilizaron N = 12914 muestras eliminando alrededor de 4% de *outliers* y 10 VLs para construir un modelo PLSDA. La validación cruzada fue por bloque de 10 como en el caso anterior y los pretratamientos utilizados fueron SNV, DT y Mean Center como determinado en la predicción de las especies cerdo y ave. Los detalles del modelo se encuentran en la Tabla 36.

Tabla 36. Estadísticos del modelo PLSDA Ave vs. Rumiante (N=12914).

CLASE	Sens. (Cal)	Espec. (Cal)	Sens. (CV)	Espec. (CV)	Class. Err (Cal)	Class. Err (CV)
Ave (N=9234)	0.95	0.92	0.93	0.66	0.12	0.21
Rumiante (N=3680)	0.92	0.95	0.66	0.93	0.12	0.21

La Figura 58 recoge los pixeles analizados frente a los clasificados como ave (valor *dummy* asignado: 0) y rumiante (valor *dummy* asignado: 1).

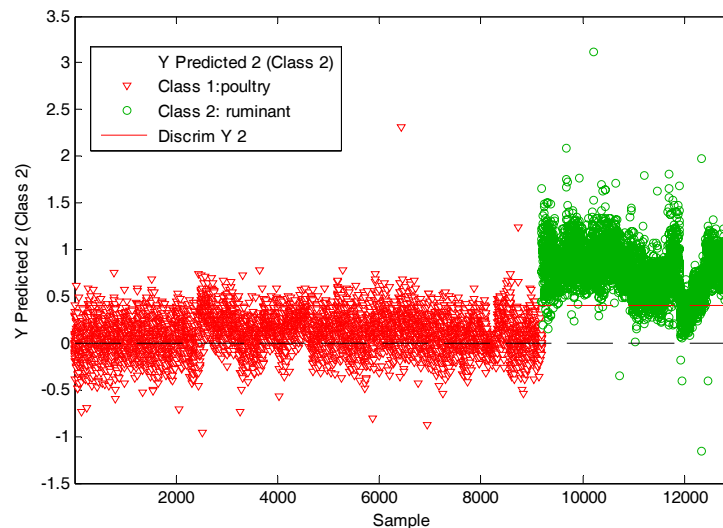


Figura 58. Representación gráfica de los valores de la variable discriminatoria para cada muestra del colectivo CAL para la discriminación entre ave y rumiante.

La sensibilidad en validación cruzada de la especie rumiante, así como la especificidad de la especie ave tenían valores descomunamente bajos respecto al resto de los modelos. Esto significa que el modelo creado tiende a priorizar la especificidad de la especie rumiante, es decir, tiende a tener un comportamiento “conservador” con respecto a la especie rumiante favoreciendo falsos negativos en la especie rumiante y penalizando falsos positivos. Con estas características cabía esperar una predicción desequilibrada en cuanto a falsos positivos y falsos negativos. Sin embargo, la predicción del colectivo VAL proporcionó unos resultados que reflejaban una alta capacidad predictiva del modelo como se puede observar en las Tabla 37 y 38.

Tabla 37. Matriz de clasificación de las muestras de ave del colectivo VAL para el modelo ave vs. rumiante PLSDA.

VAL		Clasificado como...	
		Ave	Rumiante
13432	val1	99.58	0.42
13609	val2	98.10	1.90
14222	val3	99.60	0.40
14346	val4	98.78	1.22
14392	val5	93.47	6.53
14501	val6	98.04	1.96
14695	val7	99.76	0.24
14759	val8	97.49	2.51
14800	val9	97.51	2.49
14801	val10	95.87	4.13
14802	val11	94.42	5.58
14803	val12	98.94	1.06
14805	val13	95.21	4.79
16756	val14	99.97	0.03

El porcentaje de muestras de ave del colectivo VAL correctamente clasificadas asciende al 97.62%.

Tabla 38. Matriz de clasificación de las muestras de ave del colectivo VAL para el modelo ave vs. rumiante PLSDA.

VAL		Clasificado como...	
		Ave	Rumiante
13555	val1	0.08	99.92
13557	val2	0.05	99.95
13660	val3	0.08	99.92
13664	val4	0.05	99.95
16751	val5	0.03	99.97

En este caso, el porcentaje de muestras de harina procedente de rumiante del colectivo VAL correctamente clasificadas representa el 99.94% del total de los píxeles de las muestras. Todas las muestras fueron correctamente clasificadas con una exactitud mayor del 97,6% en el caso de la especie Ave y 99,9% en el caso de la especie Rumiante. En la Figura 59 se muestra el mapa de predicciones de la muestra ave Val 4 donde se aprecia el elevado número de píxeles correctamente clasificados.

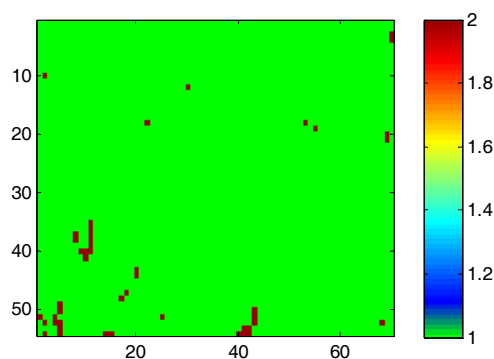


Figura 59. Mapa de predicciones de los píxeles de la muestra Ave Val 4. En verde: píxeles pertenecientes a la especie ave. En rojo oscuro: píxeles pertenecientes a la especie rumiante.

Solamente el 1,22% de la superficie de la imagen correspondiente a la muestra Ave Val 4 fue erróneamente clasificado como rumiante.

5.4.3. DISCRIMINACIÓN CERDO VS. RUMIANTE

El modelo para discriminar harinas procedentes de rumiante de harinas procedentes de cerdo fue creado utilizando N = 13072 muestras (eliminando el 3% de *outliers*) y 6 VLs. Los estadísticos de los modelos se muestran en la Tabla 39.

Tabla 39. Estadísticos del modelo PLSDA Cerdo vs. Rumiante (N=13072).

CLASE	Sens. (Cal)	Espec. (Cal)	Sens. (CV)	Espec. (CV)	Class. Err (Cal)	Class. Err (CV)
Cerdo (N=9384)	0.86	0.85	0.83	0.50	0.15	0.33
Rumiante (N=3688)	0.85	0.86	0.72	0.83	0.15	0.22

Los valores de sensibilidad y especificidad resultaron desequilibrados como en el modelo anterior (ave vs. rumiante) demostrando que los perfiles espectrales de la especie rumiante provocan el desplazamiento del umbral. La causa del desequilibrio entre sensibilidad y especificidad podría radicar en las diferentes varianzas intra-clase propias de las dos especies, como se indica en [20] donde los autores tratan el problema de la alta variabilidad que puede verificarse en muestras biológicas debido a la presencia de niveles diferentes de homogeneidad en una clase. Este resultado, además, concuerda con lo expuesto en el capítulo 3 de la presente tesis, donde el cálculo ANOVA anidado dentro de la especie rumiante reflejó una significativa variabilidad entre muestras. En la Figura 60 se observan las muestras y sus correspondientes valores predichos.

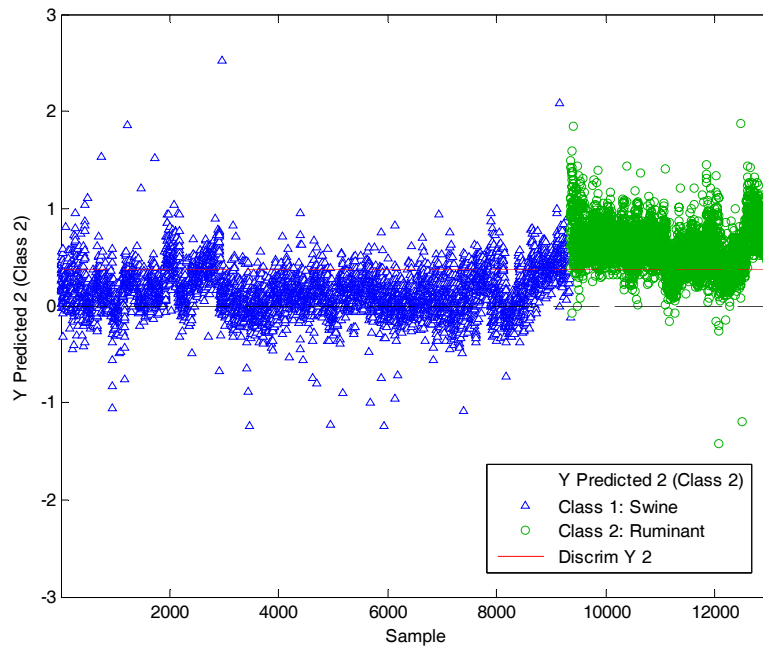


Figura 60. Representación gráfica de los valores de la variable discriminatoria para cada muestra del colectivo CAL para la discriminación entre cerdo y rumiante.

La representación gráfica de la predicción de todos los píxeles (valor 0 = cerdo, valor 1 = rumiante) mostró un comportamiento de las muestras de rumiante muy parecido al que mostraban en el modelo ave *vs.* rumiante. Un aspecto a destacar es la presencia constante de puntos alejados de los valores 0 y 1, a pesar de la eliminación de *outliers*.

La predicción del colectivo VAL proporcionó información sobre la pertenencia de cada píxel de cada muestra a la clase rumiante o cerdo. Los resultados expresados como porcentajes de píxeles correctamente clasificados por cada muestra están indicados en las Tablas 40 y 41.

Tabla 40. Matriz de clasificación de las muestras de cerdo del colectivo VAL para el modelo cerdo *vs.* rumiante PLSDA.

Muestras VAL		Clasificado como...	
		Cerdo	Rumiante
13457	val1	99.92	0.08
13828	val2	97.78	2.22
14002	val3	99.95	0.05

Muestras VAL		Clasificado como...	
		Cerdo	Rumiante
14146	val4	98.23	1.77
14220	val5	98.81	1.19
14321	val6	97.28	2.72
14347	val7	96.24	3.76
14500	val8	88.25	11.75
14503	val9	95.29	4.71
14587	val10	98.73	1.27
14758	val11	99.37	0.63
14810	val12	94.37	5.63
14863	val13	98.92	1.08
14982	val14	99.66	0.34
15112	val15	99.55	0.45

El 97.49% del total de píxeles correspondientes a las muestras de harina del cerdo del colectivo VAL fue correctamente clasificado.

Tabla 41. Matriz de clasificación de las muestras de rumiante del colectivo VAL para el modelo cerdo vs. rumiante PLSDA.

Muestras VAL		Clasificado como...	
		Cerdo	Rumiante
13555	val1	0.34	99.66
13557	val2	0.13	99.87
13660	val3	0.19	99.81
13664	val4	1.01	98.99
16751	val5	0.00	100.00

En el caso de la especie rumiante, el modelo discriminó correctamente el 99.67% de los píxeles pertenecientes a las muestras de rumiante del colectivo VAL.

En base a los resultados de la clasificación de las muestras del colectivo VAL se deduce que, también en este modelo, el porcentaje de píxeles correctamente clasificados era muy alto para ambas especies. La totalidad de las muestras del colectivo VAL fueron correctamente clasificadas con un porcentaje de píxeles erróneamente clasificados de solamente 1,4%. La Figura 61 muestra el mapa con los valores de predicción de la muestra Cerdo Val6.

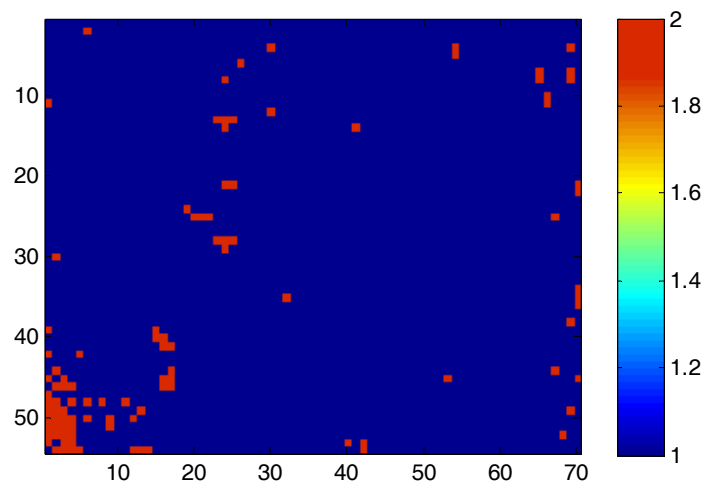


Figura 61. Mapa de predicciones de los píxeles de la muestra Cerdo Val6. En azul: píxeles correspondientes a la especie cerdo. En rojo: píxeles correspondientes a la especie rumiante.

Los píxeles incorrectamente clasificados como rumiante coinciden, por su posición en la imagen, con los predichos con los modelo ave *vs.* cerdo *vs.* rumiante creados tanto con PLSDA como con SIMCA, confirmando la presencia de una partícula que, como se observa de las predicciones individuales de la Tabla 40, ocupa el 2.72% de la superficie de la imagen. Esta partícula podría ser analizada en términos de forma, tamaño, etc. para crear una base de datos de partículas específicas que los modelos clasifican erróneamente. De esta manera se daría un ulterior uso a la información espacial de las imágenes hiperespectrales.

5.4.4. DISCRIMINACIÓN RUMIANTE VS NO RUMIANTE

Por último, se creó un modelo para la discriminación entre harina de rumiantes y no rumiantes. Para construirlo se incluyeron las especies ave y cerdo en una misma clase asignándole el valor 0 y a la clase rumiante se le asignó el valor 1. El número de variables latentes elegido fue de 9 y los espectros eliminados como *outliers* correspondieron al 3% de las muestras originales. Los estadísticos del modelo creado se especifican en la Tabla 42.

Tabla 42. Estadísticos del modelo PLSDA Rumiante vs. Rumiante (N=22269).

CLASE	Sens. (Cal)	Espec. (Cal)	Sens. (CV)	Espec. (CV)	Class. Err (Cal)	Class. Err (CV)
No Rumiante (N=19152)	0.92	0.88	0.89	0.57	0.10	0.27
Rumiante (N=3117)	0.88	0.92	0.64	0.85	0.10	0.25

En validación cruzada, los valores de sensibilidad para la clase rumiante y especificidad para la clase no rumiante fueron bajos. El desequilibrio en el número de muestras y, consecuentemente, en el número de píxeles de cada clase representa un hándicap del modelo, sobretodo considerando que la clase rumiante se caracteriza por tener una alta variabilidad, característica que hace aun más necesaria la ampliación de esta clase. En la Figura 62 se aprecian los píxeles clasificados en 0 (no rumiantes) y 1 (rumiantes).

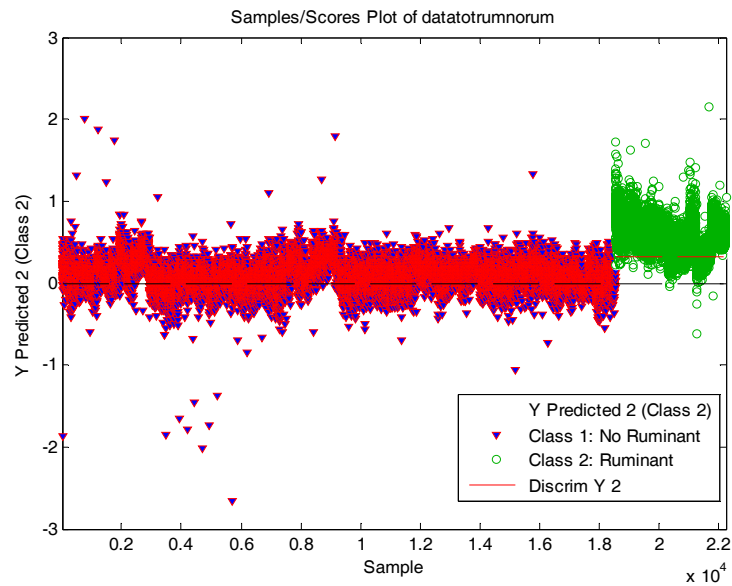


Figura 62. Representación grafica de los valores de la variable discriminatoria para cada muestra del colectivo CAL para la discriminación entre no-rumiante y rumiante.

Los resultados de las predicciones de las muestras del colectivo VAL, con la indicación del porcentaje de píxeles correctamente clasificados por cada muestra, están representados en las Tablas 43, 44 y 45.

Tabla 43. Matriz de clasificación del modelo rumiante vs. no-rumiante PLSDA para las muestras de harina de cerdo del colectivo VAL

VAL		Clasificado como...	
		No Rumiante	Rumiante
13457	val1	99.81	0.19
13828	val2	99.23	0.77
14002	val3	99.92	0.08
14146	val4	99.66	0.34
14220	val5	99.55	0.45
14321	val6	98.15	1.85
14347	val7	98.70	1.30
14500	val8	94.42	5.58
14503	val9	96.72	3.28
14587	val10	99.55	0.45

		Clasificado como...	
VAL		No Rumiante	Rumiante
14758	val11	98.86	1.14
14810	val12	98.12	1.88
14863	val13	97.20	2.80
14982	val14	99.52	0.48
15112	val15	99.87	0.13

El 98.62% de los píxeles de las muestras de harina de cerdo del colectivo de validación fueron correctamente clasificadas por el modelo como pertenecientes a la clase no rumiante.

Tabla 44. Matriz de clasificación del modelo rumiante vs. rumiante PLSDA para las muestras de HSA del colectivo VAL

		Clasificado como...	
VAL		No-Rumiante	Rumiante
13432	val1	99.68	0.32
13609	val2	98.28	1.72
14222	val3	99.23	0.77
14346	val4	98.57	1.43
14392	val5	96.46	3.55
14501	val6	98.81	1.19
14695	val7	99.92	0.08
14759	val8	99.31	0.69
14800	val9	99.13	0.87
14801	val10	98.81	1.19
14802	val11	98.20	1.80
14803	val12	99.42	0.58
14805	val13	96.32	3.68
16756	val14	99.95	0.05

En el caso de las muestras de harinas de ave, el 98.72% de los píxeles totales fue clasificado como procedente de no-rumiante. El resultado es muy parecido al obtenido con la clasificación de las muestras de la especie cerdo.

Tabla 45. Matriz de clasificación del modelo rumiante *vs.* rumiante PLSDA para las muestras de harina de rumiante del colectivo VAL

VAL		Clasificado como...	
		No Rumiante	Rumiante
13555	val1	0.03	99.97
13557	val2	0.08	99.92
13660	val3	0.05	99.95
13664	val4	0.74	99.26
16751	val5	0.03	99.97

El 99.81% de los píxeles de las 5 muestras de rumiantes del colectivo VAL fueron correctamente clasificadas en la clase rumiante. El modelo rumiante *vs.* no-rumiante proporcionó el error más bajo entre los modelos evaluados en este estudio.

La discriminación entre harina de rumiante y no-rumiante a través de la microscopía NIRS mostrado en [17] proporcionó un porcentaje de muestras correctamente clasificadas del 92 y 88.71% en harina de no-rumiante y rumiante respectivamente. Los resultados obtenidos con NIR-CI (98.67% y 99.81% en no-rumiante y rumiante respectivamente) incrementan, por lo tanto, el poder discriminativo de los espectros NIR.

5.5. CONSIDERACIONES FINALES

En general se puede concluir que el algoritmo PLSDA es un método viable para la clasificación de harinas animales puras según la especie animal de procedencia. En cuanto a la elección del umbral a utilizar, en este estudio se evidenció que la recomendación sobre el umbral proporcionada por el programa MatLab en base al cálculo de especificidad y sensibilidad, responde a los objetivos del presente estudio en cuanto tiende a favorecer la especificidad de la especie rumiante, minimizando, de esta manera, falsos negativos dentro de esta especie. En el caso de las harinas de carne y huesos hay que tener en cuenta que los falsos negativos (muestras pertenecientes a la clase rumiante clasificadas como no rumiante) representan un peligro en términos de seguridad alimentaria, sobretodo en el caso en el que se requiera tolerancia cero con respecto a posibles contaminaciones voluntarias o involuntarias (contaminación cruzada). Desde este punto de vista, tanto el modelo PLSDA como el SIMCA proporcionaron unos valores de falsos negativos muy bajos para la clase rumiante y consecuentemente aportaron unos resultados fiables. Solamente una muestra de HSA fue clasificada por los tres algoritmos como harina de cerdo.

En base al número de muestras correctamente clasificadas, el algoritmo PLSDA proporcionó los mejores resultados con respecto a los modelos SIMCA y CART. En particular, se observó que quitando los espectros correspondientes a píxeles con valores de Hotelling's T^2 y Q-Residuals por encima de los límites establecidos, la sensibilidad y la especificidad en validación cruzada aumentan para las tres clases y el error de clasificación disminuye sobretodo en la especie rumiante.

No obstante, los algoritmos SIMCA y CART pueden ser considerados como alternativas válidas para la clasificación de imágenes hiperespectrales. Hay que resaltar, finalmente, un aspecto práctico del método CART con respecto a su uso con imágenes hiperespectrales, y es que esta técnica es menos problemática que las demás cuando se trata de grandes bases de datos. En este contexto cabría la posibilidad de utilizar un mayor número de píxeles por cada muestra aumentando así la variabilidad de la imagen original. Esta opción, sin embargo, es incompatible con los algoritmos PLSDA y SIMCA

ya que a lo largo de la tesis se ha demostrado que un número mayor de 25000 espectros provoca un bloqueo del sistema operativo debido a la falta de memoria del ordenador, como descrito por [21].

Una última consideración concierne la superficie de las muestras durante el análisis NIR-CI. Esta puede no ser homogénea debido a diferencias en el tamaño y al origen de cada partícula. Hay que tener en cuenta este aspecto a la hora de estudiar los resultados de la clasificación que el modelo proporciona por cada píxel, es decir, pasar del concepto de clasificación al de cuantificación, como se describe en el siguiente capítulo.

5.6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Riccioli, C., Pérez-Marín, D., Guerrero-Ginel, J., Saeys, W., Garrido-Varo, A. (2011). Pixel selection for near-infrared chemical imaging (NIR-CI) discrimination between fish and terrestrial animal species in animal protein by-product meals. *Applied Spectroscopy* 65 (7), pp. 771-781.
- [2] Concejero, P. (2004): Comparación de modelos de curvas ROC para la evaluación de procedimientos estadísticos de predicción en investigación de mercados. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- [3] Hotelling, H. (1947). *Multivariate Quality Control*, in C. Eisenhart, M. W. Hastay and W. A. Wallis (Eds.); *Techniques of Statistical Analysis*, McGraw-Hill, New York.
- [4] Jackson, J. E. (1991). *A User's guide To Principal Components*, John Wiley and Sons, New York.
- [5] Jackson, J.E., Mudholkar, G.S. (1979). Control procedures for residuals associated with Principal. Component Analysis. *Technometrics*, 21, 341.
- [6] Chong, I.G., Jun, C.H. (2005) *Chemom. Intel. Lab. Syst.* 78, 103.
- [7] Wold, S., Johansson, E., and Cocchi, M. (1993). *3D QSAR in Drug Design: PLS – Partial Least-Squares Projections to Latent Structures*. ESCOM Science Publishers.
- [8] Rocha, W. F., Sabin, G. P. Março, P.H., Poppi, R.J. (2010). Quantitative analysis of Piroxicam polymorphs pharmaceutical mixtures by hyperspectral imaging and chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. In press.

- [9] Burger, J.E., Geladi, P.L.M. (2007). H.F. Grahn, P. Geladi, Editors , Techniques and Applications of Hyperspectral Image Analysis, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, West Sussex, England, p. 127
- [10] Shenk, J.S. Workman, J.J. Westerhaus, M.O. (2001). Handbook of near-infrared analysis, D.A. Burns & E.W. Ciurczak (Eds.), Marcel Dekker, New York, Basel, 419.
- [11] Fumière, O. Sinnaeve, G. Dardenne, P. (2000). J. Near Infrared Spectrosc., 8(1), 27.
- [12] Williams, P.C., Norris, K. (2001). Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries, 2nd edition. American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul, Minnesota, USA, USA.
- [13] Hourant, P. Baeten, V., Morales, M.T., Meurens, M., Aparicio, “. (2000). Oil and fat classification by selected bands of Near-Infrared Spectroscopy. Appl. Spectrosc. 54: 1168-1174.
- [14] Garrido, A., García Olmo, J., Pérez Marín, D. (2004). Analysis of fats and oils. En Near Infrared Spectroscopy in agriculture. Roberts C.A., Workman J., Reyes III, J.B. (Eds.). ASA, CSSA, SSSA, Inc., Madison, Wisconsin, USA, pp. 487-558.
- [15] Wang, S. (2007). Variable-Number Variable-Band Selection for Feature Characterization in Hyperspectral Signatures. IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing, 45, 9.
- [16] Wise, B.M., Gallagher, N.B., Bro, R., Shaver, J.M., Windig, W., Koch, R.S. (2005). PLS_Toolbox Version 3.5 for use with MATLAB™, Eigenvector Research, Inc., Manson, WA, USA, 185–189.

- [17] De la Haba, M.J. (2006). Trazabilidad de los productos de origen animal no destinados al consumo humano (SANDACH) mediante el uso de la tecnología NIRS. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba.
- [18] De la Haba M.J., Garrido-Varo A., Pérez-Marín D.C., Guerrero J.E., (2007). Near infrared analysis as a firstline screening technique for identifying animal species in rendered animal by-products meals. *J. Near Infrared Spectrosc.*, 15, 237-245.
- [19] Fumière, O., Marien, A., Pierna, J.F., Baeten, V., Berben, G. (2010). Development of a real-time PCR protocol for the species origin confirmation of isolated animal particles detected by NIRM. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 27 (8), pp. 1118-1127.
- [20] Bylesjo, M., Rantalainen, M., Cloarec, O., Nicholson, J. K., Holmes, E., Tryg, J. (2007). OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. *Journal Of Chemometrics*, 20: 341–351.
- [21] Bennett, K. Robertson, J. (2011). The Impact of the Data Archiving File Format on Scientific Computing and Performance of Image Processing Algorithms in MATLAB Using Large HDF5 and XML Multimodal and Hyperspectral Data Sets. In *MATLAB - A Ubiquitous Tool for the Practical Engineer*. Clara M. Ionescu Eds. InTech.

CAPÍTULO 6. PUESTA A PUNTO DE UN PROTOCOLO PARA ANÁLISIS CUANTITATIVO

6.1. OBJETIVOS

En este estudio se compararon dos métodos lineales de calibración multivariantes: PLS y PCR, para verificar su viabilidad en la cuantificación de harinas de carnes y huesos (MBM) presentes en mezclas de harinas.

6.2. METODOLOGÍA

6.2.1 MUESTRAS

El estudio presentado en este capítulo implicó el uso de 126 muestras de harinas de pescado contaminadas con niveles controlados de MBM procedente del colectivo experimental.

Para obtener muestras con niveles controlados de contaminación, se diseñaron mezclas que contuvieran porcentajes de harina de rumiante desde el 0,25% al 16 % (intervalos de 0,25%). Se decidió que cada uno de los porcentajes de harina de vacuno estuviese por duplicado, esto es, se diseñó un total de 63 muestras que, teniendo en cuenta los duplicados, resultaron en 126 muestras finales. La elaboración de las muestras experimentales de harina se realizó en base a un diseño aleatorio de asignación de cada muestra a la mezcla final. El procesado de las distintas especies de harinas se llevó a cabo mediante el procedimiento de diluciones sucesivas como descrito por De la Haba [1].

6.2.2 ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE PÍXELES MEZCLA EN HARINAS ANIMALES.

Para estudiar el comportamiento de píxeles impuros y como paso previo al desarrollo de modelos cuantitativos de predicción del porcentaje de harina de rumiante presente en una muestra, se desarrollaron modelos PLSDA con las 126 muestras procedentes del colectivo experimental dividiendo el colectivo en 4 grupos según su nivel de contaminación para comprobar la capacidad que la tecnología NIR-CI posee para discriminar muestras con diferentes niveles de contaminación. En particular, se crearon cuatro grupos o clases, cada uno con una varianza interna del 4% de contaminación y con niveles crecientes entre grupos:

- Clase 1: 0.25-4% MBM (24 muestras)
- Clase 2: 4.25-8% MBM (24 muestras)
- Clase 3: 8.25-12% MBM (23 muestras)
- Clase 4: 12.25-16% MBM (23 muestras)

El conjunto de las 126 muestras fue dividido en dos grupos de manera que todo el rango de contaminación estuviese presente en ambos grupos. Así, se obtuvo un grupo formado por 94 muestras que se utilizó para crear el modelo (colectivo CAL) y otro formado por 32 muestras que fue utilizado para validar el modelo (colectivo VAL).

Como en los anteriores estudios (capítulos 4 y 5), por cada muestra se tomó su imagen hiperspectral a partir de 1 gr. de muestra y utilizando una resolución espacial de 97.8 μm (tamaño del píxeles) y una resolución espectral de 10 nm. El rango utilizado fue 1000-1700 nm y el espectro asignado a cada píxel fue el resultado de la premedicación de 16 escaneos. Se eligió una Región de Interés (ROI) de 216x280 píxeles.

6.2.3. CREACIÓN DE LA MATRIZ DEL COLECTIVO DE CALIBRACIÓN

En análisis NIR-CI del colectivo CAL permitió obtener 94 cubos espectrales. Sucesivamente se transformó la dimensión espacial del hipercubo $X \times Y \times \lambda$ creando una matriz $((XY) \times \lambda)$.

El siguiente paso fue la obtención del espectro medio de cada matriz para poder representar cada muestra en un modelo de clasificación (PLSDA) o regresión (PLS y PCR).

6.2.4. VALIDACIÓN DE LOS MODELOS

Dado que la predicción cuantitativa del espectro medio de una imagen entera elimina la información espacial, para el colectivo VAL utilizado para validar los modelos se procedió con los mismos pasos que en la fase de calibración, pero, en este caso, no se calculó el espectro medio de cada muestra del colectivo VAL sino que se consideró el conjunto entero de espectros correspondientes a todos los píxeles de cada muestra. Los modelos fueron utilizados en un primer momento para predecir la concentración de MBM de los píxeles de 3 muestras del colectivo VAL con el objetivo de estudiar su capacidad predictiva en función de diferentes tratamientos aplicados a los píxeles de las imágenes con el fin de encontrar el más apropiado. El tratamiento de Binning (Bin) fue elegido por su capacidad de mantener la estructura espacial original mejorando la resolución espectral como se indica en el capítulo 4 de esta memoria. Se consideró que, para el análisis cuantitativo con imágenes hiperespectrales, este método de reducción de píxeles podía ser adecuado ya que los espectros resultantes del Bin, que tienen características más parecidas a los espectros utilizados para construir el modelo, siendo ambos resultados de un tratamiento de mediado. Una vez establecido el método de tratamiento de los píxeles, se procedió a la predicción del colectivo VAL entero.

Los modelos creados fueron posteriormente usados para predecir todas las muestras del colectivo VAL una vez optimizada la metodología para el tratamiento de los píxeles. Los vectores de respuesta correspondientes a la pertenencia de cada píxel a una clase o a la

concentración de MBM de cada muestra fueron remodelados para formar una imagen o mapa de cada predicción.

6.2.5. OTROS ESTADÍSTICOS

Para evaluar los modelos cualitativos se utilizaron los mismos estadísticos descritos en el capítulo 5 de esta tesis. La combinación de pretratamientos utilizados fue la misma utilizada en el capítulo 5 ya que fue la que mejores resultados proporcionó para el análisis PLSDA. La creación de los modelos PLS y PCR implicó, por otro lado, el uso de una nueva combinación de pretratamientos que incluía el cálculo de la derivada segunda de los espectros, seguida por la corrección *Multiplicative Signal Correction* y *Mean Center*. La validación cruzada se implementó eligiendo bloques de 25 muestras en el caso del análisis PLSDA y *Venetian Blinds* en el caso de los análisis PLS y PCR. El sistema de las “ventanas venecianas” selecciona nuevos subgrupos de datos para calcular varios submodelos similares con los que contrastar la validez del modelo general.

La evaluación de los modelos cuantitativos obtenidos fue efectuada con los siguientes estadísticos:

En Calibración y Validación Cruzada:

RMSEC (error típico de los residuales para el colectivo de calibración).

RMSECV (error típico de los residuales para el colectivo de validación cruzada)

$$RMSEC = RMSECV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N - p - 1}}$$

Donde

N = Número de muestras del colectivo de calibración.

p = N° de factores de la regresión.

y_i = Valor del constituyente a calibrar para la muestra i .

\hat{y}_i = Valor predicho por la ecuación de calibración para la muestra i .

Coefficientes de determinación de la regresión. Porcentaje de la varianza de los datos de referencia que puede ser explicada por el modelo de la regresión (a partir de los datos espectrales). Se ha calculado tanto para el colectivo de calibración (r^2), como el de validación cruzada (r^2 CV).

$$R^2 = \frac{SC_{reg}}{SC_{tot}} = \frac{SC_{tot} - SC_{res}}{SC_{tot}} = 1 - \frac{SC_{res}}{SC_{tot}} = 1 - \frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2}$$

Donde

SC_{reg} = Suma de cuadrados de la regresión.

SC_{tot} = Suma de cuadrados total.

En validación externa o predicción:

RMSEP (error típico de las diferencias entre los valores de referencia y los predichos NIRS).

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (D_i - Bias)^2}{N - 1}}$$

Donde

D = Diferencia entre el valor de referencia y el valor predicho NIRS, para la muestra i .

N = Número de muestras del colectivo de validación externa.

Bias o sesgo define como la media de los residuales, siendo estos la diferencia entre el valor del laboratorio (y_i) y el valor predicho (\hat{y}_i).

$$BIAS = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)$$

En la bibliografía [2] se encuentran indicaciones sobre el estadístico Bias, el cual no debería superar el valor de 0.60 veces el RMSEC. En el mismo estudio se encuentran indicaciones relativas al valor de r^2 CV que no debe ser inferior a 0.60. En particular, un valor r^2 superior a 0.90 indica que la calibración es excelente; si su valor se encuentra en el rango 0.70 – 0.89, la calibración puede considerarse buena. Si, finalmente, el r^2 tiene un valor dentro del rango 0.50 – 0.69, el modelo obtenido permitirá una adecuada discriminación entre muestras de alto, medio y bajo contenido en el parámetro testado. Con respecto a los valores RMSEP y RMSECV, se indica, como valor límite máximo, el RMSEC x 1.30.

Tanto en el análisis PLSDA como en las regresiones PLS y PCR, se obtuvo finalmente un mapa de distribución de los dos tipos de harinas (pescado y MBM) a través de los pasos arriba descritos.

6.3. RESULTADOS

6.3.1. APROXIMACIÓN CUALITATIVA PARA LA DETERMINACIÓN DEL % DE HARINAS PROCEDENTES DE RUMIANTE EN MEZCLAS

En la parte de revisión bibliográfica del capítulo 1 de esta tesis se ha puesto de manifiesto la escasez de trabajos sobre NIR-CI y cuantificación, si bien algunos autores [3] utilizan una estrategia que se fundamenta en la realización de predicciones cualitativas basadas en el análisis discriminante, para posteriormente asignar los valores predichos a píxeles individuales de una imagen. Quisimos comprobar si esta metodología podía ser útil en caso de análisis de diferentes tipos de harinas animales. Para ello, se planteó en el

presente estudio comprobar si, a través de un enfoque cualitativo, se pudiera llegar a una estima cuantitativa dentro de márgenes del 4% de contaminación.

La Figura 63 recoge los resultados del análisis PLSDA para la discriminación de los cuatro grupos creados.

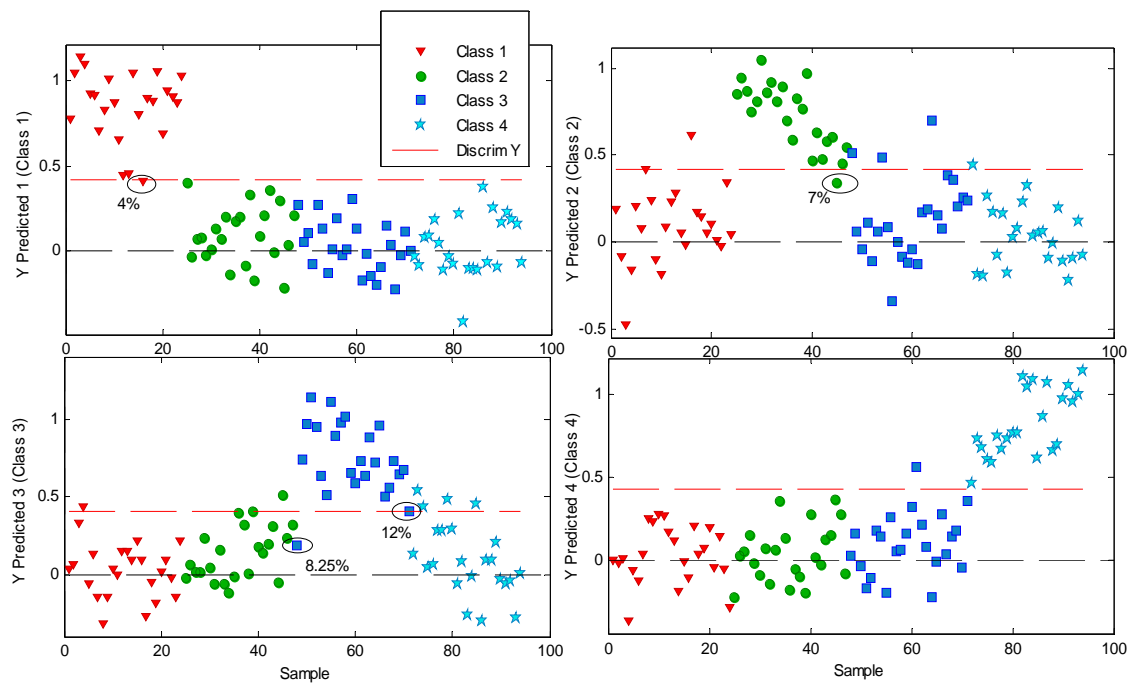


Figura 63. Representación gráfica de los valores de las variables discriminatorias para cada muestra y para las cuatro clases.

El modelo PLSDA creó un valor de discriminación entre 0 y 1 en cada una de las clases definidas, correspondiendo 1 con la clase estudiada (clase 1: 0.25-4% MBM, clase 2: 4.25-8% MBM, clase 3: 8.25-12% MBM y clase 4: 12.25%-16% MBM) y 0 con las tres clases restantes. En base al estudio del error de clasificación en validación cruzada, se decidió incluir las primeras 13 VLs. En el colectivo CAL, el número de falsos negativos fue bajo: una sola muestra de la clase 1 fue incorrectamente clasificada como perteneciente al resto de grupos como se observa en la Figura 63 donde la muestra en cuestión está evidenciada con un círculo (cuadro arriba a la izquierda). Como señalado en la figura, esta muestra tenía un porcentaje de MBM del 4%, se trata por lo tanto de una muestra “límite” del grupo dado que la clase siguiente (clase 2) tiene muestras a partir del 4.25% en contenido de harina de rumiante. En la clase 2 solamente una muestra (7% de harina de rumiante) fue incorrectamente clasificada (Figura 63, cuadro en alto a la derecha). Para la clase 3, las dos muestras con valores límites (8.25 y 12%) fueron clasificadas como pertenecientes a uno de los restantes grupos (Figura 63, cuadro en bajo a la derecha). Todas las muestras de la clase 4 fueron correctamente clasificadas, lo que parece lógico ya que se trata de porcentajes elevados de contaminación. Los estadísticos correspondientes al modelo se muestran en la Tabla 46.

Tabla 46. Estadísticos del modelo PLSDA de 4 clases utilizando el espectro medio (N=94).

CLASE	Sens. (Cal)	Espec. (Cal)	Sens. (CV)	Espec. (CV)	Class. Err (Cal)	Class. Err (CV)
1 (0.25-4%)	0.96	1.00	0.88	0.93	0.02	0.09
2 (4.25-8%)	0.96	0.93	0.71	0.85	0.06	0.23
3 (8.25-12%)	0.96	0.90	0.71	0.81	0.07	0.24
4 (12.25-16%)	1.00	0.99	0.91	0.87	0.07	0.11

Los resultados en términos de sensibilidad superaron el valor de 0.7 para todas las clases siendo más altos para los grupos 1 y 4. El parámetro de especificidad obtuvo valores parecidos siendo particularmente alto (superior al 90%) para el grupo 1 e indicando una escasa incidencia de falsos negativos. Los errores de clasificación en validación cruzada mostraron que los dos grupos correspondientes a los extremos del rango (clase 1 y clase 4) tenían errores de clasificación netamente inferiores a los errores de los grupos 2 y 3.

Sorprende que el grupo de menor porcentaje de contaminación (del 0 al 4%) haya tenido resultados mejores que los otros grupos siendo el error de clasificación del 9%. Esta respuesta podría ser debida a que el modelo discrimina mejor muestras donde el número de partículas “diferentes” (en este caso de harina procedente de rumiantes) es inferior. Probablemente, en presencia de una mayor cantidad de harina de rumiante, la superficie de la muestra de vuelve más homogénea y esto provoca la disminución de la capacidad discriminante.

Como indicado anteriormente, se decidió examinar la posibilidad de utilizar las imágenes del colectivo VAL manteniendo su original estructura de imagen. Las tres muestras seleccionadas del colectivo VAL tenían las siguientes características:

- ✓ Muestra 15218: 0.75% MBM
- ✓ Muestra 15242: 6.75% MBM
- ✓ Muestra 15248: 8.25% MBM

El tamaño de un píxel, en la configuración instrumental utilizada para analizar las muestras de este estudio, fue de 97 x 97 μm . Considerando que las partículas que constituían las muestras tenían un diámetro $\geq 1 \text{ mm}$, se decidió estudiar diferentes niveles de Bin que produjeran píxeles con tamaño comprendido entre 1 y 2 mm para poder hacer la aproximación de considerar 1 píxel \cong 1 partícula. Así se eligieron los siguientes niveles:

- ✓ Bin 10 x 10: tamaño de píxel = 0.9 mm
- ✓ Bin 16 x 16: tamaño de píxel = 1.5 mm
- ✓ Bin 20 x 20: tamaño de píxel = 1.9 mm

También se consideró la imagen completa sin ningún tratamiento (Bin 1 x 1) para la predicción.

Los resultados de las predicciones fueron representados gráficamente para poder analizar la información acerca de la distribución espacial de las distintas clases predichas.

También se calculó el porcentaje que cada grupo ocupaba en cada imagen después de haber remodelado la matriz de predichos.

En la Figura 64 se muestran las predicciones de la muestras en sus 4 formas (original, Bin 10x10, Bin 16x16 y Bin 20x20).

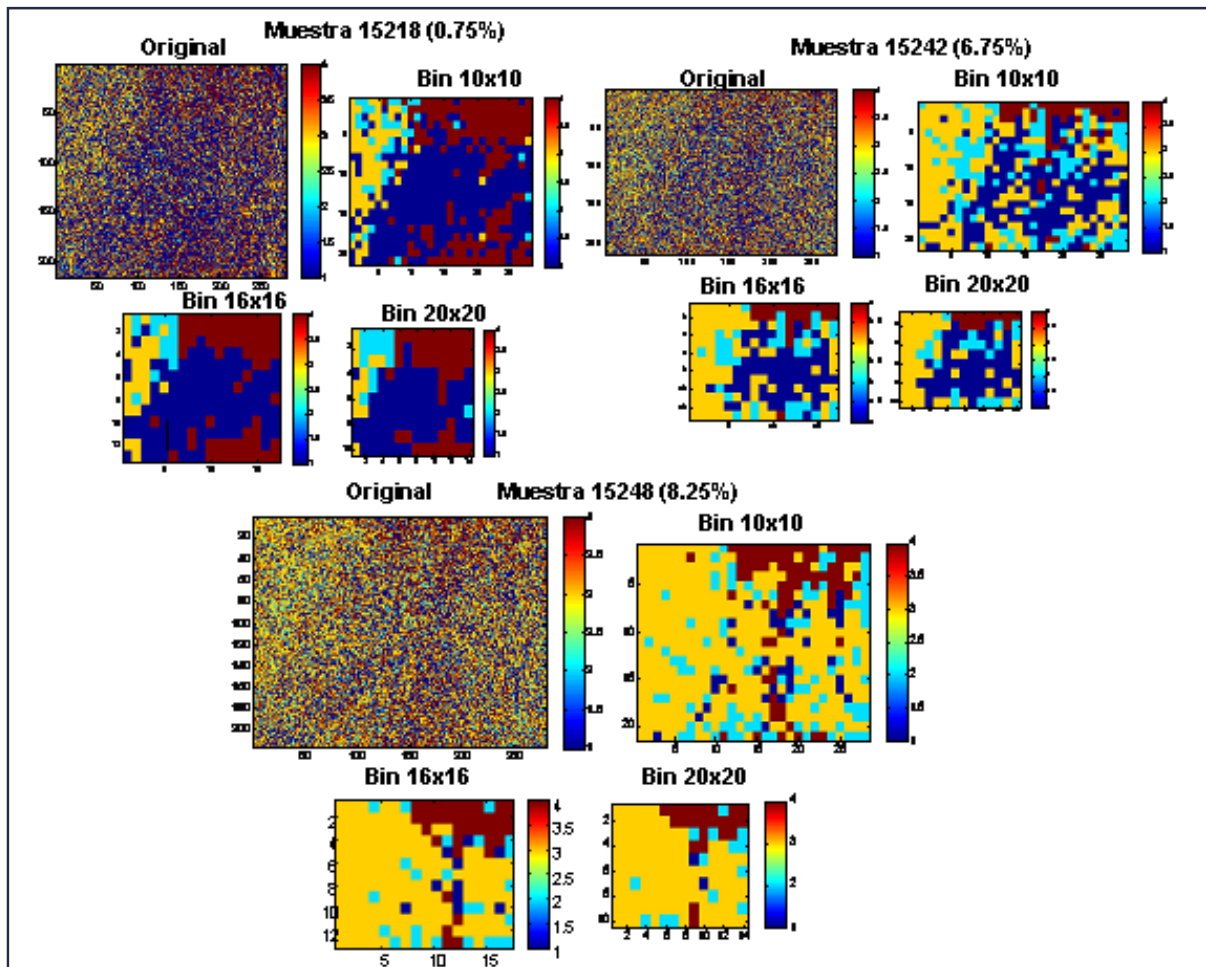


Figura 64. Clasificación de las muestras 15218, 15242 y 15248. Mapa de los pixeles predichos por cada clase. Azul marino= clase 1 (0.25-4%), turquesa=clase 2 (4.25-8%), amarillo=clase 3 (8.25-12%), marrón: clase 4 (12.25-16%).

A través de un análisis visual de los mapas de clasificación, se pudieron observar las zonas de las muestras que tenían una concentración alta (más del 12.25%) de MBM (zonas rojas). La muestra 15218, con un valor de referencia de 0.75% en MBM, se caracteriza por tener una superficie amplia con porcentajes de MBM inferiores al 4%

mientras que la muestra 15248 (valor teórico de MBM=8.25%) tiene la mayor parte de su superficie predicha como clase 3 (8.25-12%). Los resultados concuerdan con los datos de referencia. Para cuantificar la cantidad real de MBM predicha en cada muestra se procedió al cálculo del número de píxeles clasificados en una clase dividido por el número total de píxeles. En la Tabla 47 se muestran los porcentajes de superficie predichos para las tres muestras seleccionadas del colectivo VAL en sus diferentes formas.

Tabla 47. Valores predichos de cada muestra considerando la imagen entera y los tres tratamientos de Bin.

	Muestra	Clase 1 (%)	Clase 2 (%)	Clase 3 (%)	Clase 4 (%)
Entera	15218	46.37	5.11	25.19	23.33
	15242	40.25	8.14	32.94	18.67
	15248	29.51	9.02	39.46	22.01
Bin 10x10	15218	50.00	6.46	13.43	30.13
	15242	33.16	20.24	37.24	9.35
	15248	6.29	15.82	63.26	14.62
Bin 16x16	15218	52.04	6.33	11.76	29.86
	15242	31.22	17.19	41.18	10.41
	15248	4.52	10.86	67.87	16.74
Bin 20x20	15218	50.71	10.00	8.57	30.71
	15242	39.28	15.00	37.14	8.57
	15248	1.43	10.00	70.14	16.43

La muestra 15218, que tenía un nivel de contaminación del 0.75%, fue predicha como clase 1 en su mayoría, concretamente en el 46.37% de su superficie. En este caso, así como en el caso de la muestra 15248, el resultado fue coherente con la composición real de la muestra ya que, por su contenido en MBM (0.75 y 8.25%), las muestras pertenecían respectivamente a la clase 1 (0.25-4%) y 3 (8.25-12%). Otro aspecto a destacar es que, en el caso de la muestra 15248, el número de píxeles clasificados como pertenecientes al grupo 3 aumentaba al aumentar del nivel de Bin. El resultado concuerda con un ensayo

preliminar [4] donde se evidencia que la capacidad del modelo en el reconocimiento de mezclas crece con el incremento del tamaño del píxel.

Una posible explicación a este hecho es que el modelo que relaciona las proporciones de harinas de pescado y MBM con los espectros de las muestras fueron calculadas utilizando el espectro obtenido del promedio de 60480 espectros. Este tratamiento influyó en el poder predictivo del modelo haciendo que espectros correspondientes a píxeles que hubieran recibido un tratamiento parecido se discriminaran con mayor exactitud. El tratamiento de Bin llevado a su máximo nivel, en efecto, corresponde al espectro medio de una imagen. Desde esta perspectiva parece lógico pensar que la mejor solución sea la de utilizar el espectro medio de las imágenes de las muestras del colectivo CAL para predecir el espectro medio de cada una de las imágenes del colectivo VAL. Esta metodología se aproxima al análisis NIRS clásico y, si bien proporciona información con un alto nivel de precisión, no tiene en cuenta la información espacial ni la variedad espectral de diferentes partículas, aspecto innovador que aporta la tecnología NIR-CI. En el capítulo 4 de esta tesis, además, se comprobó que el uso de varios píxeles por muestra para crear un modelo discriminante proporciona una información más completa respecto al uso de un solo píxel que representa la media de toda la imagen.

Una explicación alternativa al hecho de que el incremento en el nivel de Bin mejore las predicciones está relacionada al tamaño de píxel: un mayor nivel de Bin produce un mayor tamaño de píxel. El Bin 20 x 20, en particular, produce píxeles con el doble del tamaño de una partícula de la muestra. Esto significa que cada píxel tiene una alta probabilidad de contener una mezcla de mínimo dos partículas diferentes. El espectro generado será por lo tanto más idóneo a una cuantificación con respecto al espectro puro (correspondiente a una sola partícula).

Se decidió, por tanto, extender el uso del tratamiento Bin no solo al colectivo VAL, sino también al CAL e incluir varios píxeles representativos por cada muestra para crear el modelo cuantitativo. El nivel de Bin a utilizar fue elegido en base a los resultados de las predicciones obtenidas en la clasificación de las muestras en los 4 grupos. Para aproximarse a una determinación cuantitativa del nivel de contaminación de cada muestra se multiplicó el porcentaje de píxeles clasificados en una determinada clase por

el valor mínimo y máximo del rango de la propia clase. En el caso de las muestras 15218, 15242 y 15248 los resultados fueron los mostrados en la Tabla 48.

Tabla 48. Estima de los porcentajes de MBM% (o contaminación) en cada muestra considerando la imagen entera y los tres tratamientos de Bin.

	Muestra	Clase 1 (%)	Clase 2 (%)	Clase 3 (%)	Clase 4 (%)	Estima (%)
Entera	15218 (min)	0.12	0.22	2.08	2.86	5.27
	15218 (max)	1.85	0.41	3.02	3.73	9.02
	15242 (min)	0.10	0.35	2.72	2.29	5.45
	15242 (max)	1.61	0.65	3.95	2.99	9.20
	15248 (min)	0.07	0.38	3.26	2.70	6.41
	15248 (max)	1.18	0.72	4.74	3.52	10.16
Bin 10x10	15218 (min)	0.13	0.27	1.11	3.69	5.20
	15218 (max)	2.00	0.52	1.61	4.82	8.95
	15242 (min)	0.08	0.86	3.07	1.15	5.16
	15242 (max)	1.33	1.62	4.47	1.50	8.91
	15248 (min)	0.02	0.67	5.22	1.79	7.70
	15248 (max)	0.25	1.27	7.59	2.34	11.45
Bin 16x16	15218 (min)	0.13	0.27	0.97	3.66	5.03
	15218 (max)	2.08	0.51	1.41	4.78	8.78
	15242 (min)	0.08	0.73	3.40	1.28	5.48
	15242 (max)	1.25	1.38	4.94	1.67	9.23
	15248 (min)	0.01	0.46	5.60	2.05	8.12
	15248 (max)	0.18	0.87	8.14	2.68	11.87
Bin 20x20	15218 (min)	0.13	0.43	0.71	3.76	5.02
	15218 (max)	2.03	0.80	1.03	4.91	8.77
	15242 (min)	0.10	0.64	3.06	1.05	4.85
	15242 (max)	1.57	1.20	4.46	1.37	8.60
	15248 (min)	0.00	0.43	5.79	2.01	8.23
	15248 (max)	0.06	0.80	8.42	2.63	11.90

De los resultados obtenidos de la predicción de los porcentajes mínimo y máximo de MBM en las tres muestras analizadas se constató que una aproximación al valor exacto de

contaminación por MBM era complicada basándose en un análisis discriminatorio. Cada clase incluía niveles que podían tener entre ellos diferencias variables en el orden del 4% entre una muestra y otra, y esto provocaba que el error de clasificación que fuera, como mínimo, del 4%. En el caso de la muestra 1518, por ejemplo, el valor mínimo predicho de MBM fue de 5.03%, valor muy distante del valor real. El resultado evidenció la escasa capacidad del modelo a la hora de discriminar bajos niveles de contaminación. La tendencia en las predicciones proporcionaba, sin embargo, una información afín a la realidad ya que la muestra 15248, que obtuvo valores máximos de píxeles predichos como MBM mayores que las otras dos muestras.

De los resultados obtenidos, se confirmó la necesidad de desarrollar un modelo cuantitativo para poder obtener una más detallada información acerca de la composición de harinas de mezclas.

Tratando de profundizar en la influencia que el utilizar números diferentes de píxeles en calibración y en validación, a continuación se decidió evaluar el potencial discriminante de modelos utilizando varios píxeles de cada muestra para incrementar la exactitud en las predicciones. Con el objetivo de comprobar que el uso de la información procedentes de diferentes píxeles por muestra podría mejorar precisión y exactitud de los modelos creados con píxeles “mezcla”, se decidió seleccionar un número de píxeles que permitiera optimizar el tiempo de computación y la cantidad de información proporcionada.

Un factor que hay que tener en cuenta en el manejo de píxeles “mezcla” es que, a diferencia de píxeles puros, no se puede asignar el valor de referencia a cada píxel de una imagen dado que esto implicaría asumir que una muestra de harina animal es totalmente homogénea. Esta aproximación llevaría, por lo tanto, a un error muy alto. Teniendo en cuenta este aspecto, se llegó a la conclusión de que la única metodología posible para la selección de píxeles a incluir en el colectivo CAL era el tratamiento de Bin que permite asignar el valor de referencia a un “súper-píxel”. Utilizando la información resumida proveniente de un súper-píxel del tamaño de 16x16 píxeles (2.62 mm²) de una muestra mezcla, se puede hacer una aproximación y considerar que en el área considerada exista un porcentaje de mezcla similar al que se encuentra en la totalidad de la harina. Los otros métodos evaluados anteriormente para la selección de píxeles (interpolación espacial,

MD y método de Kennard-Stone), por otro lado, fueron descartados en cuanto que todos ellos implican la selección de píxeles espacialmente aislados entre ellos y que, desde luego, no pueden representar una mezcla. Considerando que las muestras analizadas fueron molidas en un molino ciclónico hasta un tamaño de partícula de entre 1 y 3 mm [1], se consideró apropiado incrementar el nivel de Bin a 40x40 lo que proporcionaba un súper píxel con tamaño de 3.8 mm y aseguraba que en un píxel estuviese resumida la información procedente de ambas especies y de su cantidad relativa.

Se procedió, entonces, con la creación del modelo discriminante utilizando las 4 clases del estudio anterior y utilizando 35 espectros por cada muestra resultante del tratamiento Bin 40x40. El colectivo VAL también fue tratado con Bin. En este caso se utilizó el nivel 10 (Bin 10x10) que resultó como el más apropiado en ensayos preliminares [4]. Se seleccionaron, en este caso, 16 variables latentes utilizando, como validación cruzada, el sistema de bloques de 25 muestras. Los estadísticos del nuevo modelo así creado se muestran en la Tabla 49.

Tabla 49. Detalles del modelo PLSDA de 4 clases utilizando Bin 40 (N=3290).

CLASE	Sens. (Cal)	Espec. (Cal)	Sens. (CV)	Espec. (CV)	Class. Err (Cal)	Class. Err (CV)
1 (0.25-4%) (N=840)	0.95	0.95	0.95	0.94	0.05	0.05
2 (4.25-8%) (N=840)	0.84	0.92	0.83	0.92	0.12	0.13
3 (8.25-12%) (N=805)	0.85	0.86	0.86	0.86	0.14	0.16
4 (12.25-16%) (N=805)	0.91	0.90	0.91	0.89	0.1	0.10

Comparando estos resultados con los del modelo discriminante creado con los espectros medios de las 94 muestras del colectivo CAL (Tabla 46) se observa que la predicción había mejorado tanto en el error de clasificación como en la sensibilidad y especificidad. En particular, el valor de sensibilidad de la clase 1 incrementó del 87.5% al 94.9% en validación cruzada, mostrando una significativa disminución del número de falsos positivos. El error de clasificación en validación cruzada se redujo aproximadamente a la mitad en todas las clases menos en la 4 donde incrementó un 4%. El hecho de que el grupo 4 fuera el único que no mejoró los valores de predicción es probablemente debido

a que, en niveles más altos de contaminación, disminuye la necesidad de aumentar el tamaño de los píxeles.

Una vez creado el modelo, se procedió a la validación de las tres muestras del colectivo VAL anteriormente utilizadas para comprobar el poder discriminante de las ecuaciones. Las muestras fueron tratadas con Bin 10x10 y los resultados se muestran en la Tabla 50.

Tabla 50. Porcentajes de píxeles de las muestras 15218, 15242 y 15240 asignados a cada clase.

MUESTRA	Clase 1 (%)	Clase 2 (%)	Clase 3 (%)	Clase 4 (%)
15218	56.46	9.69	0.17	33.67
15242	5.1	43.71	21.09	30.1
15248	1.36	34.86	46.6	17.18

En dicha tabla se observa que, en todas las muestras, el porcentaje más alto de sus píxeles fueron clasificados correctamente. La muestra 15218, teniendo un valor de referencia del 0.25%, ha sido clasificada como perteneciente a la clase 1 en el 56.46% de su superficie. La muestra 15242, cuyo nivel de contaminación era del 6.75%, fue clasificada en un 43.71% de su superficie como clase 2 (4.25-8%). Finalmente, la muestra 15248, con un porcentaje de MBM del 8.25%, ha sido correctamente clasificada como clase 3 (8.25-12%) en el 46.6% de su superficie.

Dados los mejores resultados obtenidos, se eligió utilizar este último modelo para la clasificación de todas las muestras del colectivo VAL. Después de haber reducido cada imagen del colectivo VAL con un Bin 20x20, lo que producía imágenes de 140 píxeles por muestra, dichas imágenes fueron acopladas en una sola imagen con un tratamiento de concatenación como se muestra en el esquema de la Figura 65 donde se indica el porcentaje de contaminación de cada muestra y su posición en la imagen.

0.25	1.25	2.25	3.25	4.25	5.25	6.25	7.25	8.25	9.25	10.25	11.25	12.25	13.25	14.50	15.50
0.75	1.75	2.75	3.75	4.75	5.75	6.75	7.75	8.75	9.75	10.75	11.75	12.75	14.00	15.00	16.00
Class 1				Class 2				Class 3				Class 4			

Figura 65. Porcentajes de MBM en las 32 muestras concatenadas del colectivo VAL. (N = 4480).

Un total de 4480 píxeles fueron clasificados en una de las cuatro clases. Los resultados están representados gráficamente en la Figura 66.

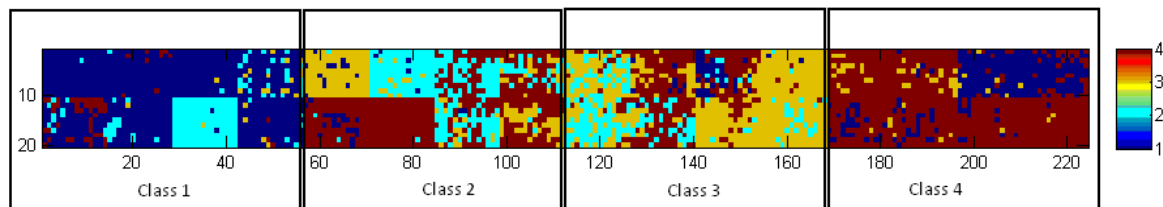


Figura 66. Mapa de los píxeles predichos de las muestras del colectivo VAL. En azul: clase 1. En turquesa: clase 2. En amarillo: clase 3. En rojo oscuro: clase 4.

El modelo clasificó correctamente la mayoría de la superficie de las ocho primeras muestras (4 en la fila de arriba y 4 en la fila de abajo) como clase 1. Solamente la muestra 15226 (2.75%) fue clasificada como clase 2. En la clase 2 destacaron la muestra 15332 (4.25%) clasificada como clase 3 y las muestras 15234 y 15238 (4.75 y 5.75% respectivamente) clasificadas como clase 1. Finalmente, en la clase 4 destacan las muestras 15273 y 15277 (14.50 y 15.50% respectivamente) clasificadas como clase 1 en la mayor parte de su superficie. En relación a estas dos muestras, cabe resaltar que el error de predicción fue alto ya que casi la totalidad de la superficie de las dos muestras fue clasificada como si tuviera entre el 0 y el 4% de contaminación mientras que, realmente, las dos muestras presentan niveles de harinas de rumiantes superiores al 12.5%. Las dos muestras representan por lo tanto dos casos de falsos negativos peligrosos en la industria agroalimentaria.

De este estudio preliminar al análisis cuantitativo se puede concluir que el uso de la imagen de una muestra o la información sintetizada de los píxeles de la imagen, es más efectivo que el uso del espectro medio de cada muestra para el diseño de modelos discriminantes que permitan discriminar entre harinas de pescado contaminadas con cantidades controladas de MBM. Esta información preliminar se utilizó para el diseño de modelos cuantitativos, cuyos resultados se presentan a continuación.

6.3.3. CREACIÓN DE MODELOS CUANTITATIVOS PARA LA PREDICCIÓN CUANTITATIVA (% DE LA ESPECIE EN UNA MEZCLA)

Para evaluar la viabilidad de NIR-CI en análisis cuantitativos se utilizaron en un primer momento los espectros medios de las 94 muestras del colectivo CAL para crear un modelo de regresión PLS.

Teniendo que optimizar algunos parámetros antes de crear los modelos cuantitativos definitivos, también en este caso se optó por utilizar el espectro medio de las 126 muestras (94 del colectivo CAL y 32 del colectivo VAL) en vez que un número mayor de espectros por muestra. Analizando el comportamiento del error de predicción en validación cruzada (*RMSECV*) después de la aplicación de varias combinaciones de pretratamientos, se optó por un pretratamiento diferente con respecto al análisis cualitativo viendo que los resultados mejoraban con el uso de derivada segunda 9. 2. 2. (donde el primer número indica el orden de la derivación, el segundo número es la amplitud o distancia entre los segmentos a sustraer y el tercer número es la longitud del segmento a ser suavizado), seguida por *Multiplicative Signal Correction* y finalmente *Mean Center*. Para poder elegir el número óptimo de variables latentes se realizó el cálculo del modelo aplicando el procedimiento de validación cruzada *Venetian Blinds*. Este algoritmo resultó ser más adecuado que el sistema por bloques contiguos utilizado en la validación cruzada en PLSDA. Finalmente se eligieron 11 VLs. La Tabla 51 presenta los estadísticos del modelo para la predicción PLS de los niveles de harinas de rumiante presentes en muestras binarias de pescado y rumiante.

Tabla 51. Estadísticos del modelo para la predicción PLS de diferentes porcentajes de MBM en mezclas binarias.

RMSEC	RMSECV	RMSEP	Pred Bias	r ² Cal	r ² CV	r ² Pred
1.86	2.60	2.11	-0.27	0.84	0.69	0.81

RMSEC: Error de predicción en calibración. RMSECV: Error de predicción en validación cruzada. RMSEP: Error de predicción en validación externa. Pred.Bias: Sesgo en predicción.

Los estadísticos del modelo muestran que la calibración explica el 84% y el 81% de la variación en el porcentaje de especie en la mezcla, en los colectivos de calibración y validación respectivamente. Sorprende que en validación cruzada este valor sea inferior

(69%). Probablemente este comportamiento es debido al tipo de validación cruzada que, al quitar del modelo un subgrupo de 10 muestras en cada paso, desestabiliza de manera significativa el modelo disminuyendo la capacidad predictiva. Teniendo en cuenta los criterios de validación propuestos por [5] y detallados por [1], podemos concluir que los valores del RMSEP se encuentran dentro del límite establecido $N = 1.30 \times \text{RMSEC}$. De igual forma los valores de Bias y pendiente están dentro de los límites establecidos por lo que podemos concluir que el modelo satisface los criterios requeridos para la validación de dicha ecuación.

La Figura 67 muestra los valores predichos NIR-CI frente a los valores de referencia del colectivo de calibración y de validación externa obtenidos para la predicción del contenido de harina de rumiante en mezclas binarias.

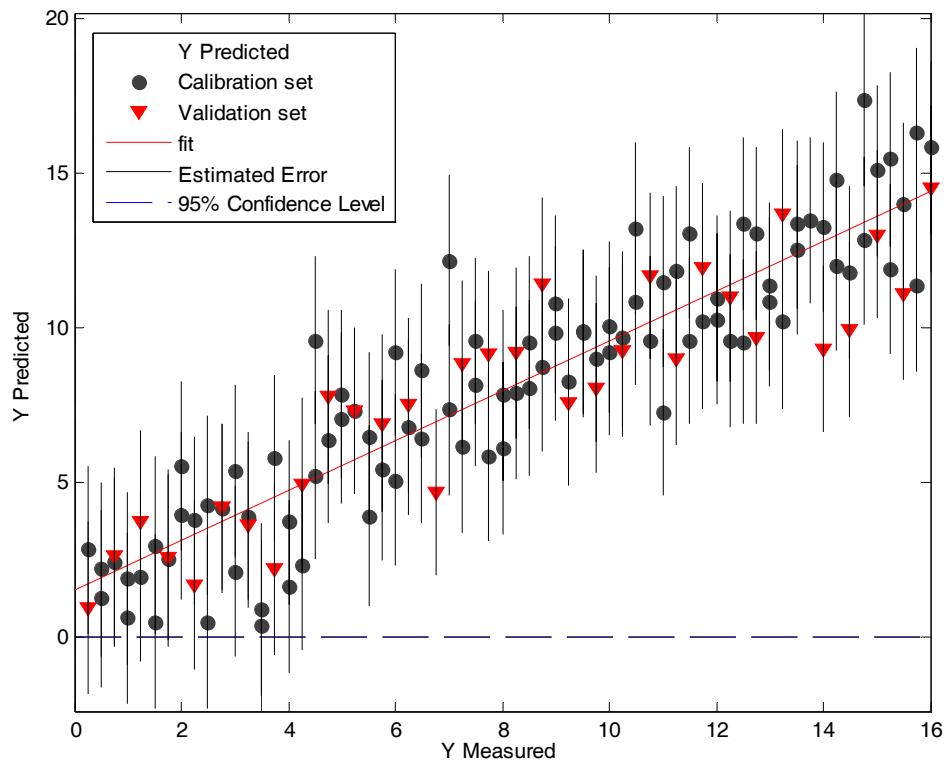


Figura 67. Relación entre la predicción NIR-CI y los valores reales para el colectivo CAL (círculos negros) y VAL (triángulos rojos) obtenidos mediante PLS.

En la Figura 67 se observa que en la región de valores de referencia más bajos (parte izquierda del gráfico), existen mayores diferencias entre los valores predichos y los de referencia, lo que parece lógico ya que se trata de las muestras con porcentajes más bajos de contaminación. A pesar de ello, las predicciones podrían ser útiles para proporcionar información sobre el límite mínimo de contaminación por MBM que el análisis NIRS puede detectar. En este caso, el límite aproximado de detección resultó del 3%, por debajo del cual, parece que el modelo no sea suficientemente preciso.

Pasando a los resultados obtenidos con el método de regresión PCR, en la Tabla 52 se muestran los estadísticos correspondientes al modelo PCR desarrollado para la predicción del nivel de contaminación por rumiante en mezclas binarias de pescado y vacuno.

Tabla 52. Estadísticos de calibración para la predicción PCR de diferentes porcentajes de MBM en mezclas binarias.

RMSEC	RMSECV	RMSEP	Pred Bias	r ² Cal	r ² CV	r ² Pred
2.23	2.81	2.57	-0.07	0.76	0.63	0.70

RMSEC: Error de predicción en calibración. RMSECV: Error de predicción en validación cruzada. RMSEP: Error de predicción en validación externa. Pred.Bias: Sesgo en predicción.

Estudiando los estadísticos del modelo PCR, se observó que el valor RMSEP resultó inferior a los límites aconsejados así como el Bias en predicción. El coeficiente de determinación r^2 obtuvo un valor de 0.70 por lo que también entraba dentro del rango para considerar una predicción aceptable.

El método PCR, como se ha explicado en el capítulo 1 de esta memoria, emplea un análisis PCA seguido por una regresión lineal. Este procedimiento implica que la información procente de Y no es tenidos en cuenta en el momento de la creación del modelo. Esta es la probable causa de la inferior capacidad predictiva que el análisis PCR tiene con respecto al análisis PLS. En la Figura 68 se muestran los valores predichos frente a los valores de referencia del colectivo CAL y VAL obtenidos para la predicción del contenido de harina de rumiante en mezclas binarias, utilizando la regresión PCR.

Con el mismo colectivo cálculo Principal Component Regression (PCR).

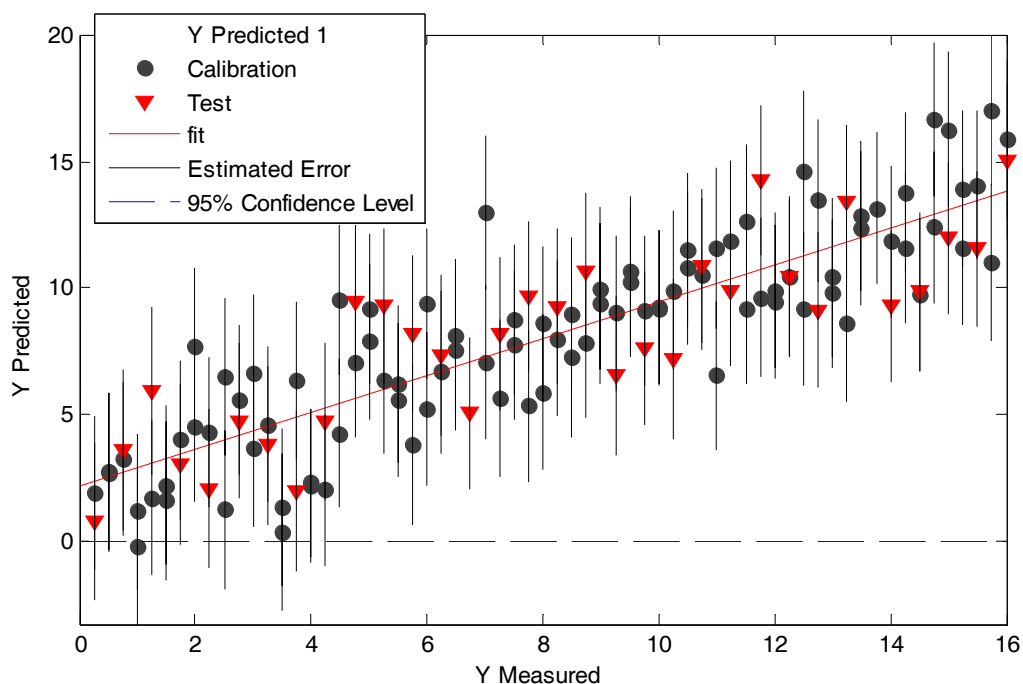


Figura 68. Relación entre la predicción NIR-CI y los valores reales para el colectivo CAL (círculos negros) y VAL (triángulos rojos) obtenidos mediante PCR.

De los valores de error estimado representados en el gráfico, se observó que, nuevamente, algunas muestras con valores de MBM bajos (0.50 y 2.75%) tenían un valor predicho del 0%. Estos tipos de predicciones, que revelan la presencia de falsos negativos, son los que más afectan los análisis donde el límite de contaminación tolerado es cero. Sin embargo, en vista de una reformulación de la normativa vigente [6] el límite de detección obtenido podría ser suficiente para poder utilizar la tecnología NIR-CI como método analítico de control.

La diferencia del PLS con otros métodos de regresión multivariables, es que el algoritmo PLS intenta que los primeros componentes contengan la mayor información posible para la predicción de la matriz Y. Para ello, durante la etapa de calibración, el algoritmo utiliza tanto la información contenida en la matriz de datos X (p. e. datos espectrofotométricos) como la información contenida en la matriz de la propiedad a determinar, matriz Y (p. e. concentraciones), obteniéndose unas variables latentes que tienen, respecto a los factores PCA, una ulterior información relativa a los valores de referencia.

Los modelos PLS y PCR fueron aplicados a las muestras del colectivo VAL después de tratamiento de Bin 20x20 y concatenación. Se compararon los dos métodos cuantitativos anteriormente indicados para verificar el poder predictivo de los tres modelos. En la Figura 69 se muestra el colectivo VAL concatenado clasificado con los tres modelos.

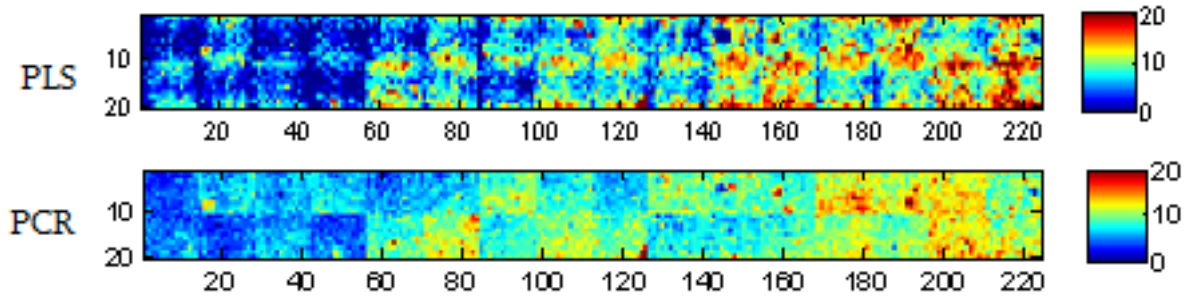


Figura 69. Clasificación de las muestras del colectivo VAL. Mapa de los píxeles predichos en el rango 0 – 20% MBM.

En las dos imágenes de los mapas de clasificación se observó una variación de color desde el azul marino de la parte izquierda (concentraciones inferiores de MBM) hasta tonos rojos en la parte derecha (concentraciones de MBM superiores). Este tipo de respuesta gráfica es muy intuitiva y además aporta información espacial importante señalando zonas con presencia de un determinado elemento (en este caso harina de MBM) que, en el caso de muestras sólidas heterogéneas (como puede ser un pienso intacto), podrían servir de guía para descartar directamente de una línea de producción el producto adulterado.

Posteriormente y a fin de estudiar el comportamiento de los modelos de regresión frente a diferentes tratamientos de los píxeles, se procedió a la predicción de muestras del colectivo VAL, tanto en su forma original como después de tratamiento de Bin. Para estudiar el nivel de Bin óptimo se tomaron varias muestras en su formato original (216X280 píxeles) con Bin 10X10, Bin 16X16 y Bin 20X20.

En la Figura 70 se muestra como ejemplo el mapa de predicciones de la muestra 15848 (8.95% de contaminación por MBM) en los cuatro formatos de la imagen.

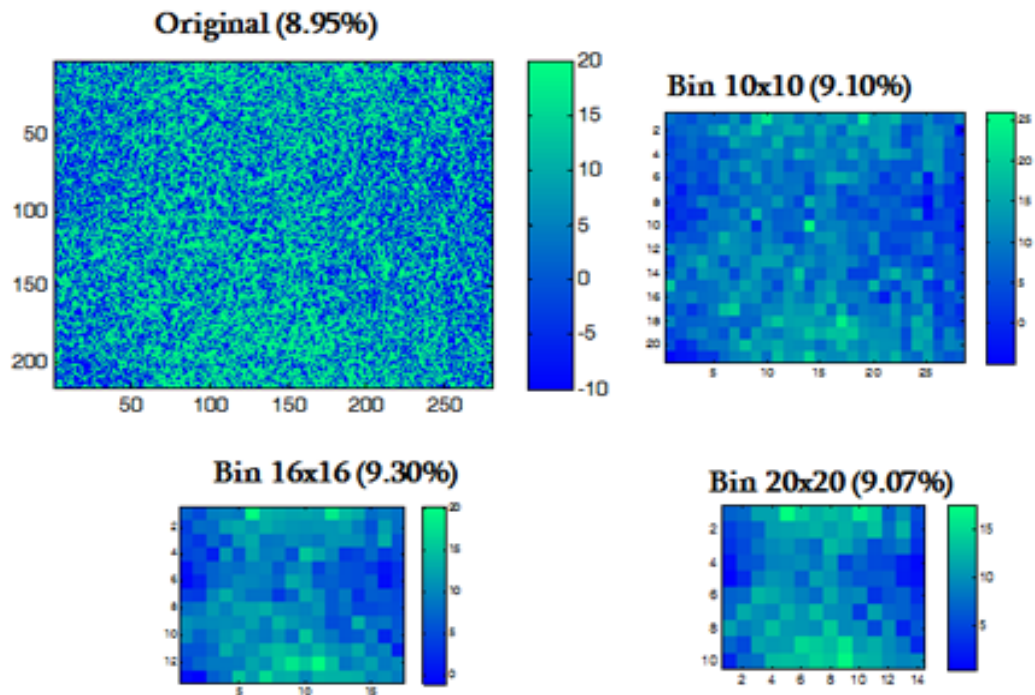


Figura 70. Mapa de predicciones de la muestra 15248 (8.95%), tanto en su forma original como tras tratamiento de Bin. Se indican los porcentajes de MBM predichos en cada formato de la muestra.

Los mapas de predicción indicaron las zonas de mayor contaminación (en verde) y todos los niveles hasta el 0.25% (en azul). Aumentando el nivel de Bin se podían observar más nítidamente zonas de diferentes colores (en la parte superior e inferior de la imagen). Hay que destacar que, analizando la imagen sin Bin, los valores predichos tenían un rango muy amplio (escala de -10 a 20) con píxeles evidentemente mal predichos. Los píxeles con valores predichos tan alejados de los valores reales deben considerarse anómalos y ser excluidos a la hora de calcular el porcentaje de harina de rumiante presente en cada muestra. Sin embargo, los valores predichos se ajustan al rango real (0.25-16%) conforme va aumentando el nivel de Bin.

En la Figura 71 se muestran a modo de ejemplo, el error RMSEP obtenido en la predicción del porcentaje de ingredientes de la muestra 15248, en función del tratamiento aplicado a la imagen hiperespectral de dicha muestra.

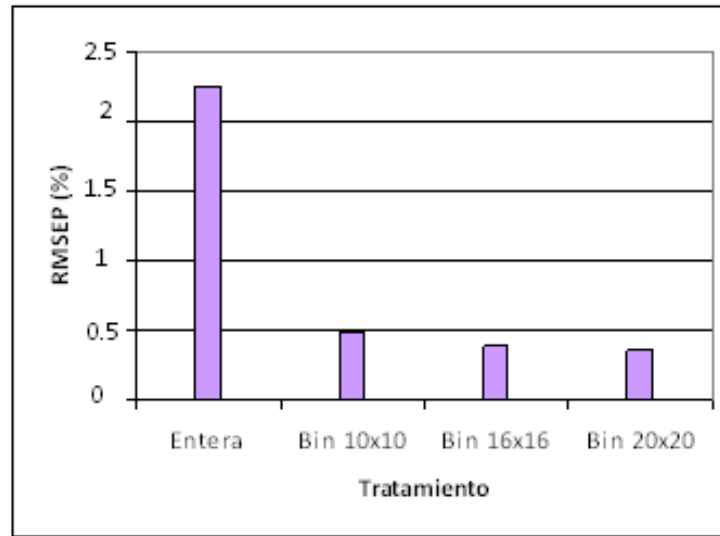


Figura 71. Error de predicción de los píxeles de la muestra 15248 en función del nivel de Bin aplicado.

Se puede observar que los valores del RMSEP disminuyen al aumentar el nivel de Bin. Esto es especialmente evidente en el caso del primer nivel de Bin, en el que se obtiene un RMSEP 4 veces inferior al obtenido sin aplicar Bin. Se confirmó por lo tanto el potencial de los tratamientos Bin para la eliminación de anomalos espectrales en las imágenes hiperespectrales.

Como se puso de manifiesto en el análisis cualitativo, es probable que un modelo creado con varios píxeles por muestra fuera más robusto que uno creado con el espectro medio de cada muestra. Con respecto al sistema de selección de píxeles, sin embargo, no hay que olvidarse que, enfrentándose a un análisis cuantitativo, no es correcto asumir que en una imagen correspondiente a una muestra de HP contaminada con MBM, cada píxel de la imagen tenga el mismo porcentaje de contaminación. En la realidad, en efecto, pueden encontrarse zonas de la imagen donde la contaminación es inexistente y otras donde puede llegar a ser superior al 16%. Por esto se consideró que el método más apropiado para la compresión de datos y la eliminación de *outliers* fuera el Bin, que, además de disminuir notablemente el número de espectros por imagen, actúa como método de “suavizado” de los espectros. Se decidió por lo tanto, aplicar un tratamiento de Bin 40x40 a todas las muestras antes de crear los modelo predictivos.

El modelo creado a partir del colectivo CAL, formado por $N = 3290$ píxeles fue utilizado para la predicción del colectivo VAL. A este último también se le aplicó un tratamiento

de Bin 40x40 al igual que al colectivo CAL, para que los dos colectivo tuvieran el mismo tratamiento y pudieran compararse entre sí. Los espectros fueron pretratados y el nivel de variables latentes elegido tras el estudio del RMSECV fue de 18. Como paso previo y con el fin de detectar la presencia de anómalos, se estudiaron los errores en calibración y en validación cruzada. Los estadísticos correspondientes al modelo PLS desarrollado para la predicción del nivel de contaminación por MBM de muestras de harinas de mezclas están representados en la Tabla 53.

Tabla 53. Estadísticos de calibración para la predicción PLS de diferentes porcentajes de MBM en mezclas binarias de pescado y vacuno.

RMSEC	RMSECV	r ² Cal	r ² CV
1.96	2.05	0.82	0.80

RMSEC: Error de predicción en calibración. RMSECV: Error de predicción en validación cruzada. RMSEP: Error de predicción en validación externa.

Una primera observación de los errores permitió detectar que tanto el RMSECV como el r² se encontraban dentro de los límites considerados aceptables para un modelo PLS. A partir del modelo creado se procedió al análisis de *Q Residuals* y *Hotelling T²* y se evidenció la presencia de 14 espectros claramente *outliers* con valores de *H Hotelling* >100.

Las Figuras 72, 73 y 74 muestran la localización de estos anómalos espectrales comparando *Q Residuals vs. Hotelling T²*, *Leverage vs. T Student* y predichos vs. los valores de referencia.

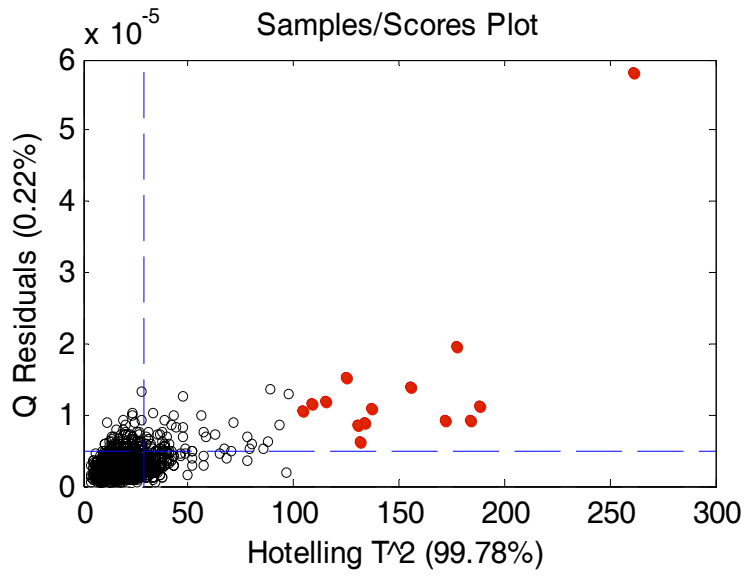


Figura 72. Representación gráfica del colectivo CAL formado por los píxeles resultantes del tratamiento Bin 40x40: Hotelling T^2 frente a Q residuals. En rojo: píxeles outliers.

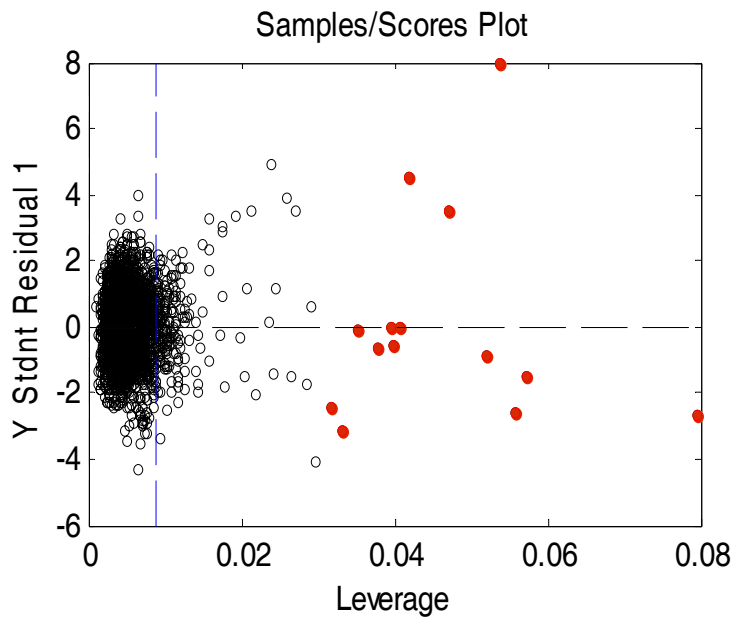


Figura 73. Representación gráfica del colectivo CAL formado por los píxeles resultantes del tratamiento Bin 40x40: Leverage frente a valores residuales de la STD. En rojo: píxeles outliers.

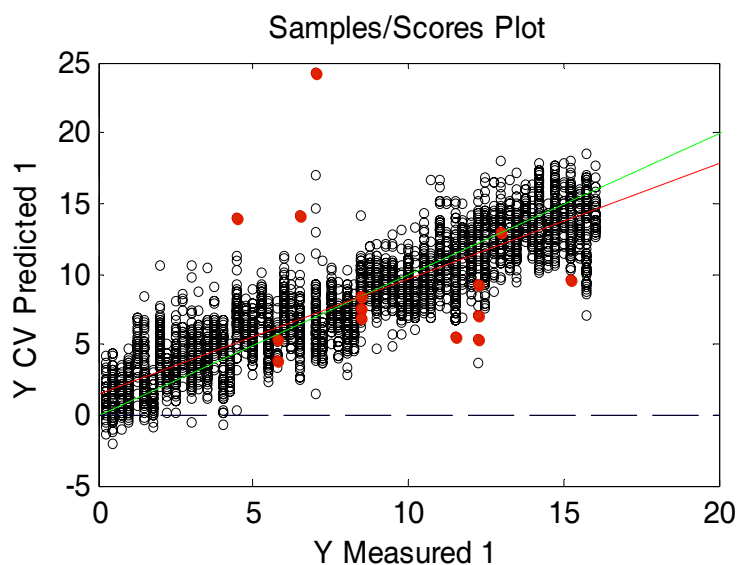


Figura 74. Representación gráfica del colectivo CAL formado por los píxeles resultantes del tratamiento Bin 40x40: Valores predichos frente a valores medidos. En rojo: píxeles outliers.

Una vez identificados los píxeles anómalos se procedió a su eliminación y al cálculo del nuevo modelo que quedó conformado por $N = 3276$ espectros (colectivo CAL) y por $N = 1120$ espectros (colectivo VAL). Los colectivos CAL y VAL fueron tratados con el mismo tratamiento de Bin 40x40. Los estadísticos del modelo así creado se encuentran en la Tabla 54.

Tabla 54. Estadísticos del modelo PLS creado a partir de las muestras del colectivo CAL después de tratamiento de Bin 40x40 y validando con el colectivo VAL

RMSEC	RMSECV	RMSEP	r^2 Cal	r^2 CV	r^2 Pred
1.92	1.98	2.18	0.82	0.80	0.75

Los resultados de la predicción de los píxeles de las muestras del colectivo VAL están representados gráficamente en la Figura 75 donde se observan los valores predichos de los colectivos CAL y VAL frente a los valores de referencia.

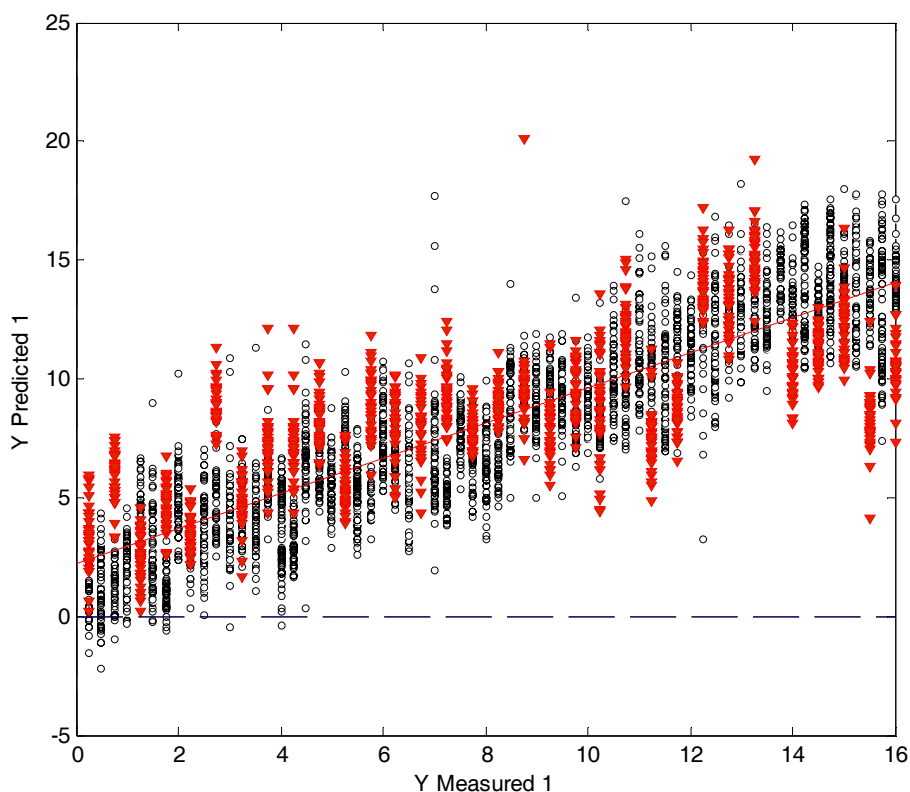


Figura 75. Valores predichos frente a medidos para el colectivo CAL (círculos negros) y VAL (triángulos rojos).
 Tratamiento colectivo CAL: Bin 40x40. Tratamiento colectivo VAL: Bin 40x40.

En la representación gráfica de los píxeles predichos se observó como, tanto las muestras del colectivo CAL como las del colectivo VAL, tenían algunos espectros con predicciones significativamente distantes de los valores de referencia. También se pudo detectar la presencia de muestras cuyo conjunto de píxeles que la conformaban se encontraba alejado de los valores de referencia.

Para conocer el valor predicho de contaminación por MBM de cada muestra de harinas binarias del colectivo VAL se calculó el valor medio de los 35 píxeles de una imagen. Este valor fue comparado con el valor medio predicho por cada muestra utilizando el modelo creado con el espectro medio de las muestras del colectivo CAL. Los resultados se muestran en la Tabla 55 donde se muestra el error de predicción de cada muestra expresado como RMSEP de cada muestra.

Tabla 55. Valores de referencia (medidos), valores predichos y RMSEP de cada muestra del colectivo VAL.

VAL	Medidos	Predichos Bin 40x40	RMSEP Bin40x40
15216	0.25	3.29	3.82
15218	0.75	5.91	6.49
15220	1.25	2.5	1.57
15222	1.75	4.57	3.55
15224	2.25	3.54	1.62
15226	2.75	8.89	7.72
15228	3.25	5.15	2.39
15230	3.75	7.32	4.49
15232	4.25	8.44	5.27
15234	4.75	8.27	4.43
15236	5.25	5.6	0.44
15238	5.75	8.89	3.95
15240	6.25	8.2	2.45
15242	6.75	8.09	1.68
15244	7.25	9.52	2.85
15246	7.75	7.79	0.05
15248	8.25	8.94	0.87
15250	8.75	9.49	0.93
15252	9.25	8.03	1.53
15254	9.75	9.39	0.45
15256	10.25	8.94	1.65
15258	10.75	12.27	1.91
15260	11.25	7.38	4.87
15262	11.75	8.67	3.87
15264	12.25	13.83	1.99
15266	12.75	13.47	0.91
15268	13.25	15.18	2.43
15271	14	10.15	4.84
15273	14.5	11.15	4.21
15275	15	12.39	3.28

VAL	Medidos	Predichos Bin 40x40	RMSEP Bin40x40
15277	15.5	8.42	8.9
15279	16	10.31	7.15

Para estudiar el comportamiento del modelo PLS en muestras con niveles de contaminación creciente, se represento gráficamente el error de cada predicción (Figura 76).

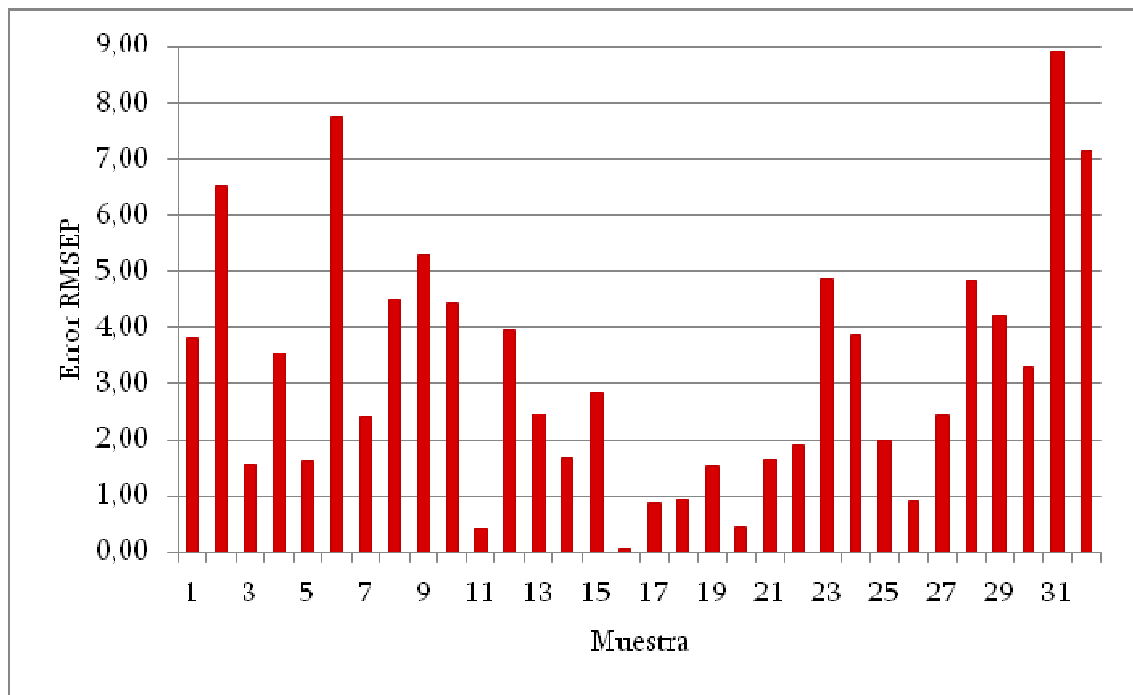


Figura 76. Errores de predicción para las muestras del colectivo VAL. En azul: errores de las muestras tratadas con Bin. En rojo: errores de las muestras tratadas con el uso del espectro medio.

De la Figura 76 se observa que aparentemente no hay relación entre las diferentes proporciones de harinas de pescado y vacuno y el error de predicción. Quizás se puede notar que, en la parte central del gráfico, es decir, para muestras cuyos valores de referencia es entre el 6 y el 10%, el error parece ser inferior. Sin embargo, tanto en el límite izquierdo (muestras con pequeños porcentajes de harina de vacuno) como en el límite derecho (muestras con un nivel de contaminación superior al 12%), los errores crecen alcanzando valores muy altos.

6.4. CONSIDERACIONES FINALES

En este capítulo se ha explorado la capacidad predictiva del análisis NIR-CI para detectar y cuantificar cantidades variables de contaminación de harinas de pescado con MBM. El enfoque para este tipo de estudio es bastante diferente al utilizado en el análisis discriminante. En este caso, se trata de cuantificar el nivel de contaminación en un único píxel y de asignarle un valor en base a variables continuas. Dividendo las muestras del colectivo de calibración según su contenido de MBM, en cuatro grupos, se alcanzaron buenos resultados en las predicciones. De esta forma, sin embargo, la exactitud de los modelos no podía ser superior al 4%. La aplicación de diferentes métodos cuantitativos llevó a elegir el algoritmo PLS como mejor candidato para construir modelos que permitieran predecir el nivel de contaminación de los píxeles de una muestra con una mayor exactitud. La aplicación de un modelo PLS creado con los píxeles de un colectivo CAL fue utilizado para predecir el porcentaje de harina de vacuno presente en los píxeles de muestras desconocidas. Se ha demostrado que el uso de tratamiento de Bin 40 x40, generando $N = 35$ espectros por muestra es el que proporciona los mejores resultados en términos de RMSEP y r^2 . Los errores de predicción de las muestras, sin embargo, resultaron ser altos (RMSEP= 2.18) y no mejoraron sustancialmente los resultados obtenidos con el análisis discriminante.

6.5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] De la Haba, M.J. (2006). Trazabilidad de los productos de origen animal no destinados al consumo humano (SANDACH) mediante el uso de la tecnología NIRS. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba.
- [2] Shenk, J., S., Workman, J.J., Westerhaus, M.O. (2001). Application of NIR Spectroscopy to Agricultural Products. Handbook of Near Infrared Analysis. Second Edition. Burns, D.A. y Ciurzac E.W. (Eds.). Practical Spectroscopy Series, Vol. 27. Marcel Dekker, USA.
- [3] Luypaert, J., Massart, D.L., Vander Heyden, Y. (2007). Near-infrared spectroscopy applications in pharmaceutical analysis. *Talanta*, 72 (3), 865-883.
- [4] Riccioli, C. Pérez-Marín, D. Guerrero-Ginel, J.E., Fearn, T., Garrido, A. (2010). Pure and mixed pixels analysis for the detection of MBM in animal byproduct feeds. Proceedings of the IASIM-10 Conference.
- [5] Williams, P.C., Norris, K. (2001). Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries, 2nd edition. American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul, Minnesota, USA, USA.
- [6] http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/tse_bse/docs/roadmap_2_es.pdf. Visitada el 20 de junio de 2011.

CAPÍTULO 7. COMPARACIÓN ENTRE NIR-CI Y NIRS CLASICA

7.1. OBJETIVOS

Una de las prerrogativas de la tecnología NIR-CI es su capacidad para clasificar muestras heterogéneas. En la revisión se ha puesto de manifiesto que esto es especialmente evidente en el caso de la teledetección donde, precisamente, la imagen hiperespectral de una zona geográfica viene clasificada en base a los distintos materiales, tipos de cultivo, características geológicas, etc., presentes en ella.

A través de la tecnología NIRS clásica las muestras se clasifican utilizando un espectro por cada observación. En el caso de muestras heterogéneas esta aproximación podría no ser adecuada, ya que un solo espectro tiene que representar las contribuciones de todas las sustancias puras presentes en la muestra. Los datos hiperespectrales de una muestra heterogénea, sin embargo, pueden contener una amplia variedad de espectros procedentes de constituyentes puros y mezclados, cuyas abundancias relativas son características únicas de la muestra. De este modo se pueden utilizar múltiples espectros de cada observación de una muestra para mejorar la clasificación de materiales heterogéneos.

En el desarrollo de esta tesis y particularmente del estudio de muestras binarias de harinas animales, se deduce que, para que los datos hiperespectrales sean más valiosos que un único espectro, hay que tener en cuenta ciertas características físicas de las muestras, como por ejemplo el tamaño de partícula y su relación con el tamaño del píxel.

En el caso de las harinas animales hay que considerar que estas, estando compuestas por partículas menores o iguales a 3 mm muy diferentes en su composición química, tienen características heterogéneas pero también homogéneas: partículas diferentes hacen que haya diferentes zonas en la imagen; por otro lado, el reducido tamaño de estas partículas

puede provocar que un píxel represente más de una partícula. De esta manera el espectro resultante ya no es puro en cuanto representa, al igual que en la espectroscopía NIR clásica, la mezcla de distintos materiales. En estos casos, surge la cuestión de si el uso de NIR-CI podría ser menos adecuado que la tecnología NIRS clásica, ya que esta última, además, de tener una mayor resolución espectral, es más económica en cuanto a la instrumentación requerida.

El objetivo del presente estudio es el de comparar las tecnologías NIR-CI y NIRS, para la clasificación de muestras de harinas de pescado (HP) puras y contaminada con niveles con harinas de rumiante (MBM).

Si bien en el capítulo 4 ha quedado puesto de manifiesto la ventaja del uso de la información procedente de las imágenes hiperespectrales, en el presente estudio se quiso comprobar la estas ventajas comparando datos reales procedentes de NIR-CI y NIRS. Hemos querido asimismo evaluar algunos algoritmos que la revisión realizada sugiere y que podrían ser adecuados en el análisis de muestras pulverulentas heterogéneas, donde la localización espacial de los espectros en cada imagen no es consistente (los componentes de una mezcla pulverulenta se localizan aleatoriamente en la imagen, así que muestras diferentes de la misma mezcla no tendrán la misma disposición espacial de sus partículas constituyentes), explotando la información espectral.

Una aproximación a este problema es la propuesta por Bharati et al. [1]. En su estudio los autores aplicaron un análisis por componentes principales (PCA) a los espectros de cada imagen, luego utilizaron los *loadings* de PC 1 de cada imagen como “vector descriptivo” para la clasificación final. Rutledge y Reedy [2] consideraron la reducción dimensional necesaria y representaron cada imagen con un vector que, de alguna manera, preservara la heterogeneidad de las muestras. Entre las diferentes estrategias propuestas, la que proporcionó el mejor resultado fue la creación de un “superespectro” formado por el espectro mediano unido al espectro del rango o amplitud intercuartili creado de la diferencia entre los espectros del primer y tercer cuartiles. Las dos entidades, cada una con el mismo número de variables, igual que en los espectros originales, fueron unidas para crear el superespectro.

Los dos métodos descritos arriba fueron empleados, en el presente estudio, para la construcción de modelos para cuantificar la contaminación por MBM en HP. Los resultados fueron comparados con los obtenidos mediante el uso del espectro medio, del espectro mediano y del espectro formado por los tres cuartiles de la imagen. El resultado de este estudio así como el del análisis discriminante (harina pura *vs* harina contaminada) fueron comparados con los modelos obtenidos con NIRS.

7.2. METODOLOGÍA

7.2.1 MUESTRAS

Para comparar el poder discriminante de las dos tecnologías se utilizaron 126 muestras experimentales, las mismas utilizadas en el estudio presentado en el capítulo 6 de esta memoria. También se utilizaron 62 muestras de HP del colectivo de muestras reales.

En el caso del análisis discriminante se procedió a la creación de un colectivo de calibración (CAL) y un colectivo de validación (VAL) seleccionando de manera aleatoria las muestras para incluir en los dos grupos. La distribución de los grupos está indicada en la Tabla 56.

Tabla 56. Distribución de las muestras para el análisis discriminante

	CAL	VAL	TOTAL
Class 1: HP	37	25	62
Class 2: Mezclas	63	63	126
Total	100	88	188

En la prueba desarrollada para la comparación de modelos cuantitativos se utilizaron exclusivamente muestras experimentales dividiendo de manera aleatoria el colectivo CAL (94 muestras) del colectivo VAL (32 muestras) procurando que ambos colectivos presentaran muestras con niveles de contaminación de harina de rumiante desde el 0.25% al 16%.

7.2.2. INSTRUMENTACIÓN Y SOFTWARE

Las muestras fueron analizadas espectralmente con el sistema NIRS y con NIR-CI. Para el análisis NIRS se utilizaron dos tipos de capsulas portamuestras distintas: una cápsula circular de 3.75 cm de diámetro y una cápsula rectangular, denominada de “1/4”, con las dimensiones de 4.6 x 5.7 cm. Ambas presentaciones de muestras fueron analizadas en el equipo monocromador FOSS NIRSystem 6500 SY-II (Silver Spring, MD, USA), equipado con módulo de transporte que realiza medidas en reflectancia en la región espectral comprendida entre 400 y 2500 nm (cada 2 nm). Los valores de absorbancia fueron recogidos como $\text{Log}(1/R)$. Las distintas tipologías de cápsulas portamuestras utilizadas en el presente trabajo son las disponibles para el análisis de productos sólidos con el equipo NIRS de estas características.

La recogida de los espectros se realizó con el programa WINISI II ver. 1.5 (Infrasoft International, Port Matilda, PA), de forma que cada espectro fuera obtenido del promedio de 64 analisis: 16 analisis de la referencia interna del instrumento, 32 analisis de la muestra y, finalmente, 16 escaneos de la referencia. Se registraron dos repeticiones por cada muestra. Teniendo en cuenta que el instrumento NIRSystem 6500 SY-II no tiene módulo de giro, para el análisis de las muestras presentadas en la cápsula circular se tomaron dos espectros diferentes. El primero en la posición A (Figura 77) y el segundo en la posición B, rotando manualmente la cápsula 90 grados entre un escaneo y otro.

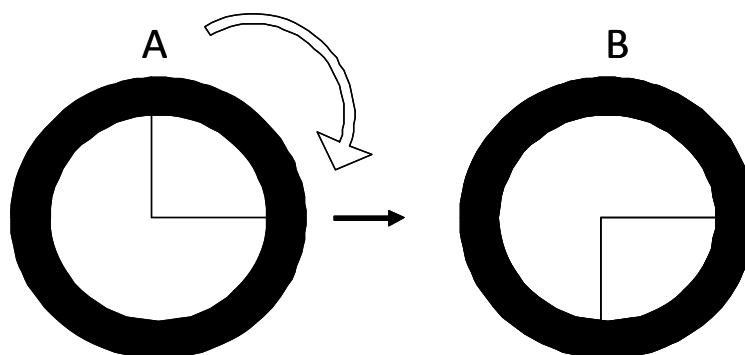


Figura 77. Escaneos de las cápsulas circulares. A. posición inicial. B: posición después de rotación de 90 grados.

Los espectros fueron transformados de manera que tuvieran un formato reconocible para el programa MatLab R2008a (The Mathworks, MA, USA). Este último fue utilizado para el tratamiento quimiométrico de los datos.

El análisis NIR-CI fue desarrollado utilizando la cantidad de 1 g. por cada muestra. No se realizaron repeticiones. Las condiciones de iluminación, el portamuestras, así como la frecuencia del análisis de las referencias fueron establecidas en base a las indicaciones mostradas en el capítulo 2 de esta memoria. Las muestras fueron analizadas por el instrumento MatrixNIR (Malvern Instruments, Maryland, USA) y las imágenes resultantes fueron exportadas al programa ISYS 4.0 (Malvern, Inc., Olney, MD, USA), donde se procedió con el mismo protocolo utilizado en los anteriores capítulos.

7.2.3. ANÁLISIS DISCRIMINANTE

Para la creación de los modelos discriminantes en NIRS se utilizaron tanto el programa WINISI II ver. 1,50 (Infrasoft International, Port Matilda, PA) como el programa MatLab R2008a (The Mathworks, MA, USA). En WINISI se utilizó el análisis discriminante basado en el algoritmo de regresión PLS2. Esta herramienta permite generar varias variables discriminatorias correspondientes a las clases existentes en el colectivo de calibración [3, 4]. En este caso, habiendo dos clases (HP pura y HP mezclada con harina de rumiante), la variable fue la pertenencia o no a la clase y se utilizan variables ficticias (*dummy*) de forma que a la pertenencia a una clase se le asigne el valor 2 mientras que a su no pertenencia se le asigne el valor 1. El algoritmo PLS2 incorpora el factor de incertidumbre que está relacionado con el estadístico *T de Student* para un número de grados de libertad igual a infinito. El valor de incertidumbre en este caso fue de 1,5 que corresponde con la probabilidad asociada al 95% [5]. Se definieron 4 grupos de validación cruzada y se utilizó la región espectral comprendida entre 1000 y 1700 nm (cada 10 nm) para adaptar los espectros al rango disponible para el análisis NIR-CI. Los espectros fueron tratados con SNV, DT y diferentes tratamientos de primera y segunda derivada 1.5.5, 2.5.5, 1.10.5 y 2.10.5; donde el primer número indica el orden de la derivación, el segundo número es la amplitud o distancia entre los segmentos de derivación y el tercer número es la longitud del segmento a ser suavizado. Para la

determinación del número óptimo de términos de la regresión el programa WINISI empleó validación cruzada. En este procedimiento, de manera similar al sistema utilizado por el programa MatLab, se realizan diferentes repeticiones, escogiendo en cada uno un colectivo de calibración y otro de validación a partir del colectivo global considerado para la obtención del modelo discriminante. En cada iteración se realiza una ecuación con n términos, desde 1 hasta el máximo seleccionado. Finalmente el programa encontró una ecuación tal que el error típico de validación cruzada (RMSECV) sea mínimo.

Los espectros procedentes del análisis NIRS fueron analizados también con el programa MatLab para poder comparar más fácilmente los resultados con los del análisis NIR-CI. Para la creación del modelo se utilizó la función PLSDA, también descrita en el capítulo 1 de esta memoria. El algoritmo PLSDA, al igual que el algoritmo PLS2 del programa WINISI, parte de la realización de un modelo PLS para reducir la dimensión de la matriz y establecer las fronteras entre las clases. Luego hace un análisis discriminante y clasifica las nuevas muestras según el modelo creado. Para obtener un código de identidad de las clases usa como matriz Y (variables dependientes), una matriz de variables ficticias (*dummy*), la cual describe la pertenencia de cada muestra del conjunto de calibración a una clase. A partir de esta matriz de variables *dummy* se crea un modelo PLS con variables binarias para cada clase como respuesta. Su función es identificar variables latentes características que puedan ser utilizadas para integrar las muestras a una clase. Con el modelo encontrado se realizó una predicción para el conjunto de muestras a clasificar. Calculándose un umbral de clasificación para cada clase, pertenecerán a ella, las muestras cuyos valores de Y estén por encima de ese umbral. A diferencia del PLS2, dicho umbral es calculado usando la distribución observada de los valores predichos y estadísticos bayesianos, como descrito en el capítulo 1 de este documento.

Para la validación cruzada se utilizó el método de selección al azar de cuatro grupos, cada uno de los cuales validó en diferentes repeticiones las ecuaciones desarrolladas con el resto de las muestras. Todos los modelos seleccionados fueron evaluados con un colectivo de validación externa compuesto por 88 muestras e independiente del colectivo inicial empleado para el desarrollo de los mismos. Los estadísticos utilizados para evaluar la bondad de los modelos fueron sensibilidad y especificidad en calibración (CAL),

validación cruzada (VAL) y validación del colectivo externo (PRED), y los errores de clasificación tanto en VAL como en PRED.

7.2.4. ANÁLISIS CUANTITATIVO

Para el desarrollo de las ecuaciones de calibración de los datos procedentes del análisis NIRS se utilizó tanto el programa WINISI como MatLab. En WINISI se utilizó MPLS (Regresión en Mínimos Cuadrados Parciales Modificada), junto con validación cruzada para la selección del número óptimo de términos de la regresión y la estima de la capacidad predictiva de las calibraciones. En la regresión MPLS, los residuos NIR a cada longitud de onda, obtenidos después de calcular cada factor, son estandarizados (divididos por la STD de los residuos a esa longitud de onda) antes de calcular el siguiente factor [3].

En el programa MatLab se utilizó el algoritmo SIMPLS, versión modificada del algoritmo PLS, que se basa en la ortogonalización de una secuencia de Krylof para calcular los pesos del modelo [6]. Este algoritmo determina el número óptimo de variables latentes realizando una validación cruzada en la que calcula el error cuadrático medio (RMSECV) con un número creciente de variables latentes. Los datos NIR-CI fueron tratados con el programa MatLab utilizando el mismo algoritmo de regresión. Los estadísticos empleados para la evaluación de las ecuaciones de calibración fueron:

- r^2 en CAL, VAL y PRED para estudiar la variación que puede ser explicada para el modelo.
- RMSEC (error típico de calibración), RMSECV (error típico de validación cruzada) y RMSEP (error típico de predicción del colectivo externo) para estimar la capacidad predictiva de las ecuaciones.
- Bias (sesgo) en PRED para representar la diferencia sistemática media entre los datos de referencia y los valores predichos NIRS o NIR-CI. Windham et al. [7] establecen el valor límite para el Bias mediante la expresión $0.60 \times \text{RMSECV}$.

En el caso de los datos NIR-CI, además del espectro medio de cada muestra, también se estudiaron:

- Espectro mediano calculado a partir de los 60480 espectros de cada imagen. De aquí en adelante llamado EM.
- “Superespectro” formado por el espectro mediano del primer cuartil (mediana de la primera mitad de los valores, Q1) + espectro mediano del segundo cuartil (la propia mediana de la serie, Q2) + espectro mediano del tercer cuartil (la mediana de la segunda mitad de valores, Q3) por un total de $71 \times 3 = 213$ variables por cada muestra. De aquí en adelante llamado QS.
- “Superespectro” formado por el espectro mediano + el rango intercuartil (diferencia entre Q3 y Q1) por un total de $71 \times 2 = 142$ variables por cada muestra. De aquí en adelante llamado EMIQ.
- “Superespectro” formado por los *loadings* de los primeros tres PCs de cada muestra. De aquí en adelante llamado 3PCS.

7.3. RESULTADOS

El cálculo del espectro medio de las harinas puras y de las mezclas permitió analizar visualmente las diferencias entre las respuestas espectrales del espectrómetro NIRS y de la cámara NIR-CI.

En la Figura 78 se muestran los espectros.

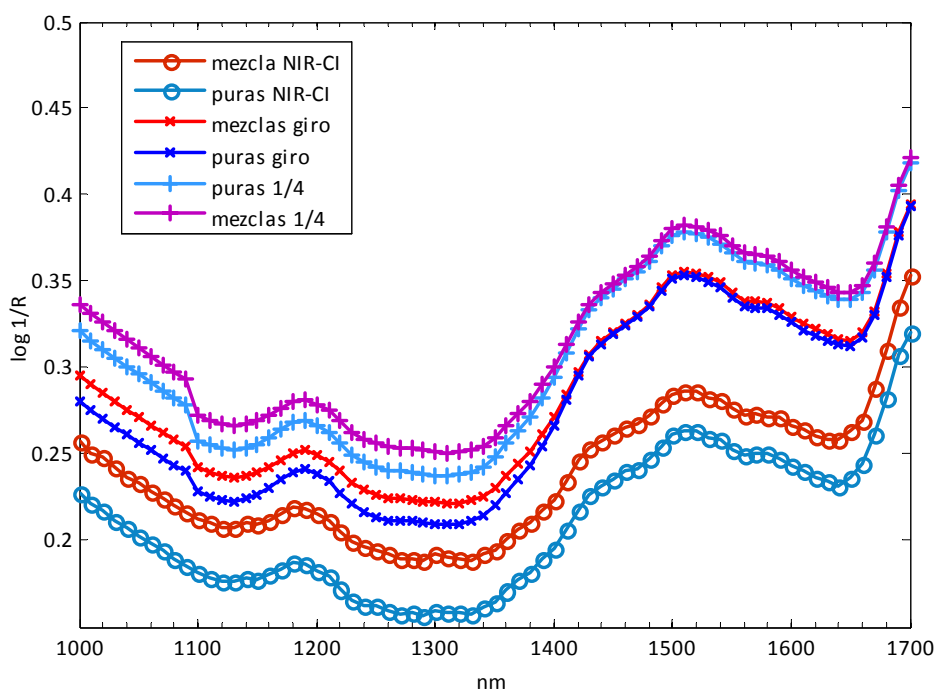


Figura 78. Espectros medios ($\log 1/R$) del colectivo CAL en NIRS y NIR-CI

Todos los espectros muestran máximos alrededor de 1200 y 1500 nm. Los espectros NIRS de las dos clases (puras y mezclas) resultan más parecidos entre ellos respecto a los espectros NIR-CI, sobretodo en la región entre 1350 y 1700 nm. También se observa que los valores de absorbancia de los espectros NIRS son más altos que los valores de los espectros NIR-CI. Esto podría ser debido, entre otros motivos, a diferencias en la configuración óptica de los dos tipos de instrumentos. Entre los espectros de las harinas puras y los espectros de las harinas mezcla no se notan diferencias visibles en cuanto a la forma del espectro. En la zona de 1100 nm los espectros NIRS presentan una zona cortada debida a que, en esta longitud de onda, el monocromador FOSS NIRSystem

cambia de detector. El espectro medio de las mezclas tiene valores de absorbancia más altos que el espectro de las harinas puras tanto en NIRS como en NIR-CI. Dado que el espectro NIR de una muestra puede estar afectado por muchos factores relacionados con las características físicas del instrumento o de las muestras, se aplicó una combinación de pretratamientos espectrales a todos los espectros NIRS y NIR-CI. Como se ha indicado en el apartado de 7.2.2. de este capítulo, para una mejor comparación entre NIRS y NIR-CI se decidió no eliminar *outliers* espectrales de los colectivos.

7.3.1 COMPARACIÓN BASADA EN LA DETECCIÓN DE HARINAS DE RUMIANTES EN MEZCLAS

En el caso del análisis cualitativo, se eligió el mismo conjunto de pre-tratamientos para los tres grupos de datos: SNV, DT y derivada segunda (5.5.2).

La Figura 79 muestra los valores de discriminación para las muestras del colectivo de calibración (CAL) y de validación (VAL). Las muestras de HP puras tienen valores alrededor de 1 mientras que las muestras de harinas mezcladas (Mezclas) tienen valores alrededor de 0.

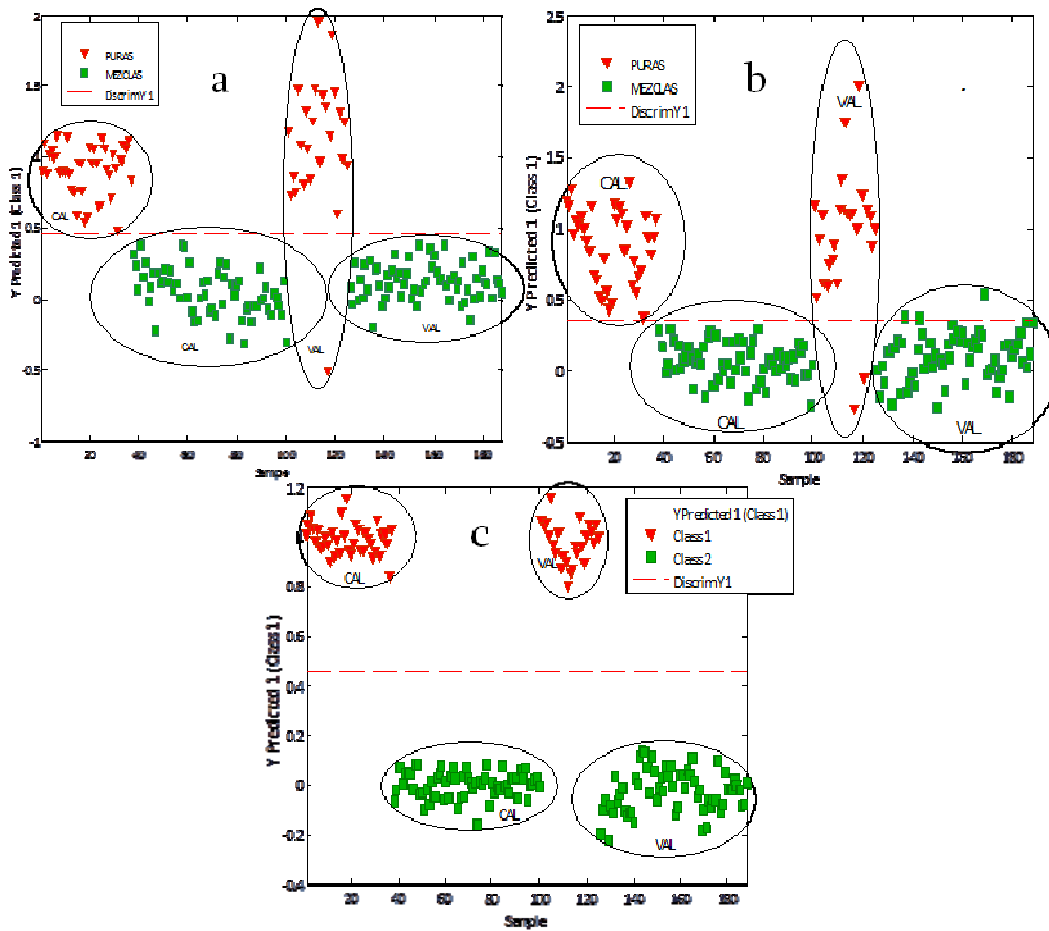


Figura 79. Clasificación de las muestras en calibración y validación externa en la discriminación NIRS y NIR-CI entre dos grupos.

Los resultados relativos al cálculo de los parámetros de sensibilidad, especificidad y error de clasificación en calibración, validación cruzada y predicción del colectivo externo se muestran en la Tabla 57.

Tabla 57. Detalles de los modelos cualitativos creados con datos NIRS utilizando la cápsula de giro, datos NIRS utilizando la cápsula de 1/4 y datos NIR-CI.

	NIRS GIRO**	NIRS 1/4**	NIR-CI**
Num. VLS	10 (86.15%*)	8 (81.59%*)	7 (98.70%*)
Clases	class 1 (puras), class 2 (mezclas)		
Sens. (Cal) class 1	1.000	1.000	1.000
Sens. (Cal) class 2	1.000	1.000	1.000
Espec. (Cal) class 1	1.000	1.000	1.000

	NIRS GIRO**	NIRS ¼**	NIR-CI**
Num. VLs	10 (86.15%*)	8 (81.59%*)	7 (98.70%*)
Clases	class 1 (puras), class 2 (mezclas)		
Espec. (Cal) class 2	1.000	1.000	1.000
Sens. (C V) class 1	0.892	0.946	1.000
Sens. (C V) class 2	1.000	1.000	1.000
Espec. (CV) class 1	1.000	1.000	1.000
Espec. (CV) class 2	0.892	0.946	1.000
Sens. (Pred) class 1	0.960	0.920	1.000
Sens. (Pred) class 2	1.000	0.952	1.000
Espec. (Pred) class 1	1.000	0.952	1.000
Espec. (Pred) class 2	0.960	0.920	1.000
Class. Err (Cal)	0.000	0.000	0.000
Class. Err (CV)	0.054	0.027	0.000
Class. Err (Pred)	0.020	0.064	0.000

* % varianza capturada por el modelo

** Los resultados obtenidos con MatLab para los datos NIRS coincidieron con los obtenidos por el programa WINISI por lo que se decidió presentar en esta memoria los resultados de los algoritmos presentes en MatLab.

Tanto de la representación gráfica como de los valores de los parámetros de los modelos, se nota que, en general, los espectros clasifican con una alta exactitud las harinas discriminando, en el caso de NIR-CI la totalidad de muestras de HP de las harinas Mezclas. En el caso de NIRS con cápsula de giro solamente una muestra de HP pura del colectivo VAL fue incorrectamente clasificada como Mezcla. Entre las muestras de harinas analizadas por NIRS con cápsula de 1/4, dos muestras de HP fueron clasificadas como Mezclas y tres muestras de Mezclas fueron clasificadas como HP. Las tres muestras del colectivo VAL incorrectamente clasificadas tenían un porcentaje de MBM del 3.25, 4.75 y 11% respectivamente. Muestras con porcentajes inferiores de MBM (del 0.25%) fueron correctamente clasificadas así que se puede pensar, por lo menos en el caso de la muestra con un nivel de contaminación por MBM del 11%, que haya habido alguna incidencia durante la adquisición de su espectro.

El porcentaje de muestras correctamente clasificadas en NIR-CI fue del 100% demostrando que esta tecnología proporciona un alto potencial para la detección de contaminaciones a niveles de hasta 10 g de MBM en 4 kg de HP. El estudio de las variables que más influyen en la discriminación (VIP), dio resultados contrastantes en NIRS y en NIR-CI como se aprecia en la Figura 80.

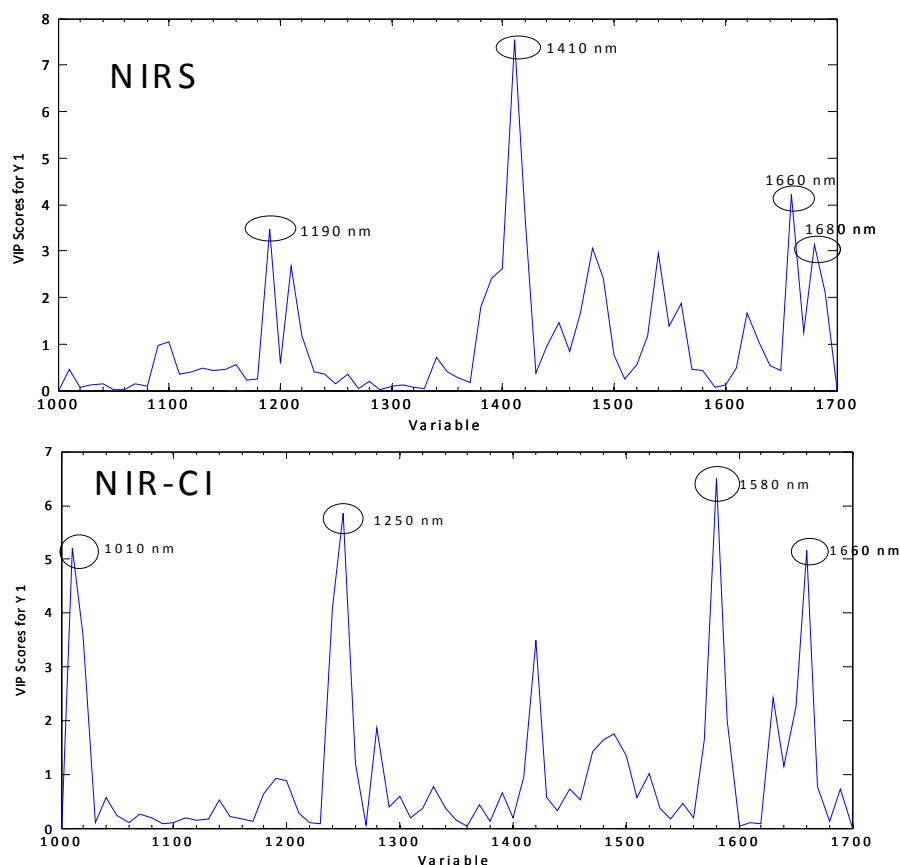


Figura 80. VIP de las variables espectrales en NIRS y NIR-CI para la discriminación entre harinas puras y mezclas.

La longitud de onda de 1660 nm fue la única variable importante común en la discriminación en NIRS y en NIR-CI. En NIRS predominó la longitud de onda de 1410 nm, mientras que en NIR-CI las regiones de 1580 y 1250 nm. La longitud de onda de 1010 nm parece ser clave en la discriminación entre harinas puras y mezclas en NIR-CI mientras que en NIRS esta misma longitud de onda tiene un valor inferior a 1, límite debajo del cual los predictores no son considerados importantes. Estos resultados reflejan diferencias importantes entre los espectros obtenidos con NIRS y NIR-CI. En efecto,

asociar el uso del espectro medio de una imagen hiperespectral con el espectro NIRS de una muestra no es tan automático como podría parecer. Las diferencias en los tipos de detectores, la presentación de la muestra, la iluminación, etc., hacen que las respuestas espectrales de los dos sistemas sean diferentes entre ellas, como confirma el análisis visual de los valores de absorbancia mostrado en la Figura 78. Además, el espectro medio de una imagen NIR refleja la contribución de todos los píxeles de la superficie contrariamente a la respuesta espectral NIRS.

7.3.2. COMPARACIÓN BASADA EN LA CUANTIFICACIÓN DE HARINAS DE RUMIANTES EN MEZCLAS

El resultado obtenido del análisis cuantitativo del colectivo de muestras experimentales mostró un comportamiento diferente con respecto al análisis cualitativo: las predicciones de los modelos creados con los espectros NIRS fueron mejores que las obtenidas con NIR-CI (Tabla 58).

La Figura 81 muestra los valores predichos NIRS y NIR-CI (en modalidad “espectro medio” y “espectro mediano”) frente a los valores de referencia del colectivo de calibración (CAL) y de validación externa (VAL) obtenidos para la predicción del contenido de harina de rumiante en mezclas.

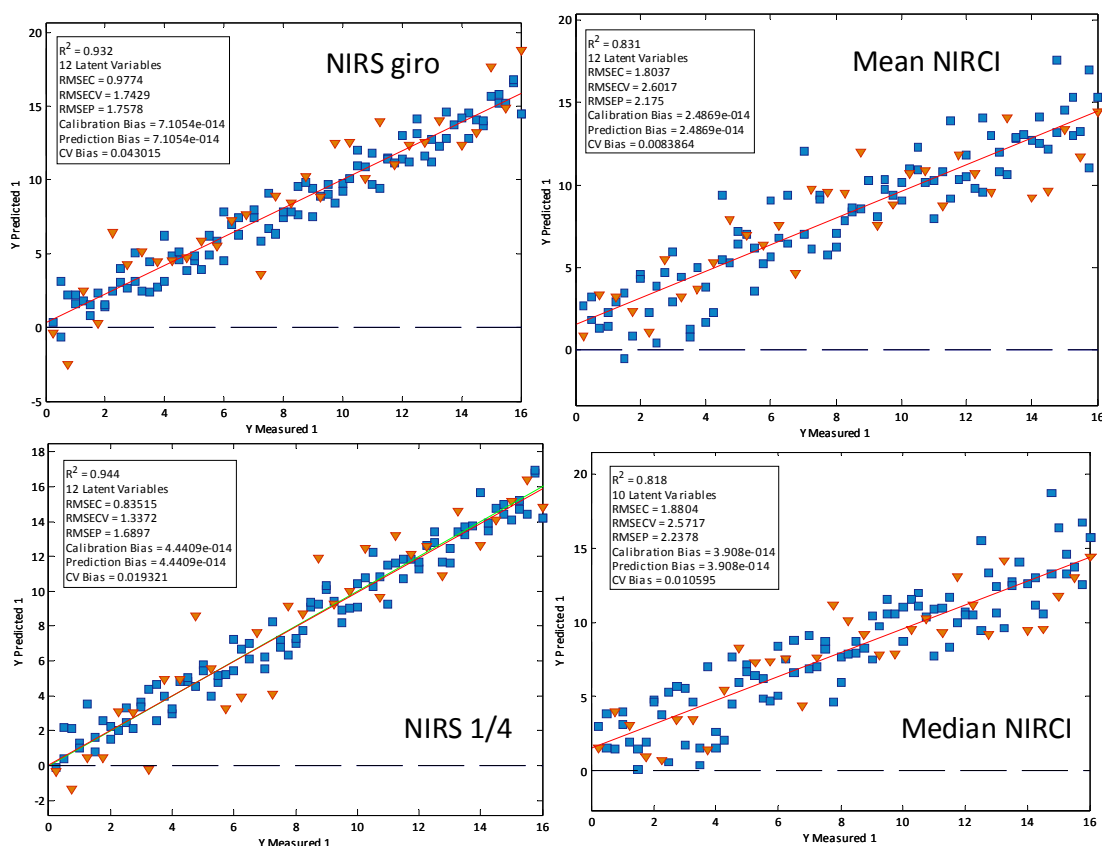


Figura 81. Valores predichos NIRS y NIR-CI vs. valores de referencia de los colectivos CAL (cuadrados azules) y VAL (triángulos naranjas) para la predicción del contenido de harina de rumiante.

Tabla 58. Estadísticas de calibración para la de diferentes porcentajes de MBM en harinas de pescado. utilizando la cápsula de giro, cápsula de 1/4 y datos NIR-CI con espectro medio, espectro mediano, espectros del 1°, 2° y 3° cuartil, espectros mediano+espectros intercuartiles y espectros de los primeros 3 loadings. (Página siguiente)

	NIRS GIRO	NIRS 1/4	NIR-CI media	EM	QS	EMIQ	3PCS
Pretratamiento	DT, SNV, 2nd derivative (5,5)		2nd derivative (9,2), <i>Mean Center</i>		SNV, DT, 2nd derivative (9,2), <i>Mean Center</i>		DT, SNV, <i>Mean Center</i>
Num. VLs	12 (95.50%*)	12 (96.72% *)	12 (84.69%*)	10 (83.36%)	12 (87.40%*)	12(90.39%*)	9 (51.38%)
RMSEC	0.98	0.84	1.80	1.88	1.64	1.43	3.21
RMSECV	1.74	1.34	2.60	2.57	2.50	2.54	4.71
RMSEP	1.76	1.69	2.11	2.24	2.42	2.31	5.05
Pred Bias	0.45	-0.05	-0.12	-0.34	-0.14	0.08	-0.68
r ² Cal	0.96	0.97	0.85	0.83	0.87	0.90	0.51
r ² CV	0.86	0.92	0.69	0.69	0.71	0.70	0.15
r ² Pred	0.89	0.90	0.79	0.78	0.74	0.76	0.14

* % de varianza capturada por el modelo.

Analizando los resultados obtenidos de la evaluación de los dos modelos creados con datos NIRS y de los cinco modelos creados con los datos NIR-CI, se pueden hacer varias observaciones. La primera, y la más evidente, es la neta superioridad predictiva de los modelos NIRS con respecto a los modelos NIR-CI. Esta observación lleva a una importante reflexión: el análisis NIR-CI con propósitos de cuantificación en harinas animales no es tan viable como el análisis NIRS clásico. El hecho de que las harinas analizadas sean compuestas por partículas que se mezclan entre ellas cada vez que se recoje una muestra, hace que sea difícil hacer una aproximación cuantitativa. Se puede poner el ejemplo de una caja de caramelos blancos donde hay algunos de color rosa. Cada vez que se abra la caja después de haberla removido, en la superficie aparecerá una proporción diferentes de caramelos blancos y rosas. Es necesario, por lo tanto, hacer una aproximación haciendo varias observaciones y mediando los resultados.

En una muestra no pulverulenta, sin embargo, se podría aplicar un análisis discriminante y sucesivamente calcular el número de píxeles pertenecientes a una determinada clase para cuantificarla. En definitiva, se puede afirmar que, sin unas coordenadas espaciales que caractericen la muestra en examen, no es posible hacer buenas predicciones cuantitativas. Sin embargo, una aproximación cuantitativa sigue siendo complicada en muestras compactas dado que los espectros obtenidos con un instrumento NIR-CI proporcionan información relativa a la superficie de la muestra, siendo la penetración de la radiación prácticamente insignificante, como sugiere Amigo [8]. Así, la concentración de los componentes obtenida en la superficie de una muestra no es representativa de la concentración de la muestra entera. Una posible solución es analizar varias muestras del mismo material, aunque este procedimiento amplíe los tiempos de análisis y produzca enormes cantidades de datos difíciles de manejar.

El análisis VIP en la cuantificación de MBM presente en Mezclas mostró nuevamente un comportamiento desigual entre NIRS y NIR-CI (Figura 82).

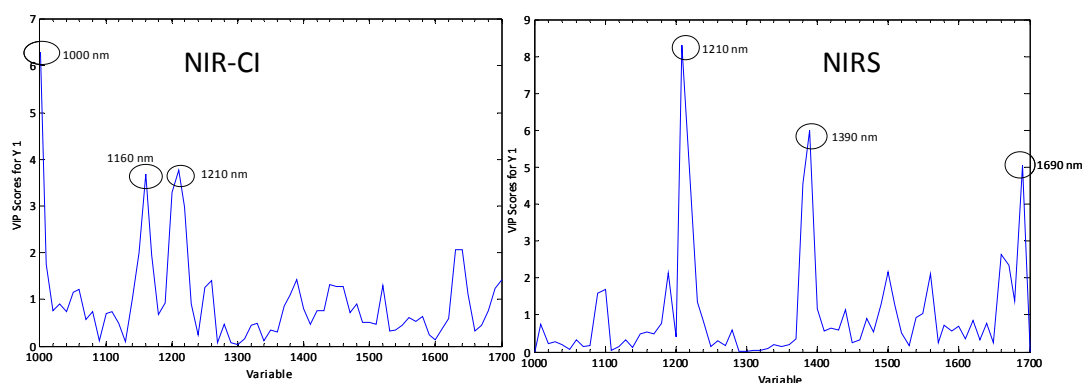


Figura 82. VIP de las variables espectrales en NIRS y NIR-CI para la cuantificación de la harina de rumiante en mezclas.

Del análisis de las variables que más influyen en la predicción cuantitativa cabe destacar que en NIR-CI la zona alrededor de 1000 nm sigue teniendo un peso notable como ocurría en el análisis cualitativo. La variable 1210 nm es común a NIRS y NIR-CI y es una variable frecuentemente citada en esta memoria por sus características discriminatorias. Las variables importantes en NIRS coinciden prácticamente con las encontradas en el análisis cualitativo.

Analizando por separado los resultados de NIRS y los de NIR-CI, hay que evidenciar que, contrariamente al resultado del análisis cualitativo, en el caso de los datos NIRS, el uso de la cápsula de 1/4 incrementó la exactitud de las predicciones con respecto al uso de la capsula de giro. Los valores de r^2 obtenidos con la cápsula de 1/4 fueron excelentes en validación cruzada y elevados en la predicción del colectivo externo.

Con respecto a los resultados del análisis NIR-CI, hay que destacar que los resultados obtenidos con el espectro medio, el EM, el QS y el EMIQ fueron parecidos en términos de RMSECV y RMSEP con valores alrededor de 2.5 en todos los casos. Los valores de r^2 también fueron parecidos entre ellos encontrándose el valor más bajo en validación cruzada con el uso del espectro medio ($r^2 = 0.69$) y el valor más alto en la predicción del colectivo VAL también con el uso del espectro medio ($r^2 = 0.79$). En general, el uso del espectro medio proporcionó resultados mejores que el uso del espectro mediano. Esto puede ser debido a que la mediana, como medida de una distribución, es menos influenciada que la media por los valores extremos. Estos valores, en el caso de harinas

contaminadas, pueden representar la misma contaminación que se está investigando y, por esto es importante tenerlos en cuenta. Por esta razón se decidió estudiar otros métodos basados en medidas de posición no central como el primer y tercer cuartil y el rango intercuartil.

La Figura 83 muestra los espectros QS y EMIC después de tratamiento espectral (SNV, DT, derivada segunda 9.9.2) con las respectivas predicciones en términos de valores predichos vs. valores de referencia.

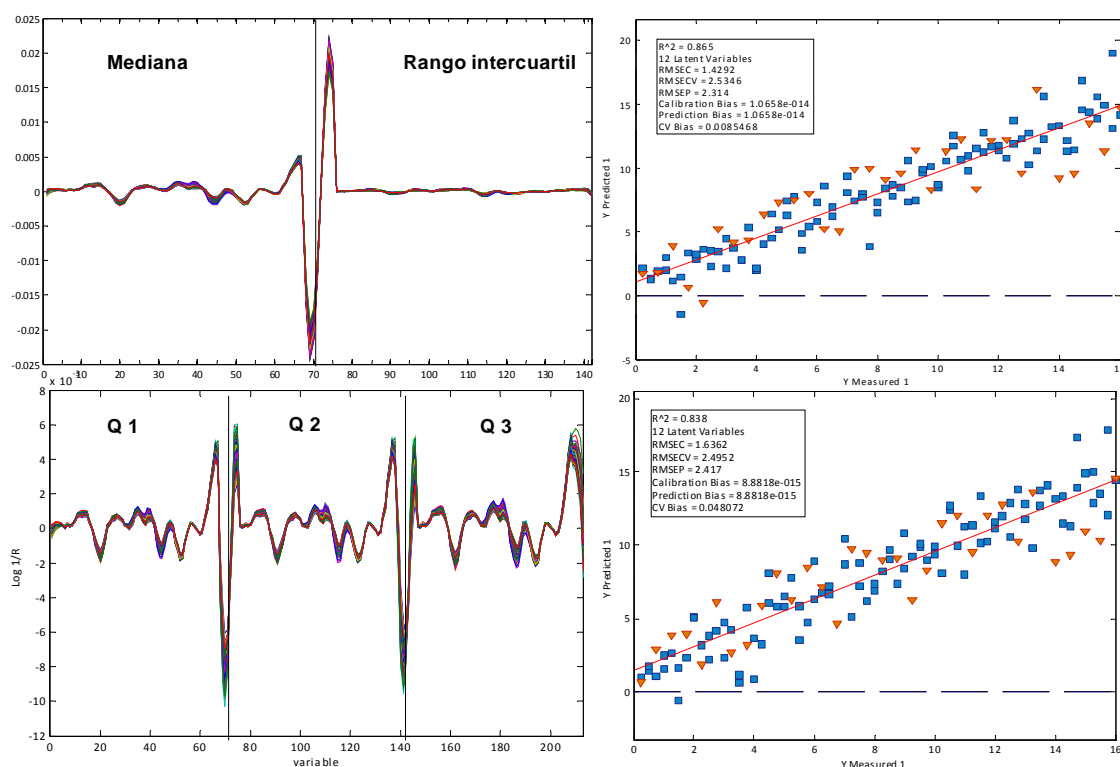


Figura 83. Izquierda: “superespectros” QS (arriba) y EMIC (abajo) de las muestras del colectivo CAL. Derecha: valores predichos NIR-CI vs. valores de referencia de los colectivos CAL (cuadrados azules) y VAL (triángulos naranjas).

Los mejores resultados en validación cruzada se obtuvieron con el uso de QS mientras que, el EMIC dio mejores resultados a la hora de predecir las muestras del colectivo VAL, aunque las diferencias en términos de RMSECV, RMSEP y r^2 fueron muy pequeñas. Ambos métodos no aportaron mejoras significativas al uso del espectro medio. Con respecto al uso de 3PCS, los resultados obtenidos fueron pobres teniendo en cuenta que el r^2 no llegó al 0.4 y que el error de predicción RMSEP superó $N = 5$.

La Figura 84 recoge los estadísticos del modelo así como los valores predichos frente a los de referencia.

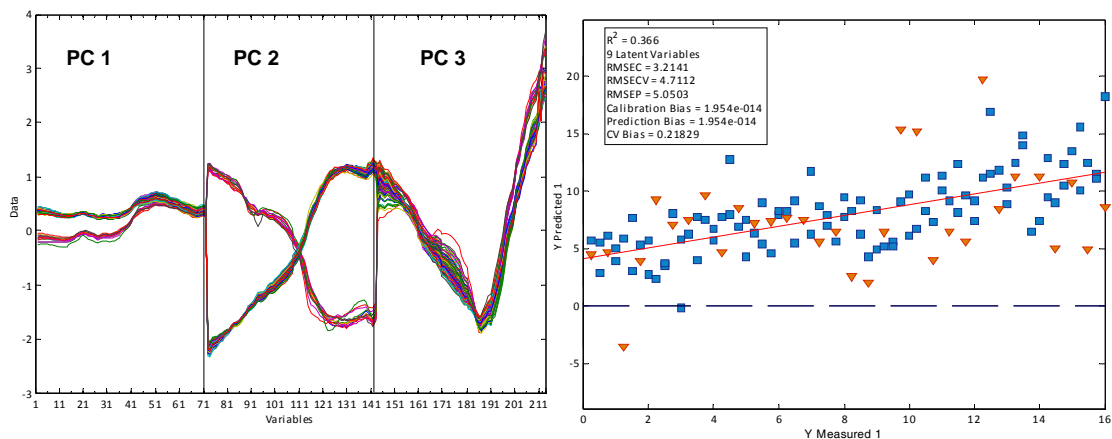


Figura 84. Izquierda: “superespectros” 3PCS de las muestras del colectivo CAL. Derecha: valores predichos NIR-CI vs. valores de referencia de los colectivos CAL (cuadrados azules) y VAL (triángulos naranjas).

La probable causa de los escasos resultados podría ser que los primeros tres componentes principales de los espectros de una imagen no capturan suficiente información acerca de las especies animales que componen las mezclas. Desde este punto de vista, no hay una clara solución al problema ya que, por cuestiones de insuficiencia de memoria para los cálculos, no ha sido posible añadir la información relativa a otros componentes principales. Examinando los espectros 3PCS se observó una interesante separación en los *loadings* del primer y segundo PC, entre dos grupos de espectros. En el PC 2 esta separación es muy evidente y los dos grupos tienen espectros especulares entre ellos. Sería interesante estudiar la causa de esta diferencia que, evidentemente, no se encuentra en el nivel de contaminación por parte de harina de rumiante.

7.4. CONSIDERACIONES FINALES

Con este estudio se han querido comparar las capacidades predictivas de las tecnologías NIRS y NIR-CI para análisis cualitativo y cuantitativo de harinas animales. Los resultados obtenidos aportan importantes informaciones, por un lado, sobre el alto poder discriminante de la tecnología NIR-CI que confirma su viabilidad como técnica de detección, por otro lado, la escasa capacidad de esta tecnología como método cuantitativo.

El uso del espectro medio así como del espectro mediano de una imagen es claramente limitante en cuanto a la información proporcionada de una imagen. Sin embargo, el uso de espectros que fueran más informativos y que consideraran la aportación de todos los píxeles no mejoró las prestaciones cuantitativas. Los mejores resultados para el análisis cualitativo han sido obtenidos utilizando los espectros procedentes del análisis NIR-CI mientras que las mejores predicciones cuantitativas se obtuvieron con NIRS.

Una conclusión preliminar es que, como se ha mencionado al principio del capítulo, la causa del escaso poder predictivo en cuantificación reside en la conformación física de las muestras analizadas.

7.5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Bharati, M.H., MacGregor, J. F., Champagne, M. (2004). Using near-infrared multivariate image regression techniques to predict pulp properties”, TAPPI Journal, 3, 4. 1-7.
- [2] Rutledge, H.T. & Reedy, B.J. (2009). Classification of heterogeneous solids using infrared hyperspectral imaging. Applied Spectroscopy, vol. 63, no. 2, pp. 172-179.
- [3] Shenk, J.S. and Westerhaus, M.O. (1995). Routine Operation, Calibration, Development and Network System Management Manual. NIRSystems, Inc., Silver Spring, MD, USA.
- [4] Naes, T., Isaksson, T., Fearn, T. and Davies, T. (2002). A User-friendly guide to multivariate calibration and classification. NIR Publications, Chichester, UK.
- [5] Pérez Marín, D.C. (2005). Tecnología NIRS para la certificación y trazabilidad de piensos compuestos. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.
- [6] De Jong, S. (1993) SIMPLS: an alternative approach to partial least squares regression. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 18, 251–263.
- [7] Windham, W.R., Mertens D.R., Barton II F.E. (1989) Protocol for NIRS calibration: sample selection and equation development and validation In: G.C. Marten, J.S. Shenk and F.E. Barton II, Editors, Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS): Analysis of forage quality, United States Department of Agriculture, Springfield, VA, USA, pp. 96–103.
- [8] Amigo, J.M. (2010). Practical issues of hyperspectral imaging analysis of solid dosage forms. Anal.Bioanal.Chem. 398, 93-109.

CONCLUSIONES E INVESTIGACIÓN FUTURA

En la presente tesis se estudió el uso de la tecnología NIR-CI para la detección de las distintas especies animales presentes en harinas proteicas de origen animal.

De acuerdo con los resultados encontrados se puede decir que el análisis de imágenes híperespectrales procedente de SPOAs permite identificar y cuantificar las distintas especies animales que conforman las harinas.

El capítulo 1 nos ha permitido conocer el estado actual del uso de sensores hiperspectrales en el campo agroalimentario y asimismo, el detectar que no existen investigaciones previas que muestren el potencial de los mismos para el tema objeto de estudio en esta Tesis. Los ensayos recogidos en el Capítulo 2, relativos a la optimización de las condiciones operativas permiten resaltar la importancia de la puesta a punto de las condiciones externas de cara a la obtención de imágenes repetitivas y de calidad. Estos resultados podrían ser extrapolados en forma de manual de instrucciones (protocolo) para los usuarios del instrumento Matrix-NIR. La identificación de los elementos que más afectan a la obtención de una imagen hiperespectral de una muestra es la clave para la estandarización del análisis y para eliminar las posibles fuentes externas de variabilidad y aumentar la calidad de las imágenes hiperespectrales. Los parámetros optimizados en el Capítulo 2 de esta tesis han servido de base para alcanzar los resultados del siguiente estudio (Capítulo 3) donde se ha tratado de profundizar en los aspectos de la mejora en la repetibilidad espectral. Este estudio permitió determinar las principales fuentes de variabilidad espectral presente en una imagen hiperespectral. Los resultados más destacados son los inherentes a la relación entre la variabilidad inter-píxeles, inter-replicas, inter-muestras e inter-especies.

Una vez optimizados los parámetros necesarios para la correcta adquisición de imágenes hiperespectrales, se estudiaron los posibles métodos de compresión/reducción de datos en vista de crear una amplia base de datos de imágenes relativas a las muestras disponibles de harinas animales. El método de selección de píxeles representativos elegido en el Capítulo 4 fue utilizado en el siguiente capítulo para discriminar entre

especies animales terrestres (rumiantes *vs.* cerdo *vs.* ave). Una vez comprobado el potencial de NIR-CI en análisis discriminante, se estudió su posible uso para la cuantificación de una determinada especie en una mezcla. Finalmente, se compararon tanto el poder discriminante como cuantitativo de NIR-CI frente al análisis NIRS clásico.

Las principales conclusiones a las que se ha llegado a través de los resultados obtenidos son los siguientes:

- 1) Se han desarrollado los correspondientes protocolos para la puesta en marcha y control de un equipo NIR Imagen (MatrixNIR) detallando los aspectos de iluminación, control de temperatura, niveles de saturación, soporte de muestra, control interno del instrumento, colocación del objetivo, captura y tratamiento de imágenes.
- 2) El soporte utilizado para la colocación de la muestra, la presencia/ausencia de luz y la forma de selección de espectros útiles, afectan al poder de discriminación entre especies
- 3) Se ha desarrollado una estrategia para realizar análisis NIR-CI que permite discriminar especies animales en harinas de carne y huesos que incluye la elección de las zonas espectrales a utilizar, las condiciones de iluminación, la eliminación de ruido, la optimización de la presentación de la muestra, el pre-tratamiento de la señal y la eliminación de píxeles correspondientes al soporte.
- 4) Entre las estrategias de selección de píxeles basadas en el cálculo de la Distancia de Mahalanobis, cabe destacar la selección de los espectros más lejanos al centro de la población de los espectros de las harinas de la especie a discriminar.
- 5) La selección de píxeles útiles exige utilizar algoritmos de síntesis de información y de eliminación de la colinealidad.
- 6) Se ha dado un paso importante para la creación de una librería con espectros correspondientes a partículas de harinas de carne y huesos de las especies vacuno, porcino, ave y pescado.
- 7) De los métodos multivariantes evaluados en esta tesis (PLSDA, SIMCA, CART) el método PLSDA parece más apropiado por su mayor exactitud (mayor número de muestras correctamente clasificadas).

- 8) El análisis NIR-CI permite construir modelos que discriminen entre harinas de rumiantes *vs.* no-rumiantes, ave *vs.* cerdo, rumiante *vs.* ave y rumiante *vs.* cerdo con errores del 0.95%, 18.02%, 1.22% y 1.42% respectivamente en validación externa.
- 9) La comparación NIR-CI *vs.* NIRS permite concluir que el primero presenta un mayor potencial para la discriminación/identificación de la especie, mientras que el segundo resulta mas apropiado para la cunatificación del porcentaje de harina de una determinada especie en una mezcla.

Trabajos futuros en este campo deberían concentrarse en ampliar la base de datos de píxeles procedentes de harinas animales de distinta composición (particularmente de rumiantes) y en evaluar la metodología de análisis NIR-CI puesta a punto en esta Tesis, para la detección y cunatificación de la especie en piensos compuestos.

ANEXOS

ANEXO I. 11TH CONFERENCE ON CHEMOMETRICS IN ANALYTICAL CHEMISTRY.
MONTPELLIER, FRANCIA, 30 JUNIO-4 JULIO DE 2008. COMUNICACIÓN ORAL

Selection of relevant pixels from NIR images to discriminate bovine vs porcine by-product meals, by near-infrared chemical imaging.

C. Riccioli¹, P. Vallesquino-Laguna¹, M.D. Pérez-Marin¹, J. Garcia-Olmo², A. Garrido-Varo¹, J.E. Guerrero Ginel¹ and T. Fearn³

¹Dpt. Animal Production, ETSIAM, University of Cordoba, Campus Rabanales, Ed. Prod. Animal 14071 Córdoba (Spain)

²SCAI (NIR-MIR) University of Cordoba.

³Department of Statistical Science, University College London, Gower Street, London WC1E 6BT,

Keywords: NIR chemical imaging, animal species, pixel selection, PLSDA, Mahalanobis Distance.

Abstracts: This work is within the European Project SAFEED-PAP (FOOD-CT-2006-036221) “Detection of presence of species-specific processed animal proteins in animal feed”. Near Infrared chemical imaging is being explored for advantages and or complementarities with other techniques for the detection of species-specific processed animal proteins in animal feeds. In this preliminary work, the discrimination between bovine (BPBM) and porcine (PPBM) protein by-product meals is being studied. Spectra from two BPBM and two PPBM samples were collected using a MatrixNIR Chemical Imaging spectrometer, equipped with an InGaAs focal-plane array detector (320x240 pixels) using a spectral range 1000-1700 nm. Samples were located on the stainless mirror (dark reference). After setting a protocol for ensuring spatial spectral repeatability, three strategies using Mahalanobis Distance were explored for the selection of the most relevant pixels from the NIR images: a) the 30000 pixels spectrally nearest to the centre of each animal species, b) the 30000 with highest distance to the centre of the “other species” and c) the 30000 nearest to the centre of the data and simultaneously furthest from the centre of the “other species”. PLSDA models were derived from one pair of images by each of the three methods and tested on the other pair. The best model to discriminate the unseen samples was obtained when the pixels were selected using method (b) (99.88 % hits for BPBM and 97.35% hits for PPBM). The high rate of well classified pixels from each species shows that the risk of using “non-informative” pixels has been minimised with the methods used for pixel selection and the protocol used for sample presentation. Further work is in progress to build NIR images libraries of well authenticated samples of protein animal by-products from different species (poultry, bovine, ovine, fish, porcine) to develop more robust multivariate models.

ANEXO II. 3ER WORKSHOP DE QUIMIOMETRÍA. BURGOS, ESPAÑA, 15 Y 16 DE SEPTIEMBRE DE 2008. COMUNICACIÓN ORAL

Selección de píxeles relevantes para incrementar la capacidad de discriminación en imágenes-nirs de harinas cárnicas de diferentes especies animales.

C. Riccioli , P. Vallesquino-Laguna, D. Pérez-Marin, J.E. Guerrero-Ginel., A. Garrido-Varo

Dpt. Animal Production, ETSIAM, University of Cordoba, Campus Rabanales, Ed. Prod. Animal
14071 Córdoba (Spain) z62rirc@uco.es/es2valap@uco.es/pa1gava@uco.es/pa2pemad@uco.es

Con la crisis de la Encefalopatía Espongiforme Bovina, la Comisión Europea (CE) prohibió totalmente el uso de proteínas de origen animal en piensos compuestos [1]. Posteriormente, la CE aprobó el Reglamento 1774/2002/CE, que establecía las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales no destinados al consumo humano [2]. Este documento señala de forma explícita que sólo se permite el uso en alimentación animal de los subproductos procedentes de animales aptos para el consumo humano y que reúnan ciertos requisitos de seguridad. Su publicación reabrió el debate sobre la posibilidad de volver a utilizar proteínas animales elaboradas en la alimentación animal, aunque solamente para monogástricos, y evitando siempre el reciclado intra-especie o canibalismo. No obstante, el levantamiento de la prohibición total de uso de harinas animales quedaba condicionado al desarrollo y validación de métodos de análisis capaces de detectar dichos ingredientes en piensos. Aunque la microscopía clásica es el método oficial reconocido para tal objetivo, sus limitaciones para diferenciar entre especies animales y para cuantificar, han hecho necesario el estudio y desarrollo de nuevos métodos alternativos, entre los que se encuentra la tecnología de imagen-NIR, la cual frente a la Espectroscopía NIR tradicional proporciona la oportunidad de analizar “microrregiones” localizadas dentro de un producto [2]. Un instrumento NIR-Imaging típico recoge simultáneamente miles de espectros NIR espacialmente distintos y almacena los datos creando matrices de miles de espectros [3]. En el desarrollo de una aplicación NIR-imagen robusta, es esencial el optimizar numerosos aspectos (ej. aspectos de iluminación, control de temperatura, niveles de saturación, soporte de muestra, control interno del instrumento, colocación del objetivo, captura y tratamiento de imágenes [4]). El objetivo de disminuir el número de píxeles por muestra tiene su fundamento en tres aspectos. El primero es la necesidad de acelerar los cálculos, ya que al obtener 76.800 espectros por muestra se crean imágenes de gran tamaño (26 MB), lo que dificulta y ralentiza el manejo de dichas bases de datos. El segundo motivo está relacionado con la calidad de los espectros asociados a los píxeles, para eliminar fenómenos de no-linealidad y de zonas con iluminación irregularmente distribuida. El tercer aspecto que hay que tener en cuenta analizando una imagen NIR es la falta de especificidad

que ciertos píxeles pueden tener en relación a la especie animal, ya que los píxeles y los espectros asociados pueden corresponder a partículas singulares de la muestra medida o a otras equivalentes en otras muestras. Por esta razón, hay que encontrar una metodología que permita seleccionar sólo los píxeles que realmente permitan discriminar entre especies diferentes. El objetivo de este trabajo es evaluar la capacidad discriminatoria de la combinación imagen-NIR utilizando diferentes estrategias basadas en la identificación de longitudes de onda de absorción de compuestos orgánicos (grasas y proteínas) para la discriminación entre harina de carne de rumiantes y harina de ave. Se utilizaron 4 muestras de harina de carne y huesos de bovino (BBM) y 4 de harina de ave (ABM), no sedimentadas ambas, que fueron analizadas en un espectrómetro MatrixNIR (Malvern Instruments, Olney, Maryland) equipado con un detector “focal-plane array” activo en la región espectral 900-1750 nm. Para cada imagen, se compararon dos estrategias diferentes basadas en la elección de espectros con valores de absorbancia similares a longitudes de onda específicas (1200 y 1520 nm), que representan zonas de absorción de grasas y proteínas, respectivamente. Una vez seleccionados los píxeles representativos, se desarrollaron modelos predictivos PLSDA. Los mejores resultados para la discriminación de ave y vacuno se obtuvieron utilizando la librería formada por los píxeles más cercanos a la moda en 1200 nm, relacionada con la absorción de grasa, alcanzando un poder discriminatorio cercano al 100%.

[1] CE. 2000c. Decisión del Consejo 2000/766/CE de 4 de diciembre de 2000 relativa a determinadas medidas de protección contra las encefalopatías espongiformes transmisibles y la utilización de proteínas animales en la alimentación animal. Diario Oficial No. L 306 de 7.12.2000, pp. 32-33.

[2] CE. 2002. Reglamento (CE) N° 1774/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo de 3 de octubre de 2002 por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales no destinados al consumo humano. Diario Oficial n° L 273 de 10.10.2002, pp. 0001 – 0095.

[3] Lewis, E.N., Kidder, L.H., Lee, E., Haber, K.S.: Near-infrared spectral imaging with focal plane array detectors. In *Spectrochemical Analysis using Infrared Multichannel Detectors*. (Bhargava R. and Levin, W., eds.), Blackwell Publishing, pp. 25-55, 2005.

[4] De la Haba, M.J., Garrido-Varo, A., Pérez-Marín, D., Guerrero, J.E. (2007). Near infrared análisis as a first-line screening technique for identifying animal species in rendered animal by-product meals. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 15, 237-245.

ANEXO III. EASIM – 09 (HYPERSPETRAL IMAGING). GEMBLOUX, BÉLGICA, 3 Y 4 MARZO DE 2009. POSTER



EVALUATION OF METHODS FOR SELECTION OF RELEVANT PIXELS FROM NEAR-INFRARED CHEMICAL IMAGES OF VERY HETEROGENEOUS SAMPLES AND HIGH NUMBER OF SIMILAR PARTICLES: BOVINE AND PORCINE MEAT AND BONE MEALS

C. Riccioli 1*, Vallesquino-Laguna1, M.D. Pérez-Marin, A. Garrido-Varo and J.E. Guerrero-Ginel.
 1 Dpt. Animal Production, ETSIAM, University of Córdoba, Campus Rabanales, Ed. Prod. Animal 14071 Córdoba, Spain
 *E-mail: z62rirc@uco.es; Tel: +34957 218555; Fax: +34 957 218436

Introduction

Research is growing in the combination of traditional NIRS sensors with microscopy and imaging instruments. NIR-CI (NIRS Chemical Imaging) combines the advantages of NIRS and HSI (Hyperspectral Imaging Sensors). There are several aspects to optimize in NIR-CI analysis before proceeding to construct spectral libraries for the development of specific applications. A critical aspect is the detection of useful pixels.

Objective

The present work aimed to evaluate three different strategies to select pixels for the discrimination between porcine and bovine species meals in meat and bone meal (MBM).

Instrument and database



3 samples from bovine bone meal (BBM) and 3 samples from porcine bone meal (PBM). Altogether 460.800 pixels/spectra.

MatrixNIR Chemical Imaging spectrometer (Malvern Instruments)

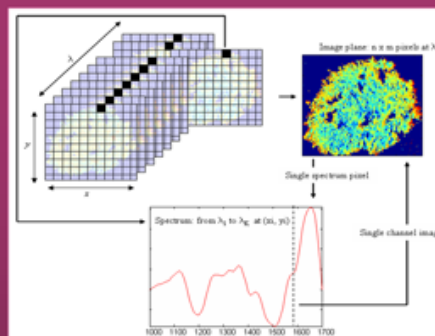
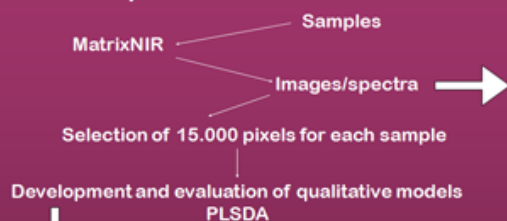


Pixel selection method

The three pixels selection methods are the following:

1. Selection of the 15.000 pixels/spectra with the criteria of the absorbance values nearest to the mean absorbance value at 1200 nm that is the wavelength where fat absorption dominates.
2. Selection of the 15.000 pixels/spectra where each one is the mean of 4 pixels/spectra adjacent in the same row.
3. Selection of the 15.000 pixels/spectra with highest Mahalanobis distance to the centre of the population of the "other species".

Data acquisition and treatment



	Training set	Validation set
T1/	S1 and S2 PBM + S1 and S2 BBM	V1 S3 PBM + S3 BBM
T2/	S1 and S3 PBM + S1 and S3 BBM	V2 S2 PBM + S2 BBM
T3/	S2 and S3 PBM + S2 and S3 BBM	V3 S1 PBM + S1 BBM

1/1 Pixels selection method 1, 2 and 3. S = sample

Results

	Method 1: 1200 nm		Method 2: Mean every 4 spectra		Method 3: Mahalanobis distance	
	PBM	BBM	PBM	BBM	PBM	BBM
V1	98,74	1,63	99,29	99,84	98,71	98,66
V2	1,16	97,71	99,92	95,29	97,26	94,96
V3	0,68	99,18	75,59	99,49	68,34	99,04
MEAN	33,53%	66,17%	91,60%	98,21%	88,10%	97,55%

ANEXO IV. THE 14TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON NEAR INFRARED SPECTROSCOPY (NIR-2009). BANGKOK, THAILAND. 7-13 NOVIEMBRE DE 2009. COMUNICACIÓN ORAL

Calibration pixel selection for hyperspectral discrimination of ruminant and fish animal by-products

C. Riccioli^{1*}, W. Saeys², P. Vallesquino-Laguna¹, D. Pérez-Marín¹, J.E. Guerrero-Ginel¹ and A. Garrido-Varo¹

¹ Department of Animal Production, Faculty of Agricultural and Forestry Engineering, University of Córdoba, 14071, Córdoba, Spain, E-mail: z62rirc@uco.es

² BIOSYST-MeBioS, Faculty of Bioscience Engineering, K.U. Leuven, Kasteelpark Arenberg 30, B-3001 Leuven, Belgium

Introduction. The ban on using animal by-products as feed ingredients for production animals is an important measure aimed at preventing the spread of Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) and is regulated by the EC Regulation 999/2001, amended by EC Regulation 1234/2003. This legislation bans the use of meat and bone meal (MBM) and allows the use of fishmeal only for non-ruminants. Reliable methods for identifying MBM of different species may help justify some modification of the total MBM ruling towards lifting it on fish meal as feed ingredient for ruminants. Traditional NIR spectroscopy has been utilized to determine the percentage of meat and bone meal in compound feeding-stuffs and also to detect the presence of animal species in animal protein by-products [1, 2]. However, the models obtained are still not sufficiently accurate to justify the use of NIRS for detecting – at forensic level – the presence of MBM from a given animal species in compound feeding stuffs. Hyperspectral Imaging (HI), combining spectral and spatial information, is one of the candidate methods for rapid species identification in MBM [3]. Compared to traditional NIR spectroscopy, HI has the advantage of providing the opportunity to investigate localized micro-domains within a product. A physical or chemical abnormality that makes a minimal contribution to the bulk sample may go undetected by traditional NIR spectroscopy. The same abnormality could dominate a micro-domain and be detected in the NIR image [4]. Since the hyperspectral image of each MBM sample consists of several thousand pixel spectra, a set of calibration pixels has to be selected for training the pixel classifier. For this purpose, all possible sources of variation that may be encountered later must be included in the calibration set, even though an excessive number of samples may result in redundant information [5], which will greatly increase the interference and complexity of multivariate calibration. In this study, several distance measures have been tested for use in the Kennard-Stone algorithm [6] for selecting pixels from pure samples of fish meal and ruminant meal to train a partial least squares discriminant analysis (PLSDA) classifier.

Materials and Methods. 13 samples from ruminant meal and 65 samples from fishmeal were analyzed with a NIR camera (MatrixNIR, Malvern Instruments, Maryland, USA). The camera had an Indium Gallium Arsenide (InGaAs) focal-plane array detector that could acquire images of 240X320 pixels with a resolution of 97.8 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ in the NIR region of 900-1750 nm. The spectral data were transformed by Standard Normal Variate (SNV) followed by two different treatments: a) Orthogonal Signal Correction (OSC) and Mean Center and b) only Mean Center. Basically, the OSC is a preprocessing technique used for correction of instrumental drift, bias and scatter in near-infrared spectra [7]. Outliers in spectral data were detected by studying score plots from a Robust PCA model, by the Hotelling's T²-statistic and by the Q-statistic [8]. Afterwards, four different pixel selection strategies based on Kennard-Stone algorithm were evaluated to obtain a data reduction of 1/800 from the original spectra, Euclidean & Mahalanobis distance calculated on the original spectra, and on the first 9 PCs. Predictive models were developed by PLSDA. For the model validation, more than 6 million pixels of the original 78 pure samples were classified as ruminant or fishmeal. Although this validation set will give an over-optimistic image of the discrimination potential that can be obtained, it is very interesting to evaluate how good the different pixel selection strategies have been able to capture the variation present in more than 6 million pixels in a calibration set of 7800 pixels.

Results and Discussion. Figure 1 illustrates pixels selected from a fish-meal sample. The suitability of the new subset was evaluated as a first step through a corrected coefficient of determination (R²) and the fitting slope value S obtained by linear regression from the covariance matrices of the original data and the new data set (Figure 2). PLSDA prediction results shown in Table 1 highlight the great accuracy of the models. According to the research undertaken, the use of Kennard-Stone algorithm based on Mahalanobis distance on original spectra and OSC after SNV have been identified as the most successful procedure. However, for practical purposes, there was essentially no significant difference among any of the approaches. Looking at R² and S values, it can be observed that pixels selected based on their first 9 PCs have the highest ability to conserve the original variability of the whole data. A combination of both results points out the suitability of Kennard-Stone method applied using Mahalanobis distance on the first 9 PCs.

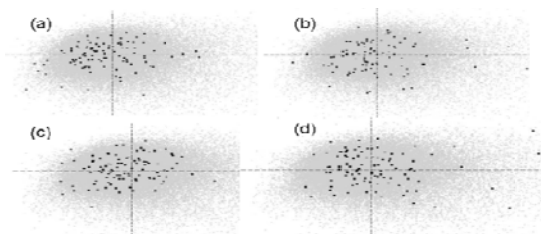


Figure 1. Pixels selected by the Kennard-Stone algorithm (■) based on: (a) Euclidean distance on original spectra, (b) Euclidean distance on PCs, (c) Mahalanobis distance on original spectra and (d) Mahalanobis distance on PCs.

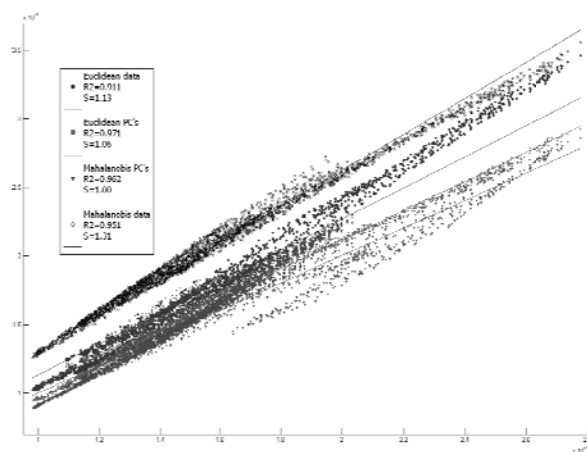


Figure 2. Linear regression from the covariance matrices of the original data and the reduced dataset

Table 1. Predictions of validation set (mean values) calculated applying PLSDA models

	Euclidean distance data ($R^2=0.911$ $S=1.13$)		Mahalanobis distance data ($R^2=0.951$ $S=1.31$)		Euclidean distance PCA ($R^2=0.971$ $S=1.06$)		Mahalanobis distance PCA ($R^2=0.962$ $S=1.00$)	
	OSC	No OSC	OSC	No OSC	OSC	No OSC	OSC	No OSC
% pixels correctly classified	95.34	93.91	95.41	94.23	94.86	93.92	95.10	93.98

Conclusions. The study demonstrated the good accuracy of the models created with a limited number of pixels/spectra for each sample of ruminant and fish meals. The best prediction model was obtained applying Mahalanobis distance on original spectra and treating spectra with OSC after SNV. Looking at R^2 and S , the most suitable values were obtained using indifferently Mahalanobis or Euclidean distances on the first 9 PC's. Results show the suitability of the Kennard-Stone pixels selection method, applied using Mahalanobis distance instead of Euclidean distance.

References

- [1] Garrido-Varo, A., Pérez-Marín, M.D., Guerrero-Ginel, J.E., Gómez-Cabrera, A., Bautista, J. and de la Haba, M.J. et al. (2005). *Biotechnology Agronomy Society and Environment* 9 (1), pp. 3–9.
- [2] De la Haba, M.J., Garrido-Varo, A., Pérez-Marín, D., Guerrero, J.E. (2007). *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 15, pp.237–245.
- [3] Baeten, V., Dardenne, P. (2005). In *Spectrochemical analysis using infrared multichannel detectors*. (Eds Rohit Bhargava and Ira W. Levin). Blackwell publishing, pp.283–301.

[4] Lewis, E. Neil., Kidder, L.,H., Lee, E. and Haber, K. S. (2005). In Spectrochemical analysis using infrared multichannel detectors (Eds Rohit Bhargava and Ira W. Levin). Blackwell publishing, Chapter2, pp.25-55.

[5] Lorber, A. and Kowalski, B.R. (1988) Journal of Chemometrics 2 pp.67-79.

[6] Kennard, R.W. and Stone, L.A. (1969). Technometrics 11, pp.137-148.

[7] Yee, N.G., Coghill, G.G. (2003). Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 67, 2, pp. 145-156.

[8] Eigenvector Research, Inc., 830 Wapato Lake Road, Manson, WA 98831, US.

ANEXO V. INTERNATIONAL WORKSHOP ON MULTIVARIATE IMAGE ANALYSIS.
VALENCIA, ESPAÑA, 28 Y 29 SEPTIEMBRE DE 2009. POSTER



Hyperspectral imaging for the discrimination of ruminant and non-ruminant animal by-products: statistical parameters to evaluate the reliability of the pixels selection method

MIA Workshop
Valencia
2009

C. Riccioli^{1*}, W. Saeys², D. Pérez-Marin¹, P. Vallesquino-Laguna¹, J.E. Guerrero-Ginel¹ and A. Garrido-Varo¹

¹ Department of Animal Production, Faculty of Agricultural and Forestry Engineering, University of Córdoba, 14071, Córdoba, Spain, E-mail: z62rirc@uco.es

² BIOSYST-MeBioS, Faculty of Bioscience Engineering, K.U. Leuven, Kasteelpark Arenberg 30, B-3001 Leuven, Belgium

Introduction

Hyperspectral Imaging is one of the candidate methods for rapid animal species identification in protein by-products. Images used to create discriminant models contain many extra information and need to be reduced through the creation of a representative subset. An adequate pixel selection method should not only optimize the separability between different classes, but also account for a maximized variation present in the data.

Objective

Evaluate two different pixels selection methods based on Kennard-Stone algorithm using two parameters: a corrected coefficient of determination (R^2) and the fitting slope value (S) obtained by linear regression from the covariance matrices of the original data and the reduced dataset. Both provide information about how much the variability of the original data has been conserved.

Database and instrument



13 samples from ruminant by-product (RBP) meals and 60 samples from non-ruminant -pork and poultry- (NRBP) meals.



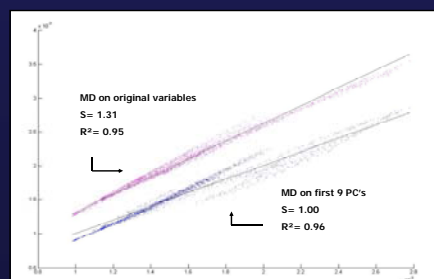
MatrixNIR CHEMICAL IMAGING SPECTROMETER (MALVERN INSTRUMENTS)

Methodology

- I. Pre-treatments: spectral data were transformed by SNV (Standard Normal Variate) followed by OSC (Orthogonal Signal Correction) and Mean Center.
- II. Robust PCA (Principal Component Analysis) was applied in order to remove 13% of pixels/spectra considered outliers.
- III. In order to create a subset, 100 pixels/spectra were selected for each image using a modified Kennard-Stone method. Two different strategies were compared:
 - Mahalanobis distance (MD) calculated on the original variables (71 wavelengths) and
 - MD calculated on first 9 PC's (after a PCA analysis)
- IV: The suitability of the new subset was evaluated through R^2 and S.
- V: Predictive models were developed by PLSDA using dummy variables (0 for NRBP and 1 for RBP). For the model validation, almost 6 million pixels belonging to pure samples were classified.

Results

PIXELS SELECTION METHOD	% PIXELS CORRECTLY CLASSIFIED (PLSDA)
Kennard-Stone using MD on the original variables	93.84
Kennard-Stone using MD on first 9 PC's	93.05



Conclusions

The best prediction was obtained using Kennard-Stone algorithm based on MD on original variables. Nevertheless, by looking at R^2 and S values, it can be observed that pixels selected based on their first 9 PC's have the highest ability to conserve the original variability of the whole data. Furthermore, this last method has a lower computational time.

ANEXO VI. 1ER CONGRESO CIENTÍFICO DE INVESTIGADORES EN FORMACIÓN.
CÓRDOBA, ESPAÑA, 15 Y 16 DE OCTUBRE DE 2009. COMUNICACIÓN ORAL

Análisis de imágenes híperespectrales basada en la tecnología NIRS para el control de harinas animales.

Cecilia Riccioli

Introducción: Con la aparición de la crisis de Encefalopatía Espongiforme Bovina, primero en Europa y más tarde en otras partes del mundo, las autoridades han tomado diversas decisiones legales a fin de asegurar la seguridad humana. Una de ellas es la prohibición total del uso de subproductos de origen animal en piensos compuestos. La Comisión Europea amplió la prohibición total del uso de piensos de origen animal con una más específica para evitar el canibalismo entre especies. Para ello, se pidió a la comunidad científica buscar el desarrollo y la validación de métodos analíticos para la detección de especies animales en piensos. La microscopía clásica es actualmente el método oficial para la lucha contra fraudes o contaminaciones casuales de forrajes con harina de carne y huesos (MBM). Sin embargo, debido a las limitaciones de la microscopía óptica en diferenciar especies animales, la Unión Europea está financiando proyectos de investigación experimental (STRATFEED, 1999, SAFEED-PAP, 2006) que pretenden demostrar científicamente las ventajas, desventajas y complementariedad entre varios métodos (NIRS, microscopía-NIR, Imagen NIR, PCR, técnicas inmunológicas, etc.) para que se cumpla la legislación existente en relación al uso de subproductos de proteínas animales en piensos. La espectroscopía NIR tradicional ha sido utilizada para determinar el porcentaje de MBM en piensos compuestos y también para discriminar especies animales en subproductos de proteína animal, sin embargo la exactitud de los modelos no es suficiente como para usar esta tecnología en la detección de niveles muy bajos de una determinada especie animal en un pienso o en una mezcla de harinas de origen animal. Comparada con la espectroscopía NIR tradicional, la técnica de Imagen NIR (NIRS-CI) proporciona la oportunidad de investigar “microrregiones” localizadas dentro de un producto. Una anomalía física o química que contribuye mínimamente a la constitución de la muestra entera, puede no ser considerada por la espectroscopía NIR tradicional. La misma anomalía puede predominar en una microrregión y ser detectada en una imagen NIR. Un instrumento NIR-Imaging típico colecciona simultáneamente más de 80.000 espectros con valores de reflectancia que espacian dentro de la región del infrarrojo cercano. Cada espectro corresponde a un píxel, es decir, a un punto espacialmente distinto de los otros. Los datos se almacenan en matrices formadas por miles de espectros.

Objetivos:

General: Desarrollar y evaluar una metodología de control analítico basada en la combinación de la Tecnología NIRS con el análisis de imagen, para la identificación de diferentes especies en harina de origen animal y la discriminación de rumiantes frente no rumiantes.

Específicos:

- Puesta a punto de un protocolo a utilizar para la creación y el almacenamiento de una base de datos formada por imágenes de harinas puras y mezclas.
- Identificación de una metodología para la detección rápida de anómalos espectrales para la selección de zonas óptimas en la imagen- NIR.
- Creación de una metodología de reducción de datos para disminuir y optimizar el tiempo de computación.
- Creación de modelos de discriminación basados en algoritmos matemáticos
- Evaluación de la capacidad discriminatoria de la combinación imagen-NIR utilizando diferentes estrategias basadas en la identificación de longitudes de onda de absorción de compuestos orgánicos (grasas y proteínas) para la discriminación entre harina de carne de rumiantes y harina de ave.

Aportaciones: Desde hace relativamente poco tiempo el análisis de imágenes hiperespectrales ha extendido su ámbito desde el nivel “macro” (imágenes satelitales) al “micro” (análisis de laboratorio). Las aplicaciones más recurrentes pertenecen, en efecto, al campo de la medicina y de la farmacia. Nuestro grupo de investigación, en el marco del proyecto europeo SAFEED-PAP, ha sido el primero a investigar la viabilidad de esta tecnología para la discriminación de especies en harinas animales. La innovación prevista concierne también el desarrollo de modelos que no son solo cualitativos sino también cuantitativos ya que se están estudiando las características físicas de las partículas para encontrar la relación exacta que estas tienen con los píxeles creados por la cámara NIRS-CI. Una ulterior contribución a la investigación en este campo es el uso de potentes softwares que permiten el manejo eficiente de millones de datos. Estos programas hasta ahora han sido utilizados exclusivamente con imágenes provenientes de sensores remotos.

ANEXO VII. IIASIM-2010. DUBLIN, IRLANDA, 18 Y 19 NOVIEMBRE DE 2010.
COMUNICACIÓN ORAL.

Pure and mixed pixels analysis for the detection of MBM in animal by-products feeds

C. Riccioli*¹, D. Pérez-Marín¹, J.E. Guerrero-Ginel¹, Tom Fearn², and A. Garrido-Varo¹

¹Department of Animal Production, Faculty of Agricultural and Forestry Engineering, University of Córdoba, 14071, Córdoba, Spain

²Department of Statistical Science, University College London.

NIR spectroscopy has been utilized to determine the presence of animal species in animal protein by-products. However, the prediction errors obtained with NIRS models are still high for the requirements of the European legislation. Hyperspectral Chemical Imaging (HCI) has demonstrated its feasibility to discriminate animal species in animal by-products. However, mixed pixels have never been taken in consideration for the models building. In this paper we explore the ability of conventional NIRS and its combination with pure and mixed pixels analysis to improve the detection of meat and bone meal (MBM) in fish meals (FM). Hyperspectral images (216X280 pixels, 71 wavelengths, 1,000-1,700 nm) from 33 samples of pure FM and 64 samples of FM contaminated with increasing amounts of MBM from 0.25 to 16% were used in the present study as training set. The mean spectrum of each image was considered as the “representative” of each sample and it was used to create a discriminant model (PLSDA) using dummy variables 1 (pure samples) or 2 (contaminated samples). The model obtained was employed for the prediction of every pixel of an external set of 32 samples of pure FM and 64 samples of FM contaminated with increasing amounts of MBM from 0.25 to 16% were used. Spectral pre-processing treatments consisted of second order detrending, SNV and mean centering while a binning treatment (2X2) was applied at pixel level. For the validation set several others binning treatments were also evaluated (4X4 = 54X70 pixels, 6X6 = 36X46 pixels, 8X8 = 27X35 pixels and 10X10 = 21X28 pixels).

The PLSDA results in a 100% of correct classification for the training set with a Root Mean Square Error of Cross Validation (RMSECV) of 0.14% demonstrating that pure samples are perfectly distinguishable from contaminated samples, even at very low levels of MBM contamination (0.25%) of MBM. Results from the prediction of every pixel of the external set showed that, on average, only 3.42% of pixels from FM samples were classified as mixed while, in the case of contaminated samples, this value increased to a mean value of 82.62%. Figure 1 represents the prediction of pixels from both a pure FM sample and another one contaminated with 0.25% of MBM. Results show that the increase in the binning size causes an increase in the number of pixels classified as mixed in the contaminated sample and a reduction in the pure FM samples. A 10X10 binning treatment causes a 100% correct classification of pure FM samples. The usefulness of the result is that a 100 times reduced image can be used to test the presence of mixed

pixels instead of the whole image shortening calculation time and making the analysis more feasible for industrial purposes. Furthermore, the information obtained with this kind of analysis can be used as a sort of “pixel purity” index in order to evaluate the level of the mixing homogeneity. The mixed pixel interpretation is a key concern for future quantitative purposes and our future work also aims to improve mixed pixel analysis for quantification of MBM in animal by-products feeds.

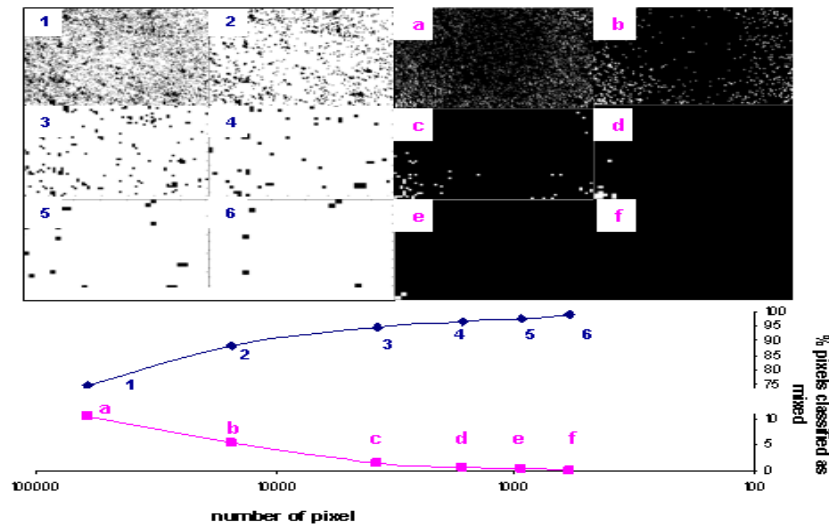


Figure 1. Percentage of mixed pixels predicted in a sample of fishmeal contaminated with 0.25% MBM (up left) and in pure pixels predicted in a sample of pure fishmeal (up right). White=mixed pixels. Black=pure pixels. 1 and a= 216X280 pixels (original image), 2 and b=108X140 pixels (bin2X2), 3 and c=54X70 pixels (bin4X4), 4 and d=36X46 pixels (bin6X6), 5 and e=27X35 pixels (bin8X8) and 6 and f=21X28 pixels (bin10X10).

**ANEXO VIII. PUBLICACIONES EN LA REVISTAS INTERNACIONALES DE ALTO
INDICE DE IMPACTO**

1. Riccioli, C., Pérez-Marín, D., Guerrero-Ginel, J., Saeys, W., Garrido-Varo, A. (2011). Pixel selection for near-infrared chemical imaging (NIR-CI) discrimination between fish and terrestrial animal species in animal protein by-product meals. *Applied Spectroscopy* 65 (7), pp. 771-781.

2. Fearn, T., Riccioli, C., Garrido-Varo, A., Guerrero-Ginel, J.E. (2009). On the geometry of SNV and MSC. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 96 (1), pp. 22-26.