



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA ELECTRÓNICA

*Desarrollo de un sistema de medida basado en
espectroscopía de impedancia para la determinación de
parámetros fisicoquímicos en alimentos*

Doctorando: Rafael Masot Peris

Directores: José Manuel Barat Baviera
Ramón Martínez Máñez
Javier Ibáñez Civera

Valencia, 2010



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA ELECTRÓNICA

*Desarrollo de un sistema de medida basado en
espectroscopía de impedancia para la determinación de
parámetros fisicoquímicos en alimentos*

Doctorando: Rafael Masot Peris

Directores: José Manuel Barat Baviera
Ramón Martínez Máñez
Javier Ibáñez Civera

Valencia, 2010

Gracias por completarme, por tu fuerza y tu luz. Tú eres mi hogar.

A Beatriz

Si he podido ver más allá es porque me he subido en hombros de gigantes
Isaac Newton

Agradecimientos

La buena didáctica es aquella que deja que el pensamiento del otro no se interrumpa y que le permite, sin notarlo, ir tomando buena dirección

Enrique Tierno Galván

Mi sincero agradecimiento a José Manuel Barat Baviera, Ramón Martínez Máñez y Javier Ibáñez Civera. Ellos han sido los directores de esta tesis doctoral, confiaron en nuestro grupo para desarrollar esta línea de investigación y me dieron el empujón definitivo para emprender este proyecto con gran ilusión. Ellos han constituido un equipo sólido, accesible y tenaz, me han conducido con sus consejos, me han orientado con su experiencia y me han arropado con su apoyo. Gracias por acompañarme en este trayecto, por mostrarme nuevos senderos y por guiarme hasta la meta. Ahora que por fin la cruzo confío en poder seguir siendo un buen compañero de viaje.

Un buen amigo es un hombre para el cual no tenemos secretos y que, a pesar de todo, nos aprecia

León Daudí

Miguel Alcañiz es mucho más que un amigo. No es fácil describir con palabras este vínculo tan íntimo, tan sincero. Podría decirse que hemos estado juntos toda la vida y nunca dejo de aprender de él. En el ámbito laboral le debo mi llegada a la Universidad Politécnica. Gracias a él comencé mi actividad docente. Nunca olvidaré la energía con que me ayudó en el proceso y su enorme alegría cuando se hizo realidad. Poder trabajar con él ha sido un sueño hecho realidad. Aunque sigue sorprendiéndome su clarividencia, su brillantez y su inteligencia, lo que más me maravilla de Miguel es su generosidad y su capacidad de entrega. Siempre voy a estar ahí, aunque haya dificultades y obstáculos, juntos los superaremos. Sabes que te quiero. Gracias amigo.

Si precisas una mano, recuerda que yo tengo dos

San Agustín

Ana Fuentes ha hecho posible la validación del equipo. Ha sido la mano ejecutora en todos los trabajos de campo, llevando a cabo las determinaciones fisicoquímicas y las medidas de impedancia. Una trabajadora incansable, meticulosa y precisa, siempre dispuesta y muy profesional. Ella es una de las máximas responsables de que este trabajo vea la luz. No importaban las muestras ni las repeticiones, ella siempre ha convertido aquello que a mi me parecía inaccesible en sencillo. Muchas gracias por tu implicación y tu ayuda.

Mi agradecimiento a Edgard por la realización de las determinaciones analíticas vinculadas al estudio de la evolución de la frescura de pescado.

Un amigo es aquel que adivina siempre cuándo se le necesita

Jules Renard

A Ricardo Zahonero le quiero y admiro desde hace muchos años. Con él comencé mi andadura profesional y fue una suerte, porque su maestría me facilitó el rodaje y maquilló mi inexperiencia. Siempre he sabido que podía contar con él. En este trabajo ha sido el responsable de la fabricación de electrodos de medida del equipo implementado. Gracias amigo por tener siempre tiempo para mí, por tu talento y por tu cariño.

Ayudadme a comprender lo que os digo y os lo explicaré mejor

Antonio Machado

De Jesús Brezmes valoro enormemente su capacidad para explicar con claridad los complejos conceptos del análisis multivariante. Gracias a la nitidez de su conferencia pude empezar a descifrar la esencia de las herramientas estadísticas aplicadas en esta tesis y su forma de transmitir conocimientos me dio fuerza y confianza para estudiarlas en profundidad.

Juan Soto ha tenido la calma y paciencia necesarias para traducir a mi idioma conceptos de electroquímica. Muchas gracias por tu contribución a este trabajo.

Los individuos marcan goles, pero los equipos ganan partidos

Zig Ziglar

Eduardo García y Luís Gil me hicieron sentir desde el principio como un miembro más del equipo, sin condiciones, con la mano tendida. Soy muy afortunado por pertenecer a este grupo de trabajo donde no hay tensiones, vencedores, ni vencidos, donde se persigue un único objetivo, el de crecer todos juntos y permanecer unidos. Gracias por vuestra acogida. Ahora sé que juego en casa.

El amor es lo único que crece cuando se reparte

Antoine de Saint-Exupery

Si hay alguien que merece reconocimiento y aplauso es mi madre. Una mujer con un corazón y un coraje enorme, una luchadora. Una persona completa y noble, dulce y tierna. Ella junto con Vicenta y Tona son las abanderadas de un gran matriarcado que han constituido la columna vertebral de mi infancia y adolescencia. Las tres sois unas mujeres excepcionales que me habéis hecho vivir muchos momentos felices. Es un orgullo poder teneros cerca. Gracias por vuestro amor.

Me he criado en el entorno familiar muy numeroso, en el que convivimos aún hoy padres, tíos, primos y hermanos como una auténtica piña, algo difícil actualmente. Creo por tanto en la fuerza de la familia y de ella me he alimentado. A todos os agradezco el apoyo permanente, la palabra precisa, el abrazo sincero, la mirada serena y la paciencia infinita.

Beatriz, mi amor, mi confidente, mi consejera, mi tesoro. Tú eres mi norte, mi abrigo, mi equilibrio y mi hogar.

Víctor y Andrea son la responsabilidad de las cosas bien hechas, la fragilidad de la dependencia y la frescura de la inocencia. Gracias por desatar siempre una sonrisa de papá y hacerme sentir el único en el mundo.

Resumen

Una de las áreas prioritarias del Séptimo Programa Marco de la Unión Europea es *Smart Control for Improved Food and Feed Technologies*, cuyo objetivo es el desarrollo de nuevos métodos que faciliten el control de los procesos productivos y garanticen la calidad y seguridad de los productos agroalimentarios. La relevancia concedida a esta línea de investigación es un claro indicador del interés de todos los agentes implicados en impulsar la introducción de tecnologías innovadoras. La meta es implementar nuevas técnicas analíticas rápidas y económicas, que constituyan una alternativa real a los procedimientos tradicionales de control.

En la actualidad la mayoría de los métodos empleados en la industria para la determinación de propiedades fisicoquímicas de alimentos son destructivos, dejando inservible la pieza en estudio. El diseño de sistemas de medida no destructivos es un reto. Pero además de preservar la integridad de las muestras analizadas, las nuevas técnicas analíticas deben tener un bajo coste y un funcionamiento sencillo, no dependiente de mano de obra cualificada.

En la presente tesis se ha desarrollado un sistema de medida de carácter puntual y no destructivo, de bajo coste, flexible, ligero y de fácil manejo, capaz de determinar propiedades fisicoquímicas de productos alimenticios a partir de medidas de impedancia.

El sistema de medida aplica una señal eléctrica al alimento y mide su respuesta en un barrido de frecuencias comprendido entre 1Hz y 1MHz, recurriendo para ello a la técnica de espectroscopía de impedancia. Mediante herramientas de análisis multivariante se establece una correlación entre los valores de impedancia y los parámetros fisicoquímicos y se obtienen modelos estadísticos de predicción, que posteriormente serán utilizados para conocer las propiedades de nuevas muestras.

El sistema de medida desarrollado se compone de tres partes:

- Equipo de medida electrónico. La implementación de la técnica de espectroscopía de impedancia requiere la generación y muestreo de señales senoidales de amplitud variable de hasta 1MHz. Por ello en el

desarrollo del equipo de medida se han empleado técnicas digitales multiproceso, basadas en dispositivos de lógica programable (CPLD).

- Aplicación PC. Un software diseñado para que de forma sencilla y rápida el usuario pueda modificar los parámetros (amplitud, rango de frecuencias, escala de corriente, etc.) de las señales que se aplican a las muestras. Además, receptiona los datos de tensión y corriente y calcula, grafica y almacena los valores de los espectros de impedancia.
- Electrodo. Diseño de dos tipos de electrodos con geometrías diferentes y de reducidas dimensiones en comparación con las de las muestras para que las determinaciones realizadas tengan un carácter puntual y no destructivo. Se han denominado “*Electrodo doble*” y “*Electrodo punta de flecha*”. El primero está configurado por dos agujas muy finas de acero inoxidable paralelas entre si. El segundo, diseñado con técnicas serigráficas mediante tecnología *thick-film*, está constituido por dos electrodos de pasta conductora fijados sobre una base de alúmina, con forma de punta de flecha. Se ha utilizado en algunas aplicaciones un tercer electrodo denominado “*Electrodo de aguja*”, consistente en una aguja coaxial de las utilizadas en técnicas electromiográficas formada por dos conductores concéntricos de acero inoxidable separados por una resina.

El sistema de medida desarrollado se ha aplicado a los siguientes ensayos:

- Determinación del porcentaje de sal en salmueras y carne picada.
- Estudio del grado de curado de muestras de lomo.
- Estudio del grado de curado de quesos.
- Estudio de la frescura de pescado.

Se ha demostrado la fiabilidad del sistema de medida mediante su validación. La técnica sugerida posee unas propiedades analíticas adecuadas, tanto en términos de exactitud como de precisión y sensibilidad. Se han obtenido en algunos casos excelentes predicciones y en otros un alto nivel de clasificación. El sistema desarrollado posee una capacidad de diferenciación elevada incluso a altas concentraciones de cloruro sódico, lo que supone una aportación importante en este campo.

Resum

Una de les àrees prioritàries del Sèptim Programa Marc de la Unió Europea és *Smart Control for Improved Food and Feed Technologies*, l'objectiu de la qual és el desenrotllament de nous mètodes que faciliten el control dels processos productius i garantisquen la qualitat i seguretat dels productes agroalimentaris. La rellevància concedida a esta línia d'investigació és un clar indicador d'interés de tots els agents implicats en impulsar la introducció de tecnologies innovadores. La meta és implementar noves tècniques analítiques ràpides i econòmiques, que constituïsquen una alternativa real als procediments tradicionals de control.

En l'actualitat la majoria dels mètodes emprats en la indústria per a la determinació de propietats fisicoquímiques d'aliments són destructius, deixant inservible la peça en estudi. El disseny de sistemes de mesura no destructius és un repte. Però a més de preservar la integritat de les mostres analitzades, les noves tècniques analítiques han de tindre un baix cost i un funcionament senzill, no dependent de mà d'obra qualificada.

En la present tesi s'ha desenrotllat un sistema de mesura de caràcter puntual i no destructiu, de baix cost, flexible, lleuger i de fàcil maneig, capaç de determinar propietats fisicoquímiques de productes alimentaris a partir de mesures d'impedància.

El sistema de mesura aplica un senyal elèctric a l'aliment i mesura la seua resposta en un espectre de freqüències comprés entre 1Hz i 1MHz, recurrent per a això a la tècnica d'espectroscòpia d'impedància. Per mitjà d'eines de anàlisi multivariant s'establix una correlació entre els valors de impedància i els paràmetres fisicoquímics i s'obtenen models estadístics de predicció, que posteriorment seran utilitzats per a conèixer les propietats de noves mostres.

El sistema de mesura desenrotllat es compon de tres parts:

- Equip electrònic de mesura. La implementació de la tècnica de espectroscòpia d'impedància requereix la generació i mostratge de senyals sinusoidals d'amplitud variable de fins a 1MHz. Per això en el desenrotllament de l'equip de mesura s'han emprat tècniques digitals multiprocés, basades en dispositius de lògica programable (CPLD).

- Aplicació PC. Un programari dissenyat perquè de forma senzilla i ràpida l'usuari pugui modificar els paràmetres (amplitud, rang de freqüències, escala de corrent, etc.) dels senyals que s'apliquen a les mostres. A més, rep les dades de tensió i corrent i calcula, representa gràficament i emmagatzema els valors dels espectres d'impedància.
- Electrodes. Disseny de dos tipus d'elèctrodes amb geometries diferents i de reduïdes dimensions en comparació amb les de les mostres per a que les determinacions realitzades tinguin un caràcter puntual i no destructiu. S'han denominat “*Elèctrode doble*” i “*Elèctrode punta de fletxa*”. El primer està configurat per dos agulles molt fines d'acer inoxidable paral·leles entre si. El segon, dissenyat amb tècniques serigràfiques per mitjà de tecnologia “*thick-film*”, està constituït per dos electrodes de pasta conductora fixats sobre una base d'alúmina, amb forma de punta de fletxa. S'ha utilitzat en algunes aplicacions un tercer elèctrode anomenat “*Elèctrode d'agulla*”, consistent en una agulla coaxial de les utilitzades en tècniques electromiogràfiques formada per dos conductors concèntrics d'acer inoxidable separats per una resina.

El sistema de mesura desenvolupat s'ha aplicat als següents assajos:

- Determinació del percentatge de sal en salmorres i carn picada.
- Estudi del grau de curat de mostres de llonganissa.
- Estudi del grau de curat de formatges.
- Estudi de la frescor del peix.

S'ha demostrat la fiabilitat del sistema de mesura per mitjà de la seua validació. La tècnica suggerida posseïx unes propietats analítiques adequades, tant en termes d'exactitud com de precisió i sensibilitat. S'han obtingut en alguns casos excel·lents prediccions i en altres un alt nivell de classificació. El sistema desenvolupat posseïx una capacitat de diferenciació elevada inclús a altes concentracions de clorur sòdic, la qual cosa suposa una aportació important en este camp.

Abstrac

One of the priority areas of the European Commission's Seventh Framework Programme is *Smart Control for Improved Food and Feed Technologies*. Its objective is the development of new methods that facilitate the control of productive processes guaranteeing the quality and safety of agrofood products. The importance given to this research line is a clear indicator of the interest of all of the agents implicated in promoting the introduction of innovative technologies. The goal is to implement new, fast, economical, analytical techniques, which constitute a real alternative to traditional control procedures.

At present, the majority of methods used for the determination of physicochemical properties of food in industry are destructive, leaving the piece under consideration useless. The design of non-destructive measurement systems is a challenge, but in addition to preserving the integrity of the analysed samples, new analytical techniques must be cheap, easy to use, and not require highly trained personnel.

In the present thesis a low cost, flexible, light, punctual, user-friendly, non-destructive measurement system was developed. It determines the physicochemical properties of food products based on the measurement of electrical impedance.

The measurement system applies an electric signal to the food and measures its response in a frequency sweep between 1Hz and 1MHz, using impedance spectroscopy. A correlation between the impedance values and the physicochemical parameters is established by means of multivariate analysis tools, obtaining statistical prediction models which can be used to determine the properties of the samples.

The developed measurement system has of three parts:

- Electronic measurement equipment. The use of impedance spectroscopy requires the generation and sampling of variable amplitude sine waves of up to 1MHz. Therefore in the development of the measurement equipment multiprocessing digital techniques were used, based on complex programmable logic devices (CPLD).

- PC Application. Software designed so the user can quickly and simply modify the parameters (amplitude, range of frequencies, current range, etc.) of the signals that are applied to the samples. It deals with the voltage and current data, calculating, storing and graphically representing the values of the impedance spectra.
- Electrodes. Two types of electrodes were designed with different geometries and reduced dimensions compared to the samples, so the readings carried out are of a punctual and non-destructive character. They have been named “Double electrode” and “Arrowhead electrode”. The first consists of two very fine parallel stainless steel needles. The second, designed with serigraphic techniques using thick-film technology, consists of two conductive paste electrodes fixed on an arrow shaped alumina base. In some applications a third electrode named “Needle electrode” was used which consists of a coaxial needle of the type used in electromyography formed by two concentric stainless steel conductors separated by resin.

The developed measurement system was applied to the following assays:

- Determination of the percentage of salt in brine and minced beef.
- Study of the level of curing in pork loin samples.
- Study of the level of curing in cheese.
- Study of fish freshness.

The reliability of the measurement system was demonstrated by its validation. The suggested technique possesses adequate analytical properties in terms of exactness as well as precision and sensitivity. Excellent predictions were obtained in some cases and a high level of classification in others. The developed system possesses a high capacity for differentiation even in high concentrations of sodium chloride, making an important contribution to this field.

Prólogo

Así como la multidisciplinariedad es el elemento clave para la creatividad y la innovación, puede decirse que este concepto ha sido la piedra angular del desarrollo de esta tesis. A lo largo de la historia la interrelación entre disciplinas y el trabajo en equipo ha llevado a hitos científicos y tecnológicos. Este es el caso de la investigación en la ingeniería automovilística, donde intervienen multitud de áreas de conocimiento como la termodinámica con el motor de explosión, la física de fluidos con el estudio de la aerodinámica, la ingeniería de materiales con las últimas novedades en compuestos, la ingeniería química con los últimos avances en combustible, la ingeniería del diseño, la ingeniería mecánica, la ingeniería electrónica, etc.

Esta tesis ha requerido la incorporación de conocimientos de varias disciplinas:

- Física de dieléctricos: materiales y condensadores
- Quimiometría: métodos de medida electroquímicos
- Estadística: técnicas de análisis multivariante
- Electrónica digital: diseño de circuitos de procesamiento de alta velocidad
- Instrumentación electrónica: adaptación de señales y supresión de ruido
- Tecnología de alimentos: estructura y comportamiento de tejidos orgánicos

Todas ellas se han orientado y coordinado para alcanzar los objetivos propuestos y potenciar el futuro diseño de aplicaciones que constituyan herramientas reales de mejora para la industria.

El sistema de medida diseñado se encuentra inmerso en el proyecto del Ministerio de Ciencia e Innovación MAT2009-14564-C04, por consiguiente pertenece al marco de investigación del Instituto de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM) de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV). Así mismo, poniendo en práctica la multidisciplinariedad mencionada previamente, ha contado con la colaboración del Departamento de Tecnología de Alimentos (DTA) de la UPV. El proyecto AGL2007-65379-C02-02/ALI del Ministerio de Ciencia e Innovación ha financiado la realización de todos los ensayos experimentales.

Para estructurar los contenidos y presentar los temas tratados de acuerdo con una secuencia lógica, que permita ofrecer una mayor fluidez en la presentación de los resultados, el estudio se ha dividido en los siguientes apartados:

- Antecedentes. En la que se describe el *Estado del Arte* que sustenta el trabajo. Otorga una visión rápida de la actualidad de la ingeniería agroalimentaria, de la espectroscopia de impedancia como técnica de medida empleada, de las características necesarias de los sistemas electrónicos de medida y electrodos y, finalmente, de las técnicas de análisis multivariante.
- Objetivos. Se define el objetivo principal de la tesis y los objetivos específicos establecidos para el desarrollo del sistema electrónico de medida.
- Capítulo 1. Desarrollo del sistema de medida.
- Capítulo 2. Aplicación del sistema de medida a productos cárnicos crudo-curados. Se describen dos ensayos:
 - ✓ Estudio del contenido de sal en salmueras y carne picada.
 - ✓ Determinación de parámetros fisicoquímicos en muestras de lomo de cerdo durante el proceso de curado.
- Capítulo 3. Aplicación a otros productos de la industria alimentaria. Se describen dos ensayos:
 - ✓ Estudio del contenido en humedad y sal en queso.
 - ✓ Estudio de la evolución de la frescura de pescado.
- Conclusiones finales.
- Líneas futuras.
- Referencias bibliográficas.

Producción científica

Hasta la fecha de la publicación de esta tesis, la producción científica derivada de la misma ha sido la siguiente:

Publicaciones SCI

R. Masot, M. Alcañiz, A. Fuentes, F.C. Schmidt, J. M. Barat, L. Gil, D. Baigts, R. Martínez-Máñez, J. Soto. *Design of a low-cost non-destructive system for punctual measurements of salt levels in food products using impedance spectroscopy*. Sensors and Actuators A 158 (2010) 217–223.

R. H. Labrador, R. Masot, M. Alcañiz, D. Baigts, J. Soto, R. Martínez-Máñez, E. García-Breijo, L. Gil, José M. Barat. *Prediction of NaCl, nitrate and nitrite contents in minced meat by using a voltammetric electronic tongue and an impedimetric sensor*. Food Chemistry 122 (2010) 864–870.

I. Campos, R. Masot, M. Alcañiz, L. Gil, J. Soto, J. L. Vivancos, E. García-Breijo, R. H. Labrador, J. M. Barat, R. Martínez-Máñez. *Accurate concentration determination of anions nitrate, nitrite and chloride in minced meat using a voltammetric electronic tongue*. Sensors & Actuators: B. Chemical. Article in Press, Accepted Manuscript.

Congresos

R. Masot, M. Alcañiz, A. Fuentes, F. C. Schmidt, J. M. Barat, L. Gil, R. Hanoi, J. Soto, R. Martínez-Máñez. *Design and Implementation of a Low-Cost Non-Destructive System for Measurements of Water and Salt Levels in Food Products Using Impedance Spectroscopy*. 13th International Symposium on Olfaction and Electronic Nose ISOEN 2009. Brescia – Italy. Abril 2009.

L. Gil, M. Alcañiz, R. Masot, E. García-Breijo, J. Ibáñez, J. Garrigues. *Desarrollo de sistemas de lenguas electrónicas con distintas técnicas de medida. Aplicación al análisis de aguas y de alimentos*. III Workshop on Sensors and Molecular Recognition. Valencia – España. Julio 2009.

J.A. Serra, F.C. Schmidt, A. Fuentes, J.M. Barat, R. Grau, R. Masot, M. Alcañiz. *Desarrollo de un método de medida rápido para el control del contenido en humedad y sal en queso*. VII Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos CIBIAVII. Bogotá – Colombia. Septiembre 2009.

VI Congreso Español de Ingeniería de Alimentos CESIA 2010. *Determinación de parámetros fisicoquímicos en muestras de lomo de cerdo durante el proceso de curado*. Logroño. Octubre 2010.

Divulgación

Artículo publicado en el diario El Levante escrito por Pilar G. del Burgo titulado *Crean lenguas y ojos electrónicos para detectar la degradación medioambiental*. Viernes, 3 de julio de 2009.

Índice

Antecedentes	1
1. Situación actual de la Industria Agroalimentaria	1
2. Espectroscopía de Impedancia	8
2.1. Impedancia de los tejidos biológicos	12
2.2. Aplicaciones de la espectroscopía de impedancia	21
3. Lenguas electrónicas en la industria alimentaria.....	27
3.1. Características generales de un sistema de medida basado en la técnica de espectroscopía de impedancia.....	28
3.2. Métodos de medida de impedancia.....	30
3.3. Ruido eléctrico.....	35
4. Electrodo.....	36
5. Técnicas de análisis multivariante	40
5.1. Preprocesado de datos.....	41
5.2. Análisis de componentes principales PCA	43
5.3. Análisis discriminante DA.....	44
5.4. Mínimos cuadrados parciales PLS.....	44
5.4.1. Aplicación de la técnica PLS.....	46
Objetivos de la tesis	49
Capítulo 1. Desarrollo del sistema de medida.....	51
1. Pruebas preliminares. Determinación de las necesidades	51
1.1. Diagrama general del sistema de medida.....	53
2. Descripción del hardware del equipo electrónico de medida.....	57
2.1. Bloque de procesamiento digital.....	57
2.2. Módulo del Convertidor Digital Analógico (DAC).....	60
2.3. Módulo del Convertidor Analógico Digital (ADC).....	63
2.4. Circuitos de Adaptación de señal.....	65
2.5. Circuito de medida de corriente (puente autobalanceado).....	68
2.6. Alimentación del equipo.....	69
2.7. Tratamiento del ruido.....	70
3. Descripción del software del Equipo Electrónico de Medida.....	74

3.1. Quartus II de Altera.....	74
3.2. Código de la CPLD1 (Generación de señales).....	74
3.2.1. Proceso RX.....	75
3.2.2. Proceso SIN_GEN.....	78
3.3. Código de la CPLD2 (Proceso de Muestreo).....	82
3.3.1. Proceso TX_UART.....	83
3.3.2. Proceso SAMPLER.....	85
4. Código de la aplicación de PC.....	89
4.1. Módulo de Ensayo Manual (frecuencia individual).....	90
4.1.1. Preparación de los datos.....	90
4.1.2. Transmisión de los datos.....	95
4.1.3. Recepción de los datos.....	96
4.1.4. Procesado de los datos.....	97
4.2. Módulo de Ensayo Automático (espectro de frecuencias).....	102
4.3. Módulo de utilidades.....	105
4.3.1. Configuración.....	105
4.3.2. Representación grafica del diagrama de Bode (módulo y fase).....	106
4.3.3. Representación gráfica del diagrama de Nyquist.....	108
5. Electrodos.....	109
5.1. Electrodo de aguja.....	109
5.1.1. Representación de la distribución del campo eléctrico.....	110
5.2. Electrodo doble.....	111
5.3. Electrodo punta de flecha.....	112
6. Calibración del equipo electrónico de medida.....	116
7. Validación experimental del sistema de medida.....	119
8. Aspecto final.....	121
9. Conclusiones.....	121

Capítulo 2. Aplicación del sistema de medida a productos cárnicos crudo-curados..... 123

1. Estudio del contenido de sal en salmueras y carne picada.....	123
1.1. Material y métodos.....	125
1.2. Resultados de las salmueras.....	128
1.2.1. Análisis de Componentes Principales.....	132
1.2.2. Caracterización del contenido en sal y modelo estadístico mediante PLS.....	135
1.3. Resultados en lomo de cerdo.....	140

1.3.1. Análisis de Componentes Principales.....	140
1.3.2. Caracterización del contenido en sal y modelo estadístico mediante PLS.....	142
1.4. Conclusiones.....	148
2. Determinación de parámetros fisicoquímicos en muestras de lomo de cerdo durante el proceso de curado.....	149
2.1. Material y métodos.....	152
2.2. Resultados y discusión.....	155
2.2.1. Modelos para el electrodo de aguja.....	156
2.2.2. Modelos para el electrodo doble.....	161
2.2.3. Modelos para el electrodo punta de flecha.....	162
2.2.4. Discusión de los resultados.....	163
2.3. Conclusiones.....	164

Capítulo 3. Aplicación a otros productos de la industria alimentaria 167

1. Estudio del contenido en humedad y sal en queso.....	167
1.1. Materiales y métodos.....	169
1.2. Resultados y discusión.....	171
1.2.1. Caracterización de las muestras.....	171
1.2.2. Medidas de impedancia.....	173
1.3. Conclusiones.....	176
2. Estudio de la evolución de la frescura de pescado.....	176
2.1. Material y métodos.....	178
2.2. Resultados y discusión.....	181
2.2.1. Caracterización de las muestras.....	181
2.2.2. Evolución de los parámetros fisicoquímicos a lo largo del estudio de almacenamiento.....	183
2.2.3. Caracterización de la materia prima mediante la medida de su impedancia.....	186
2.2.4. Evolución de las medidas de impedancia durante el almacenamiento.....	188
2.2.5. Modelización PLS entre impedancia, pH, días de almacenamiento y N-BVT.....	190
2.3. Conclusiones.....	192

Conclusiones finales	195
Líneas futuras.....	199
Referencias bibliográficas	201

Antecedentes

1. Situación actual de la Industria Agroalimentaria

La fuerza del consumidor

La industria alimentaria se enfrenta al reto de ser el principal agente precursor del cambio que exige el consumidor del siglo XXI. Tiene que adaptarse rápidamente a los nuevos patrones de consumo basados en el binomio indivisible entre los conceptos de alimentación y salud.

Los escándalos alimentarios producidos en los últimos años en Europa, como la enfermedad de las vacas locas, los piensos contaminados con dioxinas o el aceite de oliva adulterado, han generado escepticismo respecto a las garantías sanitarias de los productos alimenticios. La repercusión social de los acontecimientos y su rápida difusión mundial han desencadenado fuertes críticas al sector [1][2].

Son muchas las preguntas que debe plantearse la Industria Agroalimentaria para poder satisfacer las necesidades de un mercado globalizado: ¿Cuáles son los atributos diferenciales de un alimento hoy en día?; ¿Qué características aportan verdadero valor añadido a un cliente exigente y moderno?; ¿Cómo asegurar la captación y fidelización del comprador? Es innegable que el público actual ha variado su comportamiento, está más preparado, requiere información fiable, actual y detallada en todo momento. Como consecuencia se ha creado un nuevo estilo de compra, donde adquieren mayor relevancia las garantías de salubridad e inocuidad del alimento.

Actualmente se considera que una dieta adecuada es la mejor forma de prevenir la enfermedad y ganar en bienestar. Por ello, a la preocupación existente por el aporte nutricional del alimento, su valor dietético, el bajo contenido en grasas o el nivel de calorías se suman ahora nuevos criterios de selección, como la elaboración con ingredientes naturales, la sensibilización con el medio ambiente y la no utilización de productos químicos, la sostenibilidad, el auge de los

productos ecológicos y el reconocimiento de la tradición artesanal como un valor en alza.

Así mismo, la incorporación de la mujer al mercado laboral, el envejecimiento de la población, el incremento de las familias monoparentales, el aumento de las comidas realizadas fuera del hogar en jornadas laborales y los nuevos estilos de vida han condicionado la organización de los hogares. La falta de tiempo para la preparación de las comidas ha llevado a incluir en la cesta de la compra más alimentos de conveniencia o “alimentos servicio”, entendiéndose como tales aquellos que representan un ahorro de tiempo en cualquiera de las etapas asociadas a una comida formal (compra, preparación, cocinado, presentación, recogida y limpieza). Hablamos de los productos alimenticios precocinados o preparados, aquellos de fácil y rápida elaboración y consumo.

La aparición y crecimiento de nuevos segmentos de consumo (inmigrantes, extranjeros, tercera edad) y los colectivos de población con necesidades y preferencias específicas (embarazadas, niños, alérgicos) han impulsado el desarrollo de alimentos funcionales, aquellos que se consumen como parte de una dieta normal y contienen componentes no nutritivos biológicamente activos, que ejercen un efecto beneficioso para la salud, previniendo la aparición de ciertas patologías y mejorando la actividad del organismo [3].

Las nuevas tecnologías ofrecen un panorama futuro nuevo, basado en la nutrición individual. La enorme diversidad de productos presentes en el mercado posibilita una alimentación personalizada, única y especial para el usuario, pudiendo adaptarse incluso a la satisfacción de los requerimientos en un momento dado del día o en una etapa concreta del ciclo de vida [3]. Esta es la realidad hacia la que se encamina un sector tan fragmentado en función de la demanda.

Situación del sector agroalimentario europeo

El conjunto de industrias de alimentación y bebidas tiene un elevado peso específico tanto a nivel económico como social en Europa. De hecho es el principal sector de producción de la Unión Europea, superando en facturación a las industrias químicas y de automoción. También tiene una gran relevancia en

términos de empleo, dando trabajo a más de cuatro millones de personas (CIAA Annual Report 2008).

A nivel nacional, según datos publicados por la Federación Española de Alimentos y Bebidas (FIAB), en 2008 la industria alimentaria española aglutinó el 17% de la producción industrial y el 17% del empleo. Es el primer sector industrial del país y ocupa por ventas el quinto puesto en Europa. Estas cifras convierten a la Europa Comunitaria en la primera potencia mundial tanto en producción como en exportación de productos alimenticios. Pero su liderazgo se está viendo amenazado. La fuerte competencia que supone la expansión de mercados emergentes, como Brasil y China, ha ralentizado su tasa de crecimiento y mermado el volumen de exportaciones. La pérdida en la última década de cinco puntos de cuota de mercado es un claro indicador.

Nos encontramos ante un sector maduro, donde el consumo crece poco, hay abundancia de oferta y un mercado internacional agresivo. Estas características configuran un entorno competitivo difícil.

Un rasgo común del sector alimentario europeo es su elevada atomización. En él coexisten empresas de tamaños muy diferentes. En términos generales, más del 99% de las compañías son pequeñas y medianas empresas, dentro de las cuales un porcentaje superior al 78% sólo alcanzan la categoría de microempresas.

Sin embargo la tendencia mundial es la inversa: la reducción del número de operadores y creación de corporaciones de gran dimensión, capaces de aprovechar las economías de escala y la productividad laboral.

Grado de competitividad: Europa frente al mundo

La clave, no sólo para evitar una mayor erosión de la cuota de mercado comunitaria sino para recuperar el terreno perdido, es que la industria agroalimentaria otorgue prioridad absoluta a la innovación.

La elevada fragmentación del sector alimentario europeo supone una debilidad estructural que merma su competitividad en los mercados. Sin embargo, se está produciendo un solapamiento simultáneo de dos fenómenos opuestos,

globalización y localización. Al mismo tiempo que la concentración empresarial y la unificación de los mercados tienden a homogeneizar los hábitos de compra y de consumo, crece también la demanda de productos diferenciados, de alta gama, locales, que ofrece oportunidades para las pequeñas y medianas empresas, capaces de responder a esta demanda y de adaptarse a las nuevas formas de producir.

La gran diversidad cultural y las arraigadas tradiciones alimentarias de varias regiones de la UE y de sus numerosas PYMES especializadas le otorgan una singular ventaja competitiva en el marco de las economías de diferenciación.

Innovar se ha entendido tradicionalmente como lanzar nuevos productos, una estrategia muy arriesgada y cada vez más difícil. Pero sin duda también innovar es identificar y construir nuevas formas de ser líder. Un modo de conseguirlo es desarrollar nuevos procesos y modelos de negocio para dar mejor respuesta al mercado. El reto por excelencia a corto plazo de las empresas agroalimentarias españolas es construir capacidades diferenciales y exclusivas que los líderes globales no puedan desarrollar con éxito, obteniendo un liderazgo de nicho en el que destaquen los altos niveles de calidad y salubridad de las producciones [4] [5].

La palanca de cambio: el marco regulatorio europeo

La manera de comer ha evolucionando, pero esta realidad no tiene por qué considerarse una amenaza, sino una oportunidad para renovarse. Hay que saber sacar partido a este nuevo escenario. La industria agroalimentaria debe apostar decididamente por la innovación en todos los eslabones de su cadena de valor, para conseguir incrementar su competitividad.

Esta es la estrategia que pretende impulsar el Séptimo Programa Marco comunitario de investigación y desarrollo tecnológico (7PM) para el periodo 2007-2013. Su objetivo principal es que la Unión Europea se convierta en el espacio de investigación más importante del mundo. Se pretende crear una bioeconomía basada en el conocimiento.

Dentro de este programa se presta apoyo a la cooperación transnacional en los principales ámbitos del progreso de los conocimientos y las tecnologías, siendo

la investigación el motor para superar los desafíos sociales, económicos, medioambientales, de salud pública e industriales que afronta Europa.

La alimentación es un campo temático fundamental del 7PM. Fomentar la colaboración conjunta de los científicos, los industriales y los demás agentes implicados es clave para explotar líneas de investigación emergentes. Una de las actividades incluidas específicamente en el programa de colaboración es “Del consumidor al agricultor: alimentos, salud y bienestar”.

“Smart Control for Improved Food and Feet Technologies” engloba aquellos proyectos cuyo propósito es la introducción de tecnologías innovadoras aplicables a la mejora de la calidad y la seguridad de los alimentos.

Innovación aplicada al control de procesos alimentarios

Ya se ha justificado previamente la imperiosa necesidad de fomentar la innovación para desarrollar aplicaciones dirigidas a mejorar el control de los procesos de fabricación, incrementar los rendimientos industriales, aumentar la productividad y elevar al mismo tiempo los niveles de seguridad en un sector globalizado y con una gran competencia como el alimentario.

La innovación se debe abordar como una herramienta estratégica de transformación de la empresa. Es el vehículo idóneo para acelerar la modernización tecnológica de la industria, lo que en definitiva determinará su capacidad de prosperar a corto y medio plazo y dará una justa medida de su potencial futuro.

Ahora bien, ¿qué significa innovar? Algunos autores defienden que es la acción de poner en práctica inventos (cualquier tipo de dispositivo mecánico o no) que incidan en la estructura de la producción y la organización. También incluyen en su acepción la aplicación del progreso técnico en el perfeccionamiento de inventos básicos. Dicho de otra forma, innovar es crear productos o procesos distintos de los existentes. En un proceso de fabricación el cambio debe radicar en permitir producir el mismo producto mejorando significativamente su calidad o su coste [5].

Insertado dentro de la definición, se ha plasmado un aspecto más de la innovación: la calidad, una cultura multidisciplinaria de mejora continua que involucra a todo el personal de la empresa, entendida tanto desde la perspectiva del grado de satisfacción del cliente como la del mínimo coste producido a la sociedad.

Innovación y calidad son pues dos términos interrelacionados, afines y sustentados por el cimiento común que constituye la optimización de recursos.

En el sector agroalimentario la calidad está asociada al concepto de seguridad alimentaria. Las empresas deben establecer sus propios mecanismos de trazabilidad y autocontrol para asegurar la inocuidad de su producción y la eficacia de sus muestreos. De este modo satisfacen las exigencias de calidad y seguridad alimentaria que demanda la sociedad actual en los productos que consume [4].

La aplicación de nuevas tecnologías para implementar sistemas de monitorización de procesos alimentarios otorga un valor añadido, al minimizar los costes de la “no calidad”. El término “costes de la no calidad” se define como la medida del gasto que soporta la organización como consecuencia de los errores internos (aquellos que son detectados antes de servir el producto, provocados por rechazos, reprocesados, reinspecciones, etc.) y externos (originados por entregas que no se adaptan a los requisitos o necesidades del cliente, fundamentalmente los derivados de las quejas, reclamaciones y devoluciones).

La industria de alimentación y bebidas ha sido considerada históricamente como industria *low-tech*. A ello ha contribuido sin duda el carácter tradicional, por tanto conservador y con grandes resistencias al cambio de las PYMES Europeas [5]. Sin embargo, beneficiándose de los avances tecnológicos de otros campos científicos más desarrollados como el de la biotecnología, en los últimos años está incorporando innovaciones. Actualmente los avances más importantes son los relacionados con la tecnología de la información y los próximos a la ciencia de la vida.

Existe un interés en la búsqueda de soluciones actuales que permitan controlar la seguridad y calidad de materias primas, procesos y productos terminados de forma más extensiva, brindando datos en tiempo real y permitiendo un acceso más próximo al alimento [6] [7].

Frente a las potentes técnicas instrumentales de análisis cualitativo y cuantitativo de alimentos (cromatografía, espectrofotometría, electroforesis etc.), con procedimientos engorrosos, de lenta respuesta por los largos tiempos que precisa el ensayo [6] y dependientes de personal especializado en el manejo de los equipos, la industria alimentaria necesita métodos rápidos, fiables y económicos para determinar propiedades fisicoquímicas en los procesos de control y asegurar la calidad del producto [8]. Además la mayoría de las veces estas técnicas clásicas de análisis requieren métodos destructivos dejando inservible la pieza en estudio. Por esta razón el desarrollo de sistemas de medida no destructivos es un objetivo constante en las investigaciones en diversos ámbitos de la industria alimentaria. También es altamente deseable y presenta una clara ventaja competitiva que las técnicas desarrolladas tengan un bajo coste y un funcionamiento sencillo.

En los últimos años numerosas investigaciones se han centrado en la búsqueda de métodos para evaluar propiedades fisicoquímicas de productos alimenticios basados en técnicas físicas y de análisis sensorial [9]. Shiinoki *et al.* [10] y Kent *et al.* [11] han desarrollado respectivamente una técnica basada en la transmisión de microondas para monitorizar on-line el contenido de sal en mantequilla y para evaluar el contenido de agua en carne de cerdo. Huang *et al.* [12] y Gaitán *et al.* [13] aplican la técnica de espectroscopía de infrarrojo cercano para cuantificar propiedades fisicoquímicas en salmón y carne respectivamente. Un procedimiento similar ha sido utilizado por Uddin *et al.* [14] para estudiar el nivel de agua y de proteínas en alimentos procesados. Vestergaard *et al.* [15] y Fulladosa *et al.* [16] han analizado el contenido de agua y de sal en carne curada mediante técnicas de tomografía computerizada. La medida de la conductividad eléctrica también ha sido aplicada a la industria alimentaria. Por ejemplo, Lantry *et al.* [17] investiga el contenido de agua en pescados y Shirsat *et al.* [18] determina el contenido de grasa en carne de cerdo.

Sin embargo, la mayoría de las técnicas indicadas previamente tienen considerables desventajas para su aplicación, como son su elevado coste, el tamaño de los equipos, la necesidad de establecer protocolos de seguridad para los operarios, la exigencia de llevar a cabo un calibrado previo del equipo de medida, etc. La realidad es que la suma de estos inconvenientes hace que los métodos ya mencionados sean incompatibles para su uso a nivel industrial, al ocasionar un coste de aplicación inasequible en el sector alimentario [19].

Para mejorar la competitividad de un tejido empresarial tan atomizado como el alimentario es imprescindible desarrollar sistemas de monitorización sencillos, fáciles de manejar, que recurran a técnicas de análisis no destructivas.

García-Breijo *et al.* [20] han desarrollado un método no destructivo para realizar medidas puntuales del contenido de sal basado en la medida de la conductividad eléctrica, empleando un electrodo de aguja concéntrica.

Frente a los métodos tradicionales de evaluación del proceso de curado del jamón ibérico, T. Antequera *et al.* [21] han desarrollado una técnica no invasiva mediante captura de imágenes por resonancia magnética con la que monitorizan el peso y la humedad durante su maduración.

La aplicación de sistemas electrónicos sensoriales en control de procesos alimentarios es prometedora. Los sensores (“lenguas y narices”) son una alternativa a los métodos convencionales debido a su especificidad inherente, sencillez y respuesta rápida. En los últimos años se han realizado considerables esfuerzos en el desarrollo lenguas electrónicas [22][23] como instrumentación analítica de bajo coste y de carácter no destructivo.

Uno de los objetivos futuros de esta tesis doctoral es presentar un prototipo industrial que reúna estas características y que sea capaz de determinar parámetros fisicoquímicos de productos alimenticios.

2. Espectroscopía de Impedancia

Macdonald *et al.* [24] define la espectroscopía de impedancia como un método de caracterización de las propiedades eléctricas de los materiales y de sus interfaces con los electrodos. Esta técnica consiste en aplicar un estímulo eléctrico a los electrodos, observar su respuesta y determinar sus propiedades, interacciones y dependencias con determinados factores. La respuesta eléctrica puede variar sustancialmente en función de las cargas presentes (iones libres), la microestructura y naturaleza del electrolito y la textura, geometría y naturaleza de los electrodos.

Las medidas de impedancia eléctrica [25] [26] determinan o infieren información acerca del tejido, siempre y cuando el evento en análisis presente un cambio en dimensión, en sus propiedades eléctricas o en su conductividad.

Las mediciones de impedancia eléctrica tanto en tejidos y sistemas biológicos como en otros campos han sido utilizadas durante décadas en una gran variedad de aplicaciones. El valor de las mediciones a una sola frecuencia es limitado y sujeto a muchos errores y variaciones [27]. Estas mediciones son más útiles para diferenciar grandes cambios en conductividad (por ejemplo para diferenciar tejido muscular de aire, de grasa, etc.) que para medir cambios estructurales en un solo tejido. La espectroscopía de impedancia, por el contrario, nos da una información mucho más completa de la estructura eléctrica del tejido permitiendo separar los componentes resistivos de los reactivos.

La impedancia se puede relacionar a nivel teórico con las propiedades dieléctricas de la materia. La impedancia es la oposición que presenta un determinado material al paso de una corriente a través de él. Es consecuencia directa de su composición y de su naturaleza interna (número de iones presentes, microestructura del electrolito, etc.). Su respuesta depende tanto de sus propiedades dieléctricas (conductividad y permitividad) como de las cualidades y factores geométricos de los electrodos determinados por la constante de celda.

La permitividad ε determina la tendencia de un material a polarizarse cuando se somete a un campo eléctrico y la conductividad σ es la capacidad de permitir el paso de corriente eléctrica a través de él. La conductividad está caracterizada por la dinámica de las cargas libres o iones móviles.

La expresión de la impedancia (Ecuación 1) está en función de estos dos parámetros y de la geometría de los electrodos [28].

$$Z = K_{cell} \frac{1}{\sigma + j\omega\varepsilon} \quad \text{Ecuación 1}$$

donde K_{cell} es la constante de celda medida en m^{-1} , definida por el cociente entre la distancia entre los electrodos y la superficie de los mismos; j es la unidad imaginaria ($\sqrt{-1}$) y ω la frecuencia angular.

La permitividad de un material habitualmente se da con respecto a la permitividad del vacío, $\epsilon_0=8,85 \cdot 10^{-12}$ [F/m] y la permitividad relativa, ϵ_r . La permitividad *absoluta* se calcula multiplicando la permitividad relativa por la del vacío.

Medida de la impedancia

El procedimiento experimental utilizado en espectroscopía de impedancia es el de aplicar una pequeña señal eléctrica senoidal (tensión o corriente) a un electrodo y medir su respuesta (corriente o tensión) a diferentes frecuencias obteniendo como resultado un valor de impedancia (Figura 1) para cada frecuencia (espectro de impedancia) [24][29].

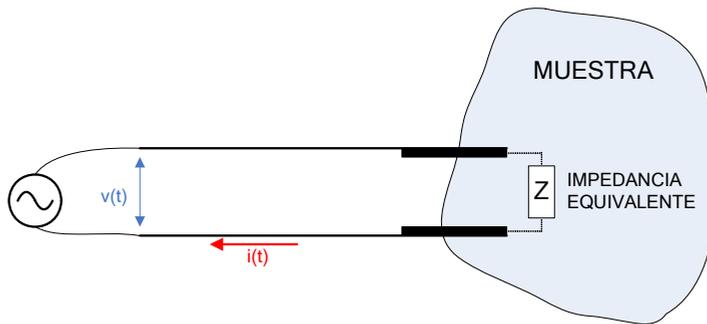


Figura 1. Medida de impedancia.

La relación entre la perturbación y la respuesta (Figura 2) caracteriza la impedancia eléctrica del material.

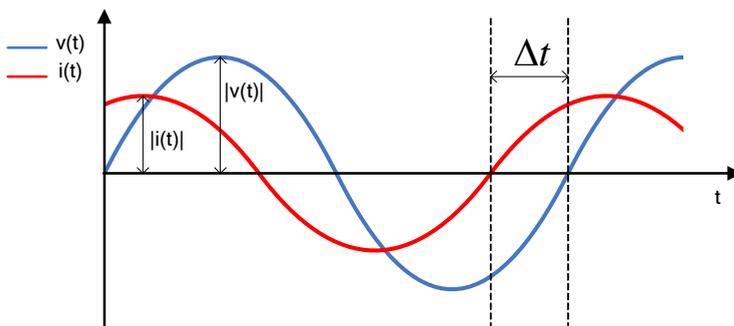


Figura 2. Evolución temporal de las señales de tensión y corriente.

Debido a las componentes capacitivas de los materiales se produce un desfase φ entre las señales, siendo por tanto la impedancia un valor complejo (Ecuación 2). La parte real de dicho valor se corresponde con los componentes resistivos de las muestras mientras que la parte imaginaria está relacionada con los componentes reactivos.

$$Z = |Z|e^{j\varphi} \quad \begin{cases} |Z| = \frac{|v(t)|}{|i(t)|} & \text{Módulo} \\ \varphi = 2\pi f\Delta t & \text{Fase} \end{cases} \quad \text{Ecuación 2}$$

En aquellas aplicaciones que requieren tiempos de medida cortos, por ejemplo ensayos donde se produce corrosión, se puede recurrir a la técnica multiseno [30]. En estos casos lo que se aplica al electrodo no es una señal senoidal sino una señal compuesta por la suma de varias señales senoidales de distintas frecuencias. Las señales de tensión y corriente recogidas en el electrodo son sometidas a un análisis FFT (*Fast Fourier Transform*), obteniendo el módulo y la fase de cada una de sus componentes frecuenciales. De esta forma con un solo ensayo se extraen los valores de impedancia del espectro de frecuencias deseado. Esta técnica permite reducir el tiempo de la medida pero plantea problemas cuando el comportamiento de la muestra es no lineal ya que no es posible detectar dichas no linealidades.

La impedancia tiene dos formas básicas de representación:

- Diagrama de Nyquist (Figura 3) donde en el eje de las abscisas se sitúan los valores de la parte real de la impedancia y en el eje de ordenadas los valores de la parte imaginaria.

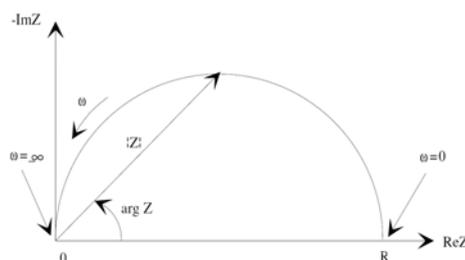


Figura 3. Diagrama de Nyquist. Representación de un espectro de impedancias. El semicírculo es característico de una constante de tiempo.

- Diagramas de Bode (Figura 4) donde se representa el módulo y la fase en función de la frecuencia.

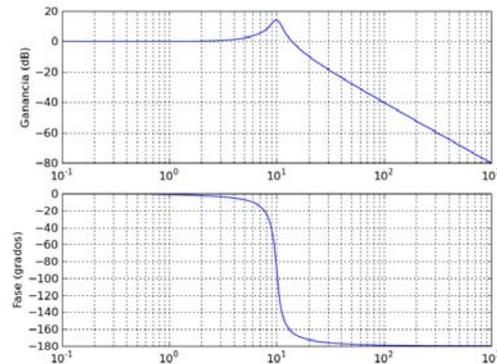


Figura 4. Diagramas de Bode representando el módulo y la fase de un espectro de impedancias.

2.1. Impedancia de los tejidos biológicos

Desde un punto de vista estructural, el principal componente de los tejidos biológicos es la célula. La mayoría de las células se unen entre sí mediante una matriz extracelular o bien por adhesión directa de una célula con otra para formar los tejidos (Figura 5).

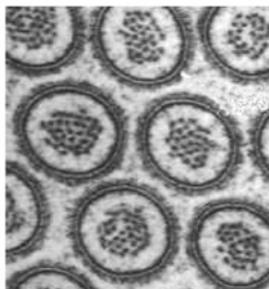


Figura 5. Vista al microscópico de una suspensión celular.

El principal componente de las células es su membrana celular (Figura 6). Su estructura de doble capa lipídica separa el medio intracelular del extracelular

(Figura 7). En la membrana se encuentran distribuidas proteínas encargadas de la formación de canales para un intercambio iónico con el exterior (ósmosis). Por tanto la membrana actúa como una interfase dieléctrica similar al modelo eléctrico de las placas de un condensador plano-paralelo. Es la membrana la que da las características dieléctricas a la célula [31].

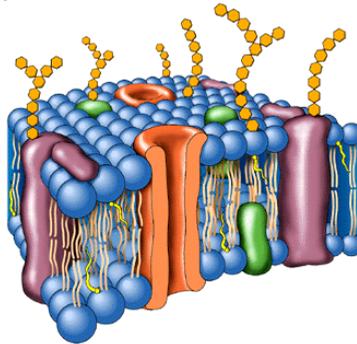


Figura 6. Esquema de la membrana celular

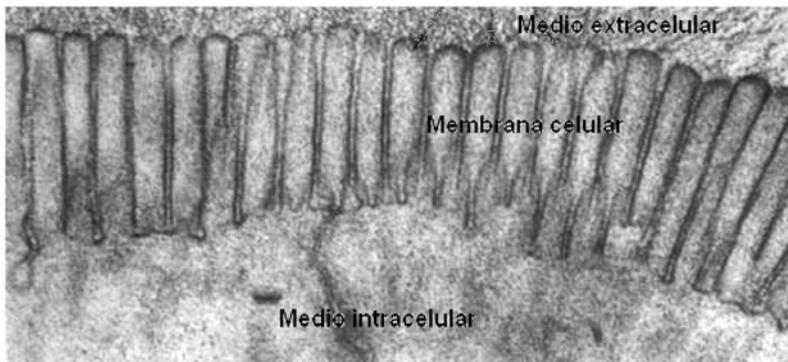


Figura 7. Vista al microscopio de la membrana celular separando ambos medios

El líquido intracelular está compuesto por agua, sales, proteínas, etc. El fluido extracelular está compuesto por agua y por productos metabólicos. Ambos medios se consideran soluciones electrolíticas, por tanto contiene iones libres que pueden migrar. La conductividad en estos medios líquidos está relacionada con la presencia de sales en disolución, cuya disociación genera iones positivos y negativos capaces de transportar la energía eléctrica si se somete el líquido a un campo eléctrico. Estos conductores iónicos se denominan electrolitos o conductores electrolíticos.

Los diferentes valores de impedancia que se observan a lo largo de todo el espectro en tejidos son atribuidos principalmente a los cambios en la conductividad de la membrana, debido a la polarización interfacial, a la movilidad de los iones y moléculas con carga (principalmente iones Na^+ , K^+ , Cl^-) y a los fenómenos de relajación producidos por las rotación dipolar y la rotación de partes de las macromoléculas [32].

Pliquett *et al.* [33] afirman que tanto el medio intra como el extracelular son un medio electrolítico con propiedades prácticamente resistivas y, por ello, cualquier variación de la fase o componente capacitiva de la impedancia da una idea directa del estado de la membrana. Exponen un método de evaluación de la integridad de la membrana mediante un parámetro que denominan P_y que da una idea del porcentaje de células que tienen la membrana intacta.

Al aplicar a la suspensión celular una señal de baja frecuencia [34], los iones tienen tiempo de polarizar la membrana, creando una fuerte oposición al paso de corriente. Esto da como resultado una circulación de corriente por el exterior de la célula y por tanto una impedancia elevada en la medida. En cambio cuando la medida se hace a altas frecuencias los iones no tienen tiempo de polarizar la membrana, la membrana pierde sus propiedades aislantes y ésta no ofrece tanta resistencia al paso de la corriente, obteniendo una impedancia menor (Figura 8), que hace posible manifestar el aspecto capacitivo de la membrana. Dependiendo del tipo de tejido, tamaño de las células y espacio entre ellas, la corriente empieza a circular por el interior de las células a una frecuencia determinada. Así, se puede asociar una frecuencia característica para cada tejido.

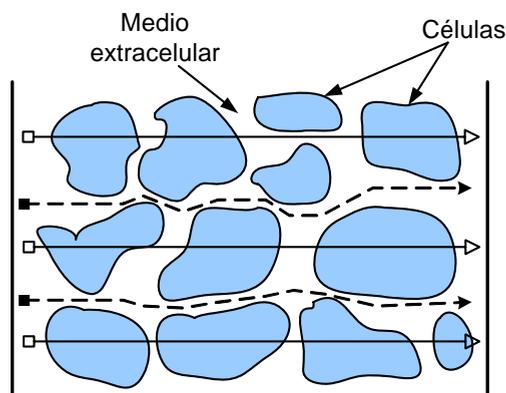


Figura 8. Circulación de la corriente a alta frecuencia (línea continua) y baja frecuencia (línea a trazos) a través de una estructura celular.

Dicho de otro modo: La reactancia capacitiva de la membrana decrece gradualmente con el incremento de la frecuencia. La reducción del valor de la impedancia del tejido es notable cuando la frecuencia alcanza un determinado nivel. Si la frecuencia es suficientemente alta el efecto de la capacitancia de la membrana puede ser despreciado y la impedancia se vuelve independiente de la frecuencia.

Este comportamiento diferente en frecuencia se refleja en una variación en el espectro de impedancia del conjunto celular. La variación de la impedancia, llamada *relajación*, se encuentra en unas frecuencias determinadas. El fenómeno de relajación en los tejidos es el resultado de la polarización de los dipolos y del movimiento de las cargas, que inducen un fenómeno de conducción. Los portadores de cargas son principalmente iones y la fuente principal de dipolos son las moléculas polares del agua.

A bajas frecuencias, el valor total de la impedancia corresponde a la suma de todos los procesos de polarización. A medida que la frecuencia de excitación aumenta, los procesos de polarización más lentos (con una constante de tiempo τ más grande) dejan de ser capaces de seguir al campo, y por tanto, dejan de contribuir al valor total de la impedancia. A altas frecuencias, sólo los procesos con una dinámica muy rápida subsisten.

H. P. Schwan [35] definió tres regiones frecuenciales en las que la permitividad y conductividad del tejido cambiaban significativamente de valor. Estas tres regiones o dispersiones* se conocen como α , β y γ . La mayoría de los tejidos biológicos se ajustan a este patrón espectral, que se muestra en la Figura 9. Las tres bandas no siempre se pueden vincular a fenómenos biofísicos o procesos electroquímicos. No obstante, la dispersión es causada por fenómenos de relajación.

* Se le llama *dispersión* a la dependencia de la impedancia con la frecuencia.

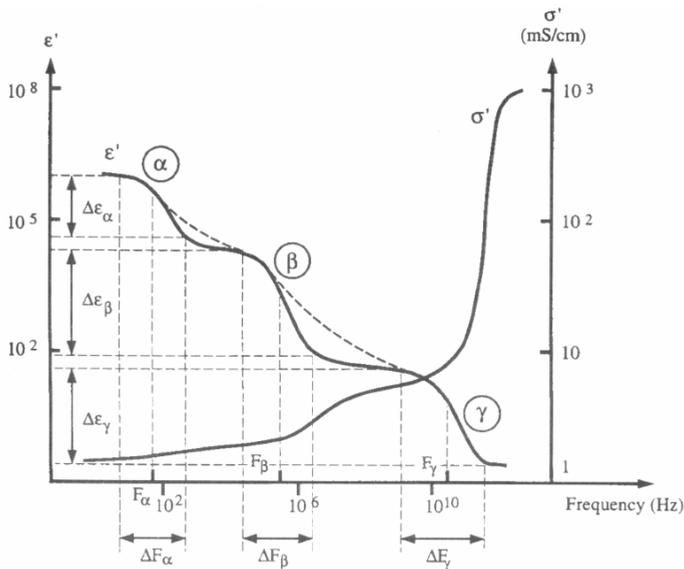


Figura 9. Gráfica de la permitividad y de la conductividad de tejidos biológicos en función de la frecuencia.

- Dispersión “ α ” (<10kHz) asociada a rasgos macroscópicos, es debida a fenómenos de difusión/conducción iónica de los iones que envuelven a la membrana. La célula es poco conductora comparada con el medio extracelular. Expresa la relajación de los dipolos no permanentes que se forman durante el flujo iónico a través de las superficies de las células.
- Dispersión “ β ” (1KHz-10MHz) asociada a la estructura del tejido también llamada *relajación estructural*, es una medida directa del comportamiento capacitivo de la membrana. Está estrechamente ligada a las propiedades de la membrana celular y a la forma de agrupación para la formación de tejidos. Estos fenómenos de relajación son causados por el efecto Maxwell-Wagner* que provoca la polarización de la interfase. Es la relajación de la cual se puede extraer mayor información estructural de la suspensión celular.

* Se presenta en muestras heterogéneas (células suspendidas en líquidos) en las que las cargas se desplazan con tendencia a acumularse en las interfaces de separación de los componentes del tejido. En tal caso, la distinta permitividad entre zonas provoca que se acumulen cargas como si de pequeños condensadores se tratara.

- Dispersión “ γ ” (>1MHz) asociada a la estructura molecular. Derivada de los fenómenos de relajación de las moléculas dipolares permanentes, como las moléculas de agua predominantes en los tejidos biológicos.

Modelo eléctrico

Este comportamiento eléctrico obedece a la *ley de Debye* obteniendo un modelo eléctrico [36] que representa los diferentes fenómenos de conducción eléctrica que tienen lugar en la célula. De forma aproximada se puede modelizar la impedancia mediante circuitos eléctricos denominados *modelos de parámetros concentrados*. En la Figura 10 se puede observar uno de los circuitos eléctricos más utilizados, el modelo de Fricke. Consiste en una resistencia para simular el comportamiento del medio extracelular (R_e), otra para el medio intracelular (R_i) y una capacidad para la membrana (C_i).

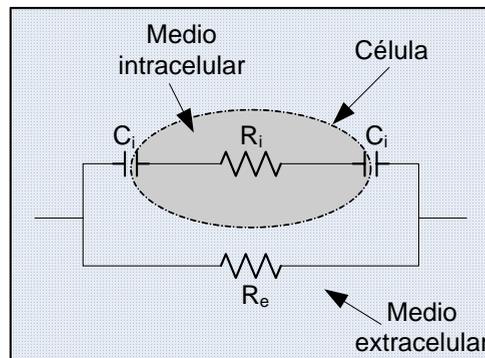


Figura 10. Modelo que representa los principales mecanismos que determinan la impedancia de una suspensión celular

A bajas frecuencias la impedancia de la suspensión celular es R_e mientras que a altas frecuencias la impedancia tiende a ser el paralelo entre R_e y R_i disminuyendo por tanto la impedancia total.

Existen otras representaciones de modelos eléctricos [37] en función de la permitividad, como la ecuación de Debye (Ecuación 3).

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_0 - \varepsilon_\infty}{1 + j\omega\tau} \quad \text{Ecuación 3}$$

donde ε_∞ y ε_0 son la permitividad a alta y baja frecuencia respectivamente y τ el tiempo de relajación*.

Si además se añade el efecto de la conductividad estática, σ_s , debido a las corrientes de conducción por las imperfecciones del dieléctrico [38], la ecuación de Debye queda como la mostrada en la Ecuación 4.

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_0 - \varepsilon_\infty}{1 + j\omega\tau} - j \frac{\sigma_s}{\omega\varepsilon_0} \quad \text{Ecuación 4}$$

Sin embargo, ya que los tejidos biológicos son medios heterogéneos que involucran diversas constantes de tiempo (diferentes procesos de relajación) [39], la función más utilizada es la denominada ecuación empírica de la permitividad de Cole-Cole (Ecuación 5).

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_0 - \varepsilon_\infty}{1 + j\omega\tau_c^{(1-\alpha)}} - j \frac{\sigma_s}{\omega\varepsilon_0} \quad \text{Ecuación 5}$$

donde α es un parámetro empírico (cuyo valor puede variar de 0 a 1) característico de la distribución de la frecuencia central de relajación, f_c $\left(\tau_c = \frac{1}{2\pi f_c} \right)$ y del comportamiento no estrictamente capacitivo

de las membranas debido a las pérdidas dieléctricas, que da una idea del grado de dispersión de las constantes de tiempo asociadas al fenómeno de relajación y de la homogeneidad del dieléctrico (las células no son todas iguales). Si $\alpha=0$,

* Se define el tiempo de relajación τ como el intervalo de tiempo que caracteriza la restauración de un sistema perturbado a su configuración de equilibrio, cuya amplitud de oscilación en torno al equilibrio toma la forma $e^{-\frac{t}{\tau}}$ y la frecuencia de relajación el valor inverso del tiempo de relajación.

indica que sólo hay una constante de tiempo y la expresión compleja de la permitividad coincide con la ecuación de Debye.

Es muy útil recurrir a la representación de los fenómenos por medio de circuitos equivalentes, para obtener una visión clara. Una relajación se obtiene por medio de un circuito equivalente RC paralelo. La frecuencia de relajación corresponde a la condición de igualdad entre la resistencia y la impedancia capacitiva.

La parte real (Ecuación 6) e imaginaria (Ecuación 7) de la permitividad se obtiene despejando de la ecuación de Debye.

$$\epsilon'(\omega) = \epsilon_{\infty} + \frac{\epsilon_0 - \epsilon_{\infty}}{1 + \omega^2 \tau^2}$$

Ecuación 6

$$\epsilon''(\omega) = \frac{\epsilon_0 - \epsilon_{\infty}}{1 + \omega^2 \tau^2} \omega \tau$$

Ecuación 7

La Figura 11 muestra un proceso de relajación según el modelo de Debye. La parte de la izquierda representa la permitividad real e imaginaria frente a la frecuencia (diagrama de Bode). El gráfico de la derecha la permitividad en el plano complejo (diagrama de Nyquist o Cole-Cole).

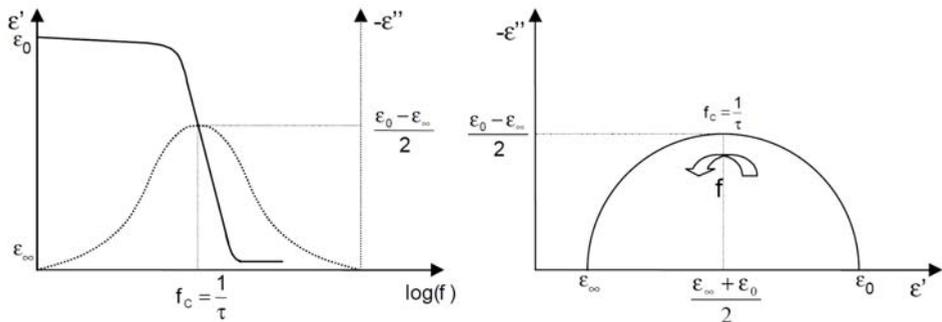


Figura 11. Representación de la ecuación de Debye. Diagrama de Bode y Nyquist para un dieléctrico perfecto.

El máximo de ϵ'' se obtiene en: $f_c = \frac{1}{\tau}$ que es la frecuencia de relajación.

Teniendo en cuenta la relación existente entre la impedancia y la permitividad, estas mismas ecuaciones pueden ser reescritas en función de los componentes eléctricos del modelo de Fricke (Ecuación 8).

$$Z = R_{\infty} + \frac{R_0 - R_{\infty}}{1 + j\omega\tau_c^{(1-\alpha)}} \quad \text{Ecuación 8}$$

Donde R_0 y R_{∞} son la impedancia a baja y alta frecuencia respectivamente. Basándose en el modelo de Fricke, los parámetros de la ecuación Cole-Cole [32] son los siguientes:

$$\tau = (R_i + R_e)C_i \quad R_0 = R_e \quad R_{\infty} = \frac{R_e R_i}{R_e + R_i}$$

A nivel mundial hay multitud de grupos de investigación que persiguen relacionar las propiedades eléctricas de productos alimenticios con componentes eléctricos. Por poner un ejemplo, en los trabajos de Bauchot *et al.* [40] y Chevalier *et al.* [19] modelizan mediante parámetros eléctricos los tejidos del kiwi y del salmón; Lepetit *et al.* [41], Whitman *et al.* [42] estandarizan carne de vaca y cerdo respectivamente y Wu *et al.* [25] caracterizan las propiedades fisiológicas de la pulpa de la berenjena mediante un modelo de elementos agrupados.

Tejido vivo vs. tejido muerto

Todas las observaciones previas se vinculan a tejidos biológicos vivos. En tejidos muertos pueden presentarse variaciones en las respuestas obtenidas. En función del tiempo *post-mortem* transcurrido, como consecuencia del cese de los procesos electroquímicos y biológicos, la degradación de las proteínas y la pérdida de agua*, es posible que el comportamiento de la impedancia no sea el esperado.

Martinsen *et al.* [43] evaluaron la frescura del pescado eglefino después del sacrificio, midiendo las propiedades eléctricas del músculo desde 1Hz hasta 100kHz, y detectaron cambios considerables en las propiedades eléctricas del

* En la literatura científica se puede encontrar el término *wet* (húmedo) asociado a los tejidos vivos y *dry* (seco) a los tejidos muertos.

músculo. Las dispersiones α y β (Figura 9) habían desaparecido después del periodo post-mortem.

Diversos estudios [44][45] han demostrado los cambios en la impedancia de los tejidos antes y después de su muerte. Se produce un cambio estructural en proteínas que desencadena la desnaturalización de la membrana. En un mismo tejido vivo o muerto apenas hay diferencias de resistencia a frecuencias altas (R_∞), pero si pueden ser importantes los incrementos de su resistencia a frecuencias bajas (R_0) por lo que el arco del espectro de impedancias en el plano complejo (diagrama de Nyquist) tiende a desaparecer.

Conocer los cambios fisiológicos que se producen en los tejidos a través del estudio de las propiedades eléctricas durante estas etapas puede resultar útil en diversas áreas, entre otras en medicina para el diagnóstico de órganos y la valoración del estado muscular o en alimentación para determinar la frescura de carne y pescado, etc.

En esta tesis se mide la impedancia de alimentos (carne picada, muestras de lomo, filetes de pescado). Los resultados obtenidos guardan una estrecha relación con lo expuesto en este apartado. Sin embargo no es objeto de esta tesis establecer una relación directa entre los modelos teóricos de los tejidos celulares y los valores de impedancia obtenidos. Tanto la complejidad de los sistemas medidos como la geometría de los electrodos utilizados hacen extremadamente difícil el desarrollo de modelos teóricos fiables.

2.2. Aplicaciones de la espectroscopía de impedancia

La espectroscopía de impedancia aunque es una técnica que se conoce desde hace muchos años, ha experimentado un gran “crecimiento” gracias en gran parte a la aparición de sistemas electrónicos de gran precisión y exactitud y con una alta velocidad de procesamiento que hacen posible las exigencias de esta técnica.

Los campos de aplicación de la espectroscopía de impedancia son muchos y muy variados. La medicina es posiblemente el sector que la ha empleado con más asiduidad. Se ha usado para caracterizar parámetros de amplia divulgación

popular. Un claro ejemplo es su utilización en el análisis de la composición corporal [46]. Es frecuente encontrar en farmacias básculas con asideros para colocar las manos. En esta empuñadura se sitúan los electrodos necesarios para calcular la impedancia corporal, que estima la cantidad de grasa, músculo y líquido de un individuo. Incluso existen ya básculas domésticas con electrodos en la superficie de la plataforma, que realizan la medida al colocar los pies descalzos.

Igualmente se ha recurrido a ella para, a través de la evaluación de la capacidad pulmonar, poder identificar disfunciones en regiones pulmonares [47]. Se coloca una serie de electrodos a lo largo del perímetro del pecho del paciente. Sucesivamente se aplica corriente en dos de ellos y se mide la tensión en los restantes. El resultado final es una imagen de impedancia casi en tiempo real.

También es una técnica muy útil en la hemodiálisis. Permite determinar la cantidad de líquido que se debe extraer al paciente así como monitorizar y controlar el ritmo de extracción de este líquido [48]. Además, es apto como sistema de vigilancia de su estado nutricional y método de ajuste del aporte de proteínas requerido [49]. Se coloca un medidor de bioimpedancia en tres regiones del cuerpo. Los cambios que se produzcan indican si el ritmo de extracción es el adecuado o no.

Se han presentado diversos estudios que explican los cambios fisiológicos producidos durante la isquemia al relacionarlos con los cambios experimentados en las propiedades eléctricas de los tejidos, demostrando así que esta técnica puede dar lugar a nuevos métodos de medida eléctrica para la monitorización de procesos fisiológicos. En esta línea se desarrollan los trabajos de S. Othman *et al.* [27] y S. Kun *et al.* [50]. El primero analiza el daño y los cambios estructurales en un tejido causados por isquemia y otras patologías y el segundo mide los cambios en la isquemia o perfusión de tejidos. E. Gersing [51] considera que la espectroscopía de impedancia eléctrica es una técnica capaz de cuantificar el nivel de isquemia. Martinsen *et al.* [43] auguran que la medida de las propiedades eléctricas de órganos y tejidos de animales durante la isquemia constituirá sin ninguna duda la base de las nuevas herramientas de diagnóstico y de evaluación de calidad de los alimentos en el futuro.

I. Szymanska *et al.* [52] aplican la espectroscopía de impedancia junto con la voltametría cíclica como herramienta de análisis para la determinación de la eficacia de nuevos medicamentos para el tratamiento del Alzheimer.

Desde 1992, varias investigaciones han pretendido determinar el potencial de la espectroscopía de impedancia como método de detección de cáncer de mama. McRae y Estrick [53], Blad y Balterop [54] y Heinitz y Minet [55] emplearon la parametrización de Cole-Cole en la caracterización de tejidos cancerosos. Chaudhary *et al.* [56], R. Pething [34] y J. Jossinet *et al.* [57] han identificado las propiedades dieléctricas de tejidos mamarios humanos malignos y normales en un amplio rango de frecuencias con el fin de establecer un patrón de diferenciación.

T. E. Kerner *et al.* [58] y Surowiec *et al.* [59] examinan su capacidad como herramienta de diagnóstico del carcinoma de mama humano. Ambos concluyen que el tejido canceroso tiene mayor permitividad y conductividad que el tejido normal, lo que posibilita su diferenciación.

La industria de los metales también se ha valido de esta técnica para determinar y monitorizar el mecanismo de corrosión. Para Deflorian *et al.* [60] la espectroscopía de impedancia constituye una herramienta eficaz para entender el proceso de corrosión de los recubrimientos orgánicos de metales reactivos. Carullo *et al.* [61] presentan un instrumento portátil, de bajo coste, apto para controlar la corrosión mediante el análisis rápido de la impedancia.

La espectroscopía de impedancia ha sido ampliamente utilizada para caracterizar propiedades de materiales sólidos, como los referidos a continuación.

En ingeniería cerámica se ha adoptado como recurso para estudiar las propiedades eléctricas del policristalino $\text{Bi}_6\text{Fe}_2\text{Ti}_3\text{O}_{18}$ en el rango de temperatura de 30-550 °C [62] y Prabakar *et al.* [63] examinaron la impedancia de muestras duras y blandas de PZT cerámico comercial antes y después de la fatiga a determinados rangos de temperatura.

Ha servido para observar el comportamiento de ciertos materiales de construcción al someterlos a bajas temperaturas. Concretamente, Coverdale *et al.* [64], en base a medidas de espectroscopía de impedancia, estudiaron la evolución de las propiedades dieléctricas de pastas hidratadas de cemento portland durante el enfriamiento desde temperatura ambiente hasta -50 °C.

También se ha empleado para estudiar la evolución de la impedancia eléctrica del silicio poroso al someterse a un sobrecalentamiento [65].

Los trabajos realizados por S. Takashima *et al.* [66] para determinar los cambios producidos en la permitividad de ciertos aminoácidos y proteínas conforme se incrementa la absorción de agua han concluido que se producen incrementos proporcionales tanto en el parámetro dieléctrico como en el agua absorbida hasta que se completa la primera capa de absorción. Las capas posteriores ya no provocan alteraciones significativas en la permitividad.

Espectroscopia de impedancia aplicada a la industria alimentaria

En lo que respecta a la tecnología de alimentos, la espectroscopía de impedancia es una técnica de control y análisis con diversas aplicaciones. Mediante la correcta interpretación de la medida de la bioimpedancia puede lograrse la caracterización de un proceso complejo, la determinación de propiedades fisicoquímicas o sensoriales e incluso el establecimiento de procedimientos de control que permitan garantizar la calidad del alimento mediante la monitorización en línea y el seguimiento en tiempo real de toda la producción.

Desde los años 80 diferentes estudios han evaluado el contenido en grasa en animales. La grasa es un buen aislante eléctrico y juega un papel importante en la impedancia de los tejidos. Se han realizado estimaciones de grasa en carne de cerdo y vaca midiendo la resistividad de los tejidos [67] [68]. También se han hecho estudios post-mortem del contenido en grasa que han alcanzado una precisión del 95%, debido a que inmediatamente después del sacrificio del animal no existe modificación de las membranas o compartimentos extracelulares [69].

Según Damez *et al.* [70] la medida de la bioimpedancia puede considerarse un parámetro válido para estimar el envejecimiento de la carne de ternera. El mismo autor profundizó en el estudio del envejecimiento de carne de ternera observando específicamente los cambios de la conductividad [32]. El envejecimiento de la carne induce cambios estructurales que desencadenan una disminución de las propiedades aislantes de las membranas celulares. La mezcla de electrolitos intra y extra celulares ocasiona una variación de las propiedades eléctricas medible mediante espectroscopía de impedancia.

Otros autores consideran que la medida de la impedancia bioeléctrica es capaz de proporcionar un método de predicción preciso y rápido del rendimiento de

las canales de ternera, pudiendo clasificarlas en función de su productividad [71].

Chanet *et al.* [72] consideraron que la espectroscopía de impedancia aportaba una mejora al proceso de fabricación de carne de cerdo picada enlatada. Mediante esta técnica era posible estimar en contenido de agua y lípidos de la carne y por tanto conocer su composición. Disponer de esta información permite establecer medidas correctoras previas al enlatado del alimento en caso de detectarse desviaciones significativas.

Se han realizado ensayos para evaluar si la espectroscopía de impedancia medida en piezas de jamón no curadas (tras 36 horas post mortem) puede predecir determinadas propiedades sensoriales del jamón curado [73]. Tras el procesado de los datos se obtuvo una relación entre ciertos parámetros eléctricos y atributos relacionados con la textura, que podría dar lugar a establecer un criterio de selección de la materia prima.

Del mismo modo, Oliver *et al.* [74] demostraron la correlación existente entre la impedancia eléctrica y la aptitud tecnológica de la carne para someterse a un proceso de curado. Sugirieron así un criterio de selección de piezas de carne para la obtención de jamón.

Harker y Maindonald [75] han realizado mediciones de impedancia eléctrica para caracterizar los cambios en el estado de las membranas y en la resistencia intracelular y extracelular, así como los cambios durante la maduración de las nectarinas. Estas medidas se relacionan con los cambios en la textura del fruto evaluados por su firmeza. Con la misma intención Bauchot *et al.* [40] se han centrado en el estudio de la impedancia para evaluar la maduración del kiwi.

Otro trabajo consiguió establecer una relación directa entre el grado de dilución del puré de manzana pasteurizado y ciertos parámetros eléctricos [76]. El modelo eléctrico fue capaz de discriminar todas las diluciones.

En la elaboración de cava y cerveza la medida de la bioimpedancia se emplea como indicador de la concentración de levaduras presente en el tanque de fermentación [77].

Wu *et al.* [25] analizan las características de la pulpa de la berenjena bajo tratamiento de congelación y descongelación mediante la técnica de

espectroscopía de impedancia. Después del tratamiento los valores de impedancia de las muestras pierden su carácter original, mostrando un comportamiento independiente de la frecuencia, lo que verifica que las membranas de las células fueron severamente dañadas en el proceso de congelación.

Se ha aplicado la espectroscopía de impedancia para dimensionar los daños producidos en la patata al someter al tubérculo a un proceso de congelación a temperatura de $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$. La impedancia correspondiente a los tejidos congelados fue muy elevada [78].

También se han analizado los cambios producidos en varios parámetros dieléctricos de diferentes tipos de pescado durante su almacenamiento para establecer su grado de frescura [79]. Este método ofrece una medición *in situ* sencilla para determinar el inicio de la descomposición. Swatland *et al.* [80] evalúan la frescura de pescado post-mortem mediante impedancia eléctrica, concluyendo que los cambios producidos en la estructura celular son debidos a las pérdidas en la capacitancia de la membrana celular.

Vidacek *et al.* [81] estudian la impedancia de piezas de lubina sometidas a distintos procesos de congelación (rápido y lento) y a diferente número de ciclos de congelación y descongelación. Chevalier *et al.* [19] estima el contenido de sal y humedad en salmón.

H. Lizhi *et al.* [82] han examinado la capacidad de la espectroscopía de impedancia para identificar la adulteración del aceite de oliva. Los resultados fueron concluyentes. La técnica podría utilizarse para discriminar adulteraciones incluso para proporciones de adulterantes inferiores al 5%.

Toyoda *et al.* [83] han desarrollado un método sencillo de control de la fermentación de masas panarias, secuenciando todo el proceso y formulando los parámetros dieléctricos asociados a una óptima producción y retención de gas.

La espectroscopía de impedancia ha propiciado la creación de un sistema automático de monitorización en línea para elaboración del yogur [84]. Se ha probado la estrecha relación existente entre la impedancia y los parámetros básicos de control del proceso (acidez y consistencia). Otra ventaja de este sistema frente al método tradicional es su limpieza y su carácter no destructivo.

3. Lenguas electrónicas en la industria alimentaria

Los sensores electrónicos, tanto las lenguas electrónicas (de naturaleza potenciométrica o voltamétrica) [85] como los sistemas basados en espectroscopía de impedancia, están siendo actualmente objeto de estudio. El hecho de que puedan emplearse como herramientas de análisis en la industria alimentaria, favoreciendo el control de procesos y la evaluación de la calidad de los productos, los convierte en una excelente alternativa a las técnicas clásicas de control. Otros factores a valorar muy positivamente son que no requieren el empleo de mano de obra cualificada, lo que se traduce en una reducción de costes y que proporciona determinaciones instantáneas, eliminando el tiempo empleado en la realización de los análisis. El desarrollo de sensores basados en estas técnicas permite disponer de métodos de medida fiables, rápidos y no destructivos. Además, la posibilidad de obtener medidas *on-line* que habiliten la toma de decisiones rápidas o el establecimiento de medidas correctoras en función de la marcha del proceso, permite aumentar el rendimiento productivo y alcanzar un mayor grado de uniformidad en los productos terminados, un atributo de calidad final muy valorado.

Ambos sensores electrónicos están basados en el mismo principio [86][87]. Las lenguas electrónicas están formadas por un conjunto de electrodos no selectivos con diferentes grados de sensibilidad a múltiples propiedades. Esta *sensibilidad cruzada* significa que el sensor no responde sólo a un analito sino a diferentes sustancias presentes en el medio. La respuesta de este conjunto de electrodos ofrece una huella electrónica característica para cada especie. La suma de todas las huellas permite establecer un patrón de reconocimiento. Con el adecuado tratamiento estadístico de los datos se obtiene un análisis tanto cualitativo como cuantitativo. La diferencia entre las lenguas electrónicas y los sistemas basados en espectroscopía de impedancia es que en estos últimos el conjunto de electrodos se reduce a uno. Al realizar determinaciones de impedancia en un rango de frecuencias predeterminado, se crea un espectro.

Existen discrepancias en la comunidad científica respecto a cuál debe ser la definición de este tipo de sensores electrónicos. Esta falta de consenso queda plasmada en el trabajo de Gutés *et al.* [88]. Ciertos investigadores califican las lenguas electrónicas como *sistemas multiparamétricos*, por su capacidad de analizar varios componentes con una sola medida. Sin embargo otros científicos, principalmente los japoneses, prefieren emplear para su descripción

el término *taste sensor* o *sensor de gusto*. Atendiendo a esta segunda denominación, el sistema de medida desarrollado en esta tesis puede considerarse una lengua electrónica.

En los últimos años se están llevando a cabo investigaciones para evaluar el uso de lenguas electrónicas como herramientas analíticas aplicables en el control de productos sólidos, tales como la carne, frutas y verduras [89][90][91]. En los trabajos de Barat *et al.* [92] y Gil *et al.* [93] se utiliza una lengua potenciométrica de electrodos metálicos para la monitorización de la frescura del pescado blanco.

3.1. Características generales de un sistema de medida basado en la técnica de espectroscopía de impedancia

La espectroscopía de impedancia es una técnica analítica basada en la medida de la impedancia de una muestra sometida a un barrido de frecuencias [94][95][96][97][98][99]. Para su determinación tradicionalmente se empleaba un puente de demodulación síncrona, que hacía posible convertir las medidas realizadas a altas frecuencias en magnitudes equivalentes referenciadas a bajas frecuencias.

Se partía de dos señales senoidales sincronizadas con una pequeña diferencia de frecuencia. Una de ellas se aplicaba a la muestra. La medida de la diferencia de potencial obtenida al atravesar una impedancia de referencia (de valor conocido) constituía la corriente de excitación. La segunda señal se empleaba para demodular los potenciales medidos, que requerían el uso de amplificadores de instrumentación. Las señales demoduladas guardaban la información en amplitud y fase de la muestra a la alta frecuencia original pero trasladada a la frecuencia diferencia, lo que permitía su fácil digitalización y captura mediante tarjetas de adquisición de datos comerciales insertadas en un PC. Por último, el ordenador reconstruía los espectros de amplitud y fase originales en base a las señales recogidas.

Hoy en día estas técnicas de medida de la impedancia están evolucionando [100], debido a la mejora de la eficiencia de los convertidores analógico-digital, al uso de técnicas de procesamiento digital y al rápido desarrollo de potentes

sistemas electrónicos de procesamiento digital (microprocesadores, DSP' y dispositivos de lógica programable), que ahora pueden realizar miles de millones de operaciones por segundo.

La medida de la impedancia es un tema relevante, prueba de ello son los diversos trabajos publicados recientemente. Radil *et al.* [101] y Arpaia *et al.* [102] han proyectado un medidor de impedancias. El primero mediante un DSP, utilizando un *direct digital synthesizer* para generar las señales senoidales. El segundo emplea un microcontrolador de 32 bits. Hoja *et al.* [103] desarrolla un analizador de espectroscopía para medidas de *alta* impedancia. Ramos *et al.* [104][105] en sus trabajos implementan el diseño analógico de un analizador de impedancia para minimizar la dependencia con la frecuencia. La máxima frecuencia de generación a la que trabajan todos estos espectrómetros está por debajo de los 100KHz. Concretamente 4,5KHz para [102], 10KHz para [101] y [104][105] y 100KHz para [103].

Para el diseño del sistema de medida desarrollado en esta tesis se ha optado por la utilización de técnicas digitales, dada la gran capacidad de procesamiento y almacenamiento de los dispositivos digitales actuales. Se han empleado tanto para la generación de la señal a aplicar a los electrodos como para el posterior muestreo. Para el cálculo de la información de amplitud y fase se ha requerido un procesamiento en software. Las técnicas analógicas se emplearon sólo para la acomodación de señales. A diferencia de los trabajos anteriormente citados, la máxima frecuencia de trabajo empleada para la generación de señales ha sido de 1MHz con una frecuencia de muestreo de 25MHz*. En el siguiente capítulo se desarrolla ampliamente el sistema de medida desarrollado.

Otros autores, sin embargo estudian las propiedades eléctricas de los materiales con equipos comerciales centrando el diseño en los electrodos y en el software de la aplicación. Este es el caso de Wu *et al.* [25], que utilizan un tester LCR Hioki 3532-50 capaz de realizar medidas de impedancia automáticas de 50 puntos en un rango de 42Hz a 5MHz con señales de 1V de amplitud.

* Radil y Ramos [104][101][105] muestrean a 96 KS/s a la máxima frecuencia de generación, 10KHz (9.6 puntos por periodo).

3.2. Métodos de medida de impedancia

Existen varios métodos de medida de impedancia (Figura 12). Los más comunes son el análisis de redes, la medida en puente, la medida de I-V, el puente autobalanceado y la resonancia [106].

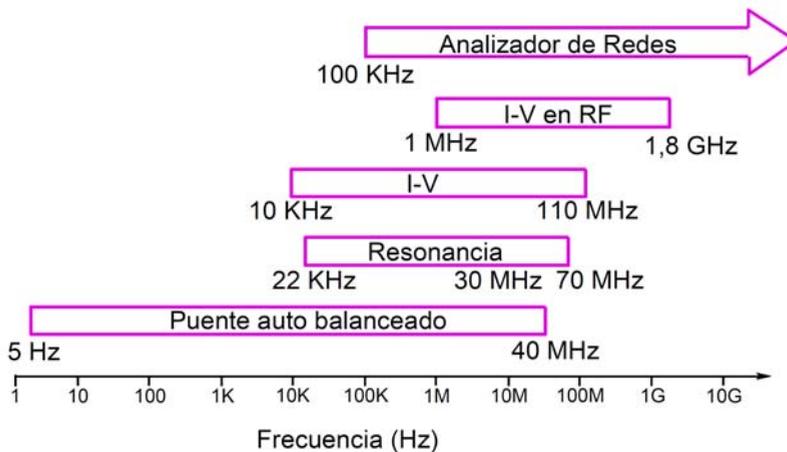


Figura 12. Técnicas de medición de impedancia.

El método de *resonancia* se aplica colocando la impedancia incógnita en serie con una bobina y un condensador. Este último que se ajusta hasta que el circuito entra en resonancia. Una vez conocidos los valores de la tensión en el condensador, la frecuencia y la bobina se puede determinar la impedancia. Esta técnica tiene ciertas limitaciones. Por un lado, es difícil conseguir bobinas con factores de calidad aceptables. Por otro, no se puede emplear a bajas frecuencias. Es un sistema habitual en la medición de determinados componentes electrónicos.

El método de *análisis de redes* es el que admite las frecuencias más elevadas. El valor mínimo de frecuencia en el que puede aplicarse es de 100 kHz. Su exactitud supera a los demás sistemas a partir de los 1,8 GHz. Este rango de frecuencias hace muy difícil su aplicación ya que el margen de medida de la impedancia es reducido y cercano a la impedancia característica de la guía de onda, por lo general 50Ω . Este método engloba dos tipos de medidas:

- La reflectometría en el dominio del tiempo: Se aplica un pulso a la impedancia a medir. La medida de las características de los pulsos reflejados determina el valor y la configuración de la impedancia.
- Medida del coeficiente de reflexión: Se aplica una tensión senoidal a la impedancia a medir. La medida de la tensión devuelta por el circuito determina la impedancia. Es una técnica precisa para valores de impedancia próximos a 50Ω .

El método de *medida I-V* (Figura 13) consiste en aplicar una corriente o una tensión a la impedancia desconocida y medir la tensión o la corriente que circula por ésta. La impedancia problema Z_x se coloca en la parte inferior y una impedancia patrón o conocida R en la parte superior del divisor. Si se trabaja en notación fasorial, conociendo la tensión aplicada al divisor (V_1) y midiendo la tensión en la resistencia (V_2), la impedancia problema se resuelve mediante la Ecuación 9.

$$Z_x = \frac{V_1 - V_2}{V_2} R \quad \text{Ecuación 9}$$

Este es el método más habitual de medida. El margen de medida está comprendido entre 10kHz y 110MHz para la medida I-V y 1MHz y 1,8GHz para medida I-V en RF. Tiene la ventaja de poder medir un amplio margen de impedancias con una gran exactitud, si embargo esta precisión disminuye a medida que aumenta la frecuencia. En la figura se puede ver el sistema de medida.

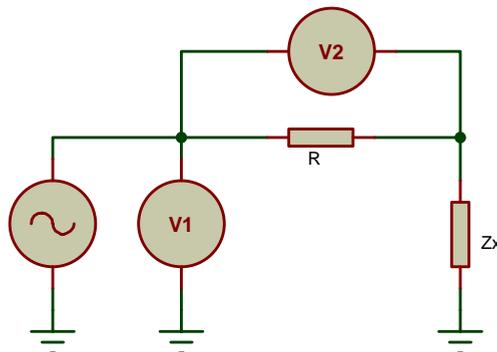


Figura 13. Método de medida I-V.

Esta configuración tiene una desventaja. La impedancia problema está en paralelo con la impedancia de entrada del equipo de medida Z_{imp} . A menos que la impedancia patrón sea muy pequeña con respecto a Z_{imp} , es decir, $Z_X \ll Z_{imp}$, esta configuración lleva a un error en la medida de Z_X .

Un método más elaborado para la medida de la impedancia es el *punteo autobalanceado*. Esta técnica minimiza el error del modelo anterior, eliminando cualquier capacitancia paralela a la impedancia problema. Otra ventaja destacable es su amplio margen de medida de impedancia y una gran precisión en todo su rango de frecuencias. Es el sistema escogido para la medida de impedancia en esta tesis.

Método de puente autobalanceado

El método puente autobalanceado (*Auto-Balancing Bridge, ABB*) es ampliamente utilizado en sistemas de análisis de impedancia de baja frecuencia. Su rango de aplicación se sitúa entre los 5Hz y los 40MHz. En la Figura 14 se muestra el diagrama del circuito ABB.

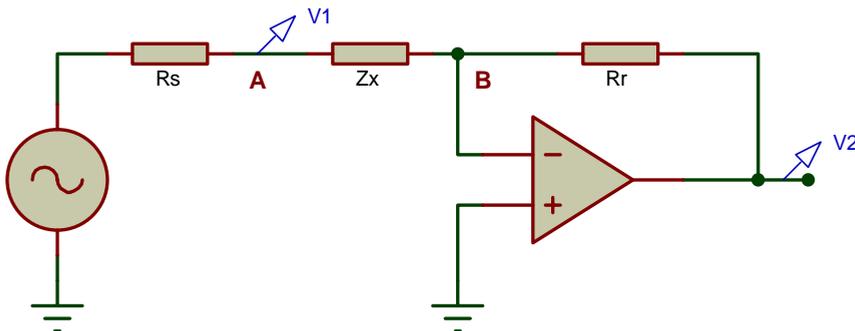


Figura 14. Método de medida puente autobalanceado.

Para realizar una correcta determinación de la impedancia se requiere previamente una estimación muy precisa tanto del voltaje aplicado sobre la carga como de la corriente que fluye por ella. La cuantificación del voltaje “V1” se produce en el terminal “A”. Al tratarse de una medida aislada se garantiza un cálculo de gran exactitud. La corriente que fluye por la carga se conduce al terminal “B”. Para evitar corrientes de pérdida por la capacitancia parásita entre

el terminal B y masa, se somete dicho terminal a un proceso de “masa virtual”. Esta técnica, mediante un bucle de realimentación denominado *null-loop*, mantiene un nivel de voltaje cercano a masa en el terminal “B” proporcionando una excelente *guarda*. De esta forma se asegura una valoración fiable de la corriente.

El circuito que constituye el bucle de realimentación es un convertidor corriente-tensión que mantiene la masa virtual en el terminal “B” y conduce la corriente a una resistencia de referencia R_r . El voltaje registrado en dicha resistencia mide la corriente que fluye por la impedancia Z_X desconocida.

Los equipos instrumentales cuyo funcionamiento se basa en esta técnica suelen disponer de varias resistencias de referencia para poder alcanzar elevadas resoluciones en un amplio rango de corrientes.

En base a la configuración descrita previamente (Figura 14), la expresión del cálculo de la impedancia es la mostrada en la Ecuación 10.

$$Z_X = \frac{V_1}{V_2} R_r \quad \text{Ecuación 10}$$

El funcionamiento de este circuito es correcto a frecuencias bajas pero se deteriora a frecuencias altas, puesto que la ganancia del amplificador operacional empieza a decaer. Como consecuencia de esta deriva, la medida de la impedancia aparente a frecuencias altas responde a la Ecuación 11 [24]:

$$Z_{med} = Z_X + j \frac{f}{f_0} (Z_X + R_r) \quad \text{Ecuación 11}$$

Donde f es la frecuencia a la que se realiza y f_0 la frecuencia a la que la ganancia en lazo abierto del amplificador operacional cae a la unidad. La Ecuación 11 puede reescribirse como la que se muestra en la Ecuación 12.

$$Z_{med} = Z_X + j2\pi f L_S \quad \text{Ecuación 12}$$

En la que

$$L_s = \frac{Z_x + Rr}{2\pi f_0} \quad \text{Ecuación 13}$$

En el caso de que la impedancia desconocida fuera una resistencia, el error introducido es equivalente a una inductancia en serie con ella. En la Figura 15 se observa el efecto del error de la inductancia en un espectro de muestras de YSZ policristalino de área 0,21 cm² medido en aire a una temperatura de 850 °C (J Macdonald *et al.* [24])

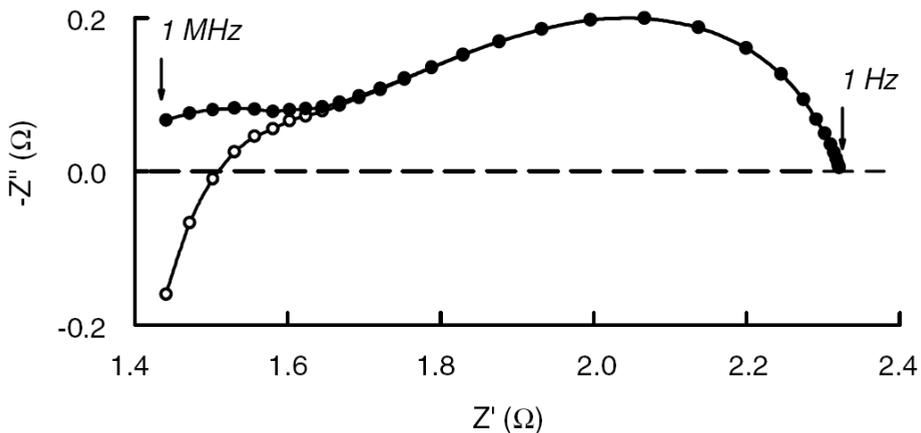


Figura 15. Efecto del error de la inductancia en un espectro de muestras de YSZ policristalino.

Los círculos son los datos y los puntos son los datos corregidos, en los que se ha eliminado la impedancia parásita.

Otra desventaja de este circuito [107] es que el puente no puede equilibrarse cuando la frecuencia es demasiado alta o cuando la longitud del cable es demasiado larga. Cuando la frecuencia es muy alta, si ésta coincide con la cuarta parte de la longitud de onda de la señal, se puede producir una onda estacionaria en la ruta de la medición. Durante un barrido frecuencial es muy probable que una de las longitudes de onda de las altas frecuencias aplicadas cumpla esta condición. Si esto sucede, el terminal “B” no puede controlar la diferencia de potencial entre el interior y el exterior de los conductores. El resultado es que el puente pierde el equilibrio.

Sin embargo, en una medida a baja frecuencia, los niveles de la señal en ambos extremos de la ruta de medición son iguales. A medida que aumenta la

frecuencia, los niveles de señal en cada extremo del recorrido de medición empiezan a divergir. Por consiguiente, el problema se desvanece limitando la frecuencia máxima de trabajo del circuito. De esta forma puede mantenerse el equilibrio del puente y un adecuado comportamiento del circuito.

Elección de la resistencia de referencia

Los instrumentos de medición de impedancias tienen varias amplitudes de medida. Concretamente, el sistema de medida diseñado en esta tesis dispone de cuatro diferentes escalas de corriente. El equipo selecciona automáticamente el rango de medida de corriente que debe emplear en función de la impedancia que presenta la muestra. Con ello se asegura que el convertidor A/D se alimenta con el máximo nivel de señal. Además este criterio de discriminación incrementa la precisión del cálculo al aumentar la relación señal/ruido (S/N). En efecto, la medida de la impedancia es muy precisa cuando su valor es próximo al límite máximo del rango empleado y se desvirtúa notablemente cuando se sitúa muy por debajo de él, pudiendo incluso provocar discontinuidades en las medidas.

3.3. Ruido eléctrico

El ruido eléctrico está siempre presente en los circuitos y sistemas electrónicos. Se define *ruido* [108] como cualquier señal eléctrica indeseada capaz de interferir de algún modo con la señal propiamente dicha, enmascarándola. Su estudio y minimización es importante en prácticamente todas las aplicaciones electrónicas, de manera especial cuando la señal a medir tiene una amplitud comparable a la del propio ruido.

El objetivo principal de todas las aplicaciones electrónicas que traten con señales pequeñas es reducir todo lo posible cualquier forma de ruido que se pueda producir.

Atendiendo a la naturaleza u origen físico, el ruido se clasifica en:

- Ruido intrínseco. Se produce por el movimiento de las cargas en los conductores y semiconductores, bien por la energía térmica (ruido térmico) o por las variaciones de velocidad de las cargas provocadas por la naturaleza del material.
- Ruido externo. El origen de estas interferencias es la presencia de campos eléctricos, magnéticos y electromagnéticos cerca del sistema. Dichos campos interactúan mediante acoplamientos capacitivos o inductivos.

La problemática de las interferencias radica en que, incluso en circuitos con esmerados diseños, influyen en su comportamiento final. Aunque en la práctica es muy difícil eliminarlas, hay ciertos métodos para paliarlas, como son: filtrado, desacoplo, reorientación física de componentes, cables y pistas, blindajes, técnicas de guarda, etc. En el trabajo de K. F. Anderson [109] se desarrolla una técnica de guarda *multipotencial* para proteger regiones con *gradiente* de potencial.

En las lenguas electrónicas, donde se trabaja habitualmente con señales analógicas de amplitud relativamente pequeña, el tratamiento del ruido cobra especial relevancia con objeto de aumentar la relación S/N.

4. Electrodo

El electrodo es la interfase entre el sistema electrónico y el sistema físico (tejido biológico, disolución, etc.) que permite aplicar y registrar un estímulo eléctrico sobre una muestra. Debe diseñarse con materiales lo más inertes posibles que minimicen su deterioro, ya que si éste llegase a producirse liberaría sustancias al medio produciendo alteración en la composición de la muestra.

El diseño o elección de los electrodos es uno de los puntos más críticos en el desarrollo de una experiencia. En la literatura científica pueden encontrarse varios tipos de electrodos. Por ejemplo Kitamura *et al.* [84] utilizan electrodos plano-paralelos que insertan en una mezcla de sustrato precalentado de leche y yogur para monitorizar el proceso de elaboración. Chevalier *et al.* [19] diseñan unos electrodos cilíndricos que miden la impedancia en la superficie del salmón.

Debido a las grandes dimensiones de los electrodos las determinaciones realizadas con ellos tienen un carácter destructivo. Además, no pueden llevarse a cabo en el interior del producto. Para evitar estos inconvenientes hay que recurrir al uso de electrodos de dimensiones reducidas, que hacen factible su penetración en la muestra y la realización de medidas internas considerándose sistemas de medida no destructivos [68][70][110]. Whitman *et al.* [42] utilizan un electrodo de agujas de acero inoxidable de 3 mm² para las medidas de impedancia eléctrica. Lepetit *et al.* [41] para sus experiencias utilizan varios tipos de electrodos, unos contruidos con agujas y otros plano-paralelos en diferentes configuraciones, separación y profundidad. Martínez-Máñez *et al.* [111] han desarrollado un sensor multielectrodo basado en tecnología *thick-film* para aplicaciones medioambientales.

Un sistema de medida electroquímico incorpora por lo general tres electrodos [29]:

- Electrodo de referencia
- Electrodo auxiliar
- Electrodo de trabajo

Sin embargo para la técnica de espectroscopía de impedancias no es necesario trabajar en una configuración a tres electrodos (potenciostato) en dos supuestos [30]:

- Cuando los dos electrodos están hechos del mismo material
- Cuando uno de los electrodos es mucho mayor que el otro

Como se verá en el *Capítulo 1. Desarrollo del sistema de medida*, los electrodos utilizados en esta tesis cumplen al menos uno de estos supuestos, por lo que el sistema electrónico se ha diseñado para trabajar en configuración de dos electrodos.

Interfase electrodo – electrolito. Doble capa eléctrica

Los responsables de la carga tanto del electrodo como de toda la circuitería asociada son los electrones. Sin embargo, en un medio biológico dicha carga viene condicionada por los iones presentes en él, tanto positivos como negativos (Na⁺, K⁺, Cl⁻ etc.). Cuando se introduce un electrodo, sin aplicar ningún estímulo sobre él, sólo por el hecho de entrar en contacto el metal y los iones, se

produce una reordenación de las cargas (Figura 16). Éstas se distribuyen de forma que en el perímetro del electrodo se posicionan todas las cargas negativas y en la superficie contigua a él se orientan las cargas positivas presentes en el electrolito. La disposición se asemeja a la que provoca un condensador. Este fenómeno de alineación iónica de equilibrio se denomina “capacidad de doble capa”.

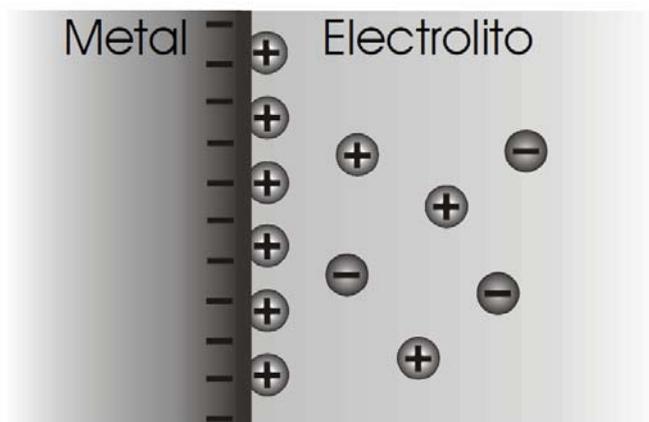


Figura 16. Formación de la doble capa eléctrica en la interfase electrodo – electrolito [112].

Cuando se estimula eléctricamente, se produce una transferencia de carga de la superficie del electrodo al electrolito. Dicha transferencia puede venir provocada por dos mecanismos denominados:

- *Procesos no farádicos*. Es un proceso capacitivo que se basa en una atracción – repulsión de los iones como respuesta a los cambios de carga que se originan en la superficie del electrodo. Por tanto, no hay transferencia neta de carga al electrolito y no se producen reacciones químicas que puedan dañar al electrodo o tejido.
- *Procesos farádicos*. Estos procesos comienzan en el momento en el que se produce un paso neto de electrones y viene acompañado por procesos de oxidación – reducción en el electrolito. Conviene evitar transformaciones de este tipo, siempre que sea posible. Algunas de estas reacciones *redox* dan lugar a procesos de corrosión del metal, con el consiguiente cambio de estructura y naturaleza del electrodo. También pueden alterar la composición química de la muestra, provocando

variaciones en las propiedades del tejido (pH, etc.). Se caracterizan por ser, en general más lentos que los *no farádicos*, puesto que además de la atracción o repulsión electrostática, existe difusión de especies químicas. Los procesos *farádicos* están gobernados por la ley de Faraday que establece que la extensión de una reacción química en un electrodo es proporcional a la intensidad de corriente. Las corrientes resultantes son llamadas corrientes farádicas.

Modelo eléctrico equivalente

La existencia de estos dos procesos hace que pueda establecerse una equivalencia entre el sistema electrodo – electrolito y un modelo eléctrico equivalente configurado por dos componentes: Capacidad (C_d), proveniente de la doble capa eléctrica, y resistencia en paralelo (R_d) denominada impedancia farádica (Figura 17). Este modelo está estrechamente relacionado con la geometría de los electrodos y la naturaleza de la muestra (impedancia del electrolito (R_e)).

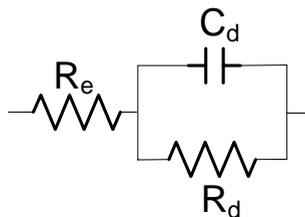


Figura 17. Esquema equivalente del sistema electrodo-electrolito.

En el caso de los estudios realizados en esta tesis, tanto la geometría de los electrodos como la naturaleza de las muestras dificultan enormemente la obtención de un modelo fiable para el conjunto electrodo-muestra. Por lo tanto la predicción de los parámetros fisicoquímicos a partir de las medidas de impedancia no se llevará a cabo en base a modelos teóricos sino utilizando modelos estadísticos de predicción.

5. Técnicas de análisis multivariante

El objetivo final de la tesis es la obtención de modelos predictivos que permitan determinar parámetros fisicoquímicos de las muestras analizadas a partir de las medidas de impedancia.

Un primer enfoque sería la obtención de modelos teóricos del conjunto electrodo-muestra consistentes en redes RC, y la evaluación, a partir de las medidas de impedancia, de los valores de las resistencias y condensadores de dichas redes. Estos valores pueden relacionarse con los parámetros fisicoquímicos objeto de estudio. Sin embargo la complejidad de los sistemas propuestos en la tesis (*Antecedentes 2.1.- Impedancia de los tejidos biológicos* página 12), sumado a la dificultad de caracterización de los electrodos debido a su geometría (*Antecedentes 4.- Electroodos* página 36) hacen que este enfoque resulte inviable.

Otra alternativa es la generación de modelos estadísticos basados en técnicas multivariante que, a partir de las medidas fisicoquímicas y de los valores de impedancia, permiten establecer relaciones matemáticas entre ambos, que posteriormente pueden ser utilizadas para predecir las propiedades de nuevas muestras a partir de medidas de impedancia. Este último ha sido el enfoque elegido para esta tesis.

Uno de los aspectos más críticos del empleo de sensores como elementos de análisis es conseguir, mediante un adecuado tratamiento de los datos, una respuesta coherente y útil.

Los sistemas de medida basados en técnicas como la espectroscopía, la voltimetría, potenciometría, etc. tienen como denominador común la cantidad de información que generan, creándose un gran número de variables independientes por cada variable dependiente.

El procesado de las señales multivariantes tiene su origen en la *quimiometría*, disciplina química que permite establecer un reconocimiento de patrones mediante el uso de métodos matemáticos y estadísticos. Los métodos de análisis multivariante [113] están basados en las técnicas de extracción de las principales características o parámetros (*feature extraction*). Su finalidad es reducir la dimensionalidad de los datos. Para ello, mediante el establecimiento

de combinaciones lineales de las variables originales, se generan nuevas variables ortogonales (independientes entre sí) que integran la máxima variabilidad de los datos. En función del método, a estas variables se les llama componentes principales, funciones discriminantes o variables latentes.

Existe un gran número de métodos matemático-estadísticos: análisis de componentes principales (*principal component analysis*, PCA) [114][115]; mínimos cuadrados parciales (*partial least squares*, PLS) [72][116]; análisis discriminante (*discriminant analysis*) [81], redes neuronales (*artificial neural networks*, ANN) [117][118], etc. Los métodos de reconocimiento de patrones son utilizados para interpretar las señales complejas y predecir parámetros tanto cualitativos como cuantitativos.

Las técnicas de análisis multivariante nacen como herramienta para procesar la cantidad de información captada por los sistemas de medida electrónicos sensoriales. El objetivo principal del análisis multivariante es extraer la información relevante de todo el conjunto, minimizando o eliminando el ruido que pueda existir, para poder obtener la respuesta deseada (Figura 18). En definitiva es una técnica orientada a la reducción de la dimensión. En este trabajo se han aplicado diferentes técnicas de análisis multivariante, en función de la naturaleza de los ensayos a realizar.

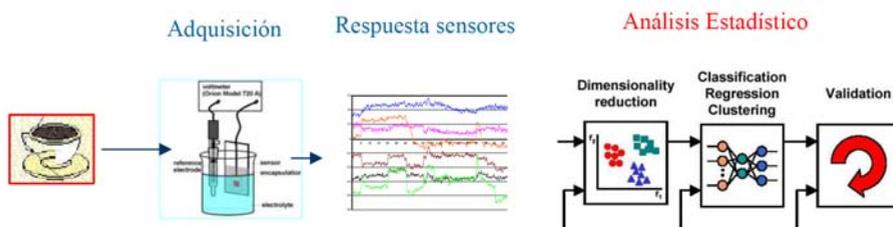


Figura 18. Tratamiento estadístico de datos [119].

5.1. Preprocesado de datos

Existe una regla universal o principio fundamental en el mundo del procesamiento estadístico de los datos que es “GIGO” que significa “Garbage In, Garbage Out” es decir si hay *basura* a la entrada del sistema de procesamiento, a la salida también habrá *basura*. Si la herramienta de análisis

multivariante se alimenta con datos que no son *buenos* el resultado será *malo*. Por tanto, es fundamental como paso previo a la aplicación de las técnicas multivariantes hacer un pretratamiento de todos los datos experimentales o *raw signals*. Se deben minimizar las contribuciones no deseadas presentes en las señales que disminuyen la reproducibilidad y pueden provocar estimaciones erróneas.

Esto corrobora el principio de parsimonia que defiende que si no varía de forma significativa, el modelo a elegir es aquel que sea más sencillo. Es decir, una variable que no aporte información al modelo matemático es una variable que sobra, es una variable que introduce ruido.

Por ello, antes de entrar a tratar los datos, debe hacerse un preprocesado, que puede consistir en:

- Eliminación de observaciones anómalas por inspección visual. Son datos anómalos que se observan a simple vista ya que distan numéricamente de forma evidente respecto al valor medio (significativamente diferentes).
- Promediado de espectros. El ruido instrumental es aleatorio por lo que promediando “n” señales obtenidas a partir de una misma muestra la relación S/N aumenta en un factor igual a \sqrt{n} .
- Extracción de parámetros (*feature extraction*) de las curvas. Consiste en extraer unos pocos parámetros lo suficientemente significativos para que representen a todos los puntos de la curva.
- Normalización, estandarización o autoescalado. El objetivo es que todas las variables tengan el mismo peso específico independientemente de su valor. La normalización consiste en centrar los datos (a las variables se le resta el valor medio $x_i - \bar{x}_i$) y dividir por su desviación estándar.
- Selección de variables. En los sistemas sensoriales es habitual tener matrices de datos con un gran número de variables frente al número de medidas. Resulta interesante por tanto utilizar algún criterio de selección de variables que permita reducir la dimensionalidad de los datos sin eliminar información útil y minimizando a la vez las interferencias que aporten las variables ruido. Para ello existen varios métodos (test de Fisher, test de incertidumbre de Martens, etc.) pero uno de los más extendidos es el de selección de variables por *covarianza entre variables*. Variables que estén fuertemente correlacionadas o anticorrelacionadas aportan información similar, lo que indica que son redundantes.

5.2. Análisis de componentes principales PCA

El *análisis de componentes principales (PCA)* es una técnica de análisis multivariante que consiste en encontrar nuevas direcciones ortogonales en el espacio de variables que sinteticen u ofrezcan una información más compactada. Estas nuevas direcciones se denominan componentes principales. Habitualmente se utiliza como método de clasificación.

Básicamente se trata de un método de reconocimiento de patrones. Se limita a representar bidimensionalmente (Figura 19) un conjunto de medidas para analizar la presencia de agrupaciones o *clusters* espontáneas entre ellas [120]. Permite identificar variaciones inusuales dentro del modelo, lo cual puede indicar la presencia de un “outlier” o medida errónea.

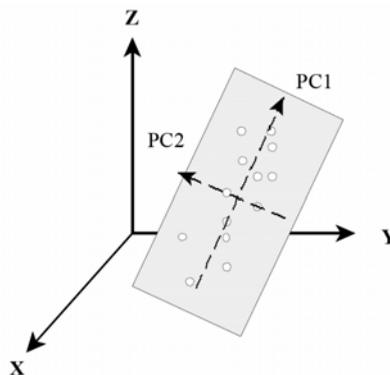


Figura 19. Interpretación geométrica de un PCA.

Del conjunto de los datos, el PCA establece las direcciones ortogonales que explican la máxima variabilidad de las muestras y las utiliza como nuevos ejes de coordenadas llamadas Componentes Principales para representarlas. La primera componente principal (que se define como el conjunto de combinaciones lineales ortogonales de las variables) es la dirección que explica la máxima variabilidad; la segunda se escoge de tal forma que sea perpendicular a la primera y que explique la máxima variabilidad una vez extraída la primera y así sucesivamente.

5.3. *Análisis discriminante DA*

Otra herramienta de procesamiento de datos multivariable es el *análisis discriminante (DA)* cuya finalidad es analizar si existen diferencias significativas entre grupos de objetos respecto a un conjunto de variables medidas sobre los mismos.

El Análisis Discriminante se puede considerar como un análisis de regresión donde la variable dependiente es categórica y se expresa como la etiqueta de cada uno de los grupos, y las variables independientes son continuas y determinan a qué grupos pertenecen los objetos.

Por tanto, al igual que los PCA's, es un método de clasificación. El análisis discriminante según los valores alcanzados por ciertas variables cuantitativas dispone los individuos en diferentes categorías fijadas por la variable dependiente. Para lograr una correcta ordenación de los individuos se construyen funciones discriminantes, que son combinaciones lineales de las variables independientes.

Este análisis se emplea para lograr:

- La habilidad para *describir* matemáticamente los casos observados mediante su distribución en grupos.
- La habilidad para *clasificar* nuevas observaciones en los grupos establecidos previamente.

5.4. *Mínimos cuadrados parciales PLS*

La *regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS)* se basa en el mismo principio que el PCA pero a diferencia de éste intenta maximizar la covarianza entre las variables predictoras y las variables a predecir [120]. Identifica la relación existente entre los bloques de datos X e Y.

Se utilizan como método de cuantificación. Emplea una serie de factores ortogonales llamados variables latentes (el equivalente a las componentes principales) que capturan la máxima varianza posible. Para establecer el modelo

de predicción selecciona aquellas cuya varianza con las variables a predecir sea máxima.

Su funcionamiento es de los denominados *supervisado*. En la fase de entrenamiento (también llamada fase de *calibración*) se crea un modelo que relaciona variables predictoras (variables de entrada) con las variables a predecir (variables de salida) maximizando la covarianza entre ambas. En la fase de evaluación (también llamada fase de *validación*) el PLS se convierte en una herramienta de predicción. Se aplica el modelo construido en la fase de entrenamiento a nuevas muestras para predecir las variables de salida [120].

Creación del modelo de calibración. Crossvalidation

El objetivo del método de calibración es establecer un modelo que sea capaz de predecir el valor de la propiedad estudiada en nuevas muestras. Se trabaja con un número limitado de muestras, representativas de la población, de las que se conoce el valor de la propiedad a determinar. Los datos de partida se representan en dos matrices distintas. Se escoge el modelo que mejor describe la relación entre ambas. Para ello se suele minimizar algún tipo de error o residuo del tipo $\sum (\hat{y}_i - y_i)^2$ denominado PRESS (*Predicted Residual Error Sum of Squares*) o su valor medio, MSE (*Mean Squared Error*) obtenido al dividir el PRESS por el número de muestras, siendo \hat{y}_i el valor calculado.

Para que las predicciones sean fiables el modelo obtenido debe ser robusto. Si el número de factores o variables latentes resultantes es muy grande el modelo se ajustará perfectamente a las muestras del conjunto de calibración pero fallará en la predicción de nuevos datos. A este fenómeno se le denomina *sobreajuste* o *sobreentrenamiento*. Para limitar el número de factores latentes y alcanzar un equilibrio, mejorando la predicción en detrimento del ajuste, se recurre a la *validación cruzada* o *crossvalidation*. En esta tesis se ha utilizado una validación cruzada de orden 1, también llamada *leave-one-out* [113]. Este método se basa en el siguiente algoritmo:

- Del conjunto de muestras de calibración se retira la muestra i .

- Con el resto de muestras se construye un sub-modelo de rango 1 (con una sola variable latente): sub-modelo_{1i}. Dicho modelo se utiliza para predecir la muestra retirada y se calcula el error de predicción.
- Se repiten los dos primeros pasos tantas veces como variables latentes existan. Sucesivamente se incorporan uno a uno todos los factores latentes del modelo, que agregándose a los ya considerados generan nuevos sub-modelos de rangos incrementados: sub-modelo_{2i}, sub-modelo_{3i}, etc.
- La muestra *i* se devuelve al conjunto de muestras y se retira una nueva repitiendo el proceso anterior.
- Para cada sub-modelo se ha obtenido un error de predicción por cada variable latente. Se calcula el RMSEP (*root mean squared error of prediction*) de cada rango y se representa en una gráfica. El número óptimo de variables latentes es el que minimiza el RMSEP.

Por tanto, el modelo final de predicción deberá generarse utilizando este número de variables latentes.

Validación o evaluación del modelo

Para la evaluación del modelo se emplean muestras no utilizadas en el proceso de calibración (*set validation*) o etapa de generación del modelo. Aplicando sobre ellas el modelo de predicción construido se obtienen unos “valores predichos”. Así mismo, debe disponerse de valores observados de todas las muestras del conjunto de validación. La precisión del modelo se mide a través de la comparación de los valores predichos frente a los observados.

5.4.1. Aplicación de la técnica PLS

Un ejemplo de aplicación de la técnica PLS es el algoritmo de Calibración / Validación desarrollado para la *Determinación de parámetros fisicoquímicos en muestras de lomo de cerdo durante el proceso de curado*.

El algoritmo es el siguiente:

- Eliminar mediante inspección visual las medidas anómalas (*outliers*) presentes en la matriz de datos (*raw data*).
- Aplicar la técnica PLS a los datos. Analizar gráficamente los resultados y fijar las condiciones de depuración de datos.
- Eliminar los datos que tienen un *leverage** 5 veces superior al promedio y aquellos cuyos residuos estandarizados en valor absoluto estén por encima de 2,5.
- Aplicar la técnica PLS de nuevo sobre los datos escogidos. Volver a depurar los datos. Repetir la secuencia aplicación – depuración hasta que todos los datos cumplan las condiciones establecidas previamente.
- Calcular la media de las medidas de impedancia realizadas para cada muestra.
- Elegir las muestras que integrarán el set de calibración (66% de las muestras) y el set de validación (33% de las muestras).
- Aplicar de nuevo la técnica PLS sólo a los datos del set de calibración.
- Realizar una validación cruzada (cross-validation) mediante el procedimiento leave one out para obtener el número de variables latentes que minimizan el error cuadrático medio (PRESS).
- Realizar el análisis PLS sobre el set de calibración limitando el número de componentes al valor obtenido en la validación cruzada. El resultado alcanzado es el modelo de predicción.
- Realizar una validación con las muestras del set de validación, para evaluar la robustez del modelo de predicción con muestras que no han intervenido en la generación del modelo. Calcular los valores “predichos” de la variable dependiente, multiplicando la matriz de los datos del set de validación por los coeficientes de regresión no estandarizados obtenidos del modelo de predicción generado.
- Representar los valores observados frente a predichos y calcular el coeficiente de determinación correspondiente (R^2).

En la Figura 20 se puede observar el diagrama de bloques de este algoritmo. Aquéllas con valores atípicos de las

* *Leverage* es un estadístico que mide la influencia de cada observación en el modelo final. Aquéllas con un *leverage* elevado son valores atípicos que pueden distorsionar el modelo estimado.

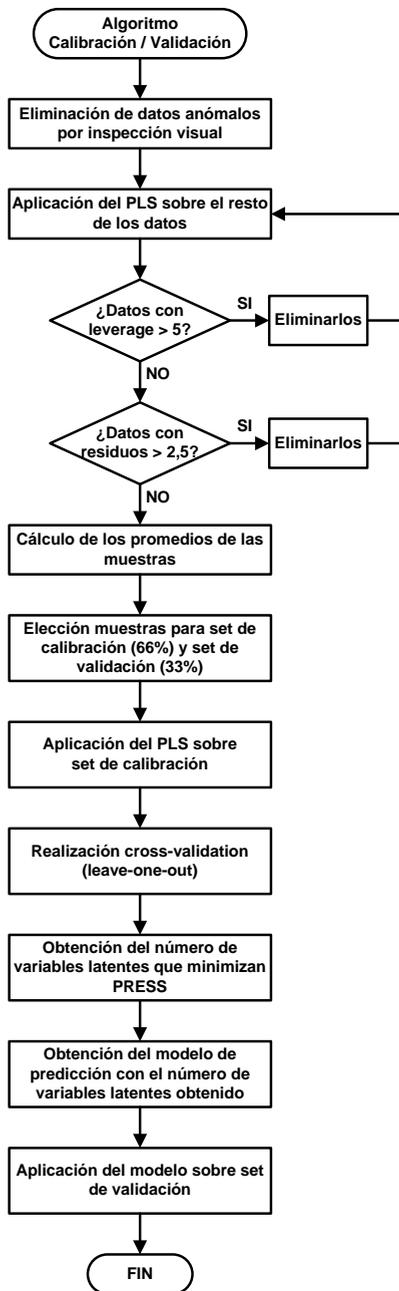


Figura 20. Algoritmo de Calibración / Validación para PLS.

Objetivos de la tesis

En el capítulo de antecedentes se ha llevado a cabo una revisión de la situación y necesidades actuales de la industria alimentaria. También se han analizado los fundamentos teóricos de las disciplinas científicas que sustentan la investigación. Partiendo de esta realidad, se proponen a continuación los objetivos a cubrir con la presente tesis.

El *objetivo principal* es realizar la determinación de ciertas propiedades fisicoquímicas en diferentes productos alimenticios empleando como técnica la espectroscopía de impedancia.

Para ello es preciso construir un sistema predictivo. Mediante herramientas de análisis multivariante se establece una correlación entre los valores de impedancia y los parámetros fisicoquímicos. El modelo estadístico obtenido se emplea para conocer las propiedades de nuevas muestras.

Es necesario implementar un sistema de medida que debe cumplir los siguientes *objetivos específicos*:

- Versatilidad. Capacidad para obtener lecturas de impedancia de distintos productos. El equipo de medida electrónico debe permitir la aplicación de un campo eléctrico de amplitud variable a las muestras, efectuando un barrido de frecuencias en el intervalo comprendido entre 1Hz y 1MHz, y registrar la respuesta en corriente.
- Flexibilidad. El equipo debe diseñarse con una electrónica que permita, con ligeras modificaciones, la implementación de otras técnicas electroquímicas de medida como voltametría cíclica y voltametría de pulsos.
- No destructivo. Los electrodos deben ser de reducidas dimensiones en comparación con las de las muestras, para que las medidas puedan catalogarse como puntuales o muy localizadas y no provoquen daños en las piezas analizadas que ocasionen su alteración, deterioro o rechazo.

- Portabilidad y fiabilidad. El equipo de medida electrónico debe ser ligero y de reducidas dimensiones para poder realizar medidas *in situ*. Así mismo debe alcanzar elevados niveles de precisión y exactitud para obtener medidas de calidad y confianza. Además debe tener un coste reducido para que pueda consolidarse como una alternativa competitiva a los sistemas actuales.
- Fácil manejo. El usuario necesita interactuar con el equipo electrónico diseñado. Es importante que sea sencillo en su configuración y que su sistema de funcionamiento sea altamente intuitivo. Por consiguiente el software de la aplicación de PC debe ser capaz de ajustar los parámetros necesarios para que el equipo genere el campo eléctrico variable, recepcionar los datos de tensión y corriente y calcular, visualizar y almacenar los valores de los espectros de impedancia.

Una vez superada la fase de estudio, diseño y desarrollo, el sistema de medida debe someterse a examen. Para la validación del sistema se proponen varias aplicaciones en diversos productos alimentarios. Las determinaciones fisicoquímicas analizadas varían de un estudio a otro en función de las necesidades del proceso. La relación de ensayos practicados es la siguiente:

- Determinación del porcentaje de sal en salmueras y carne picada.
- Estudio del nivel de curado de muestras de lomo.
- Estudio del nivel de curado de quesos.
- Estudio de la frescura de pescado.

Capítulo 1. Desarrollo del sistema de medida

1. Pruebas preliminares. Determinación de las necesidades

Con objeto de familiarizarse con la técnica de espectroscopía de impedancia y establecer los requerimientos del sistema de medida a diseñar (frecuencias de trabajos, rangos de tensión y corriente, etc.), se realizaron una serie de ensayos previos con un analizador de respuesta en frecuencia, el potencióstato Autolab de la empresa Echo Chemie [121], sobre una gran variedad de muestras de alimentos (salmueras, carne picada, jamón, queso, etc.).

El sensor utilizado fue el denominado *electrodo de aguja** (aguja coaxial de las utilizadas en técnicas electromiográficas formada por dos conductores concéntricos de acero inoxidable separados por una resina). La conexión del electrodo al analizador se muestra en la Figura 21. El electrodo de referencia y el electrodo auxiliar se acoplaron entre sí al conductor exterior de la aguja y el electrodo de trabajo al conductor interno, evitando de este modo tener que ensamblar una segunda sonda a la muestra. Como se ha comentado en el apartado *Antecedentes 4 - Electrodo*s, en esta tesis se ha empleado una configuración de dos electrodos.

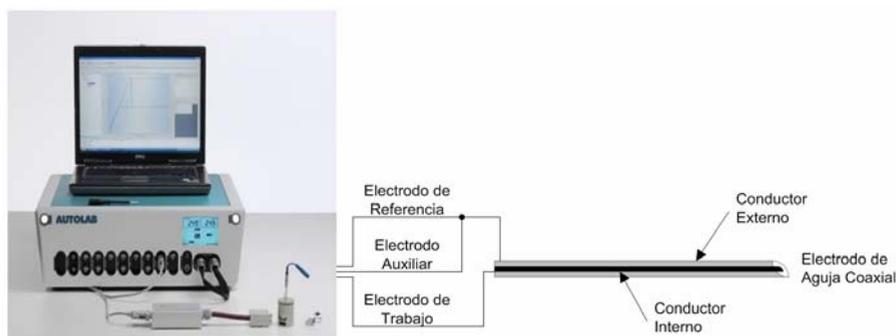


Figura 21. Setup de configuración del analizador Autolab.

* En un apartado posterior del capítulo se detallan los electrodos utilizados en la tesis.

Los resultados obtenidos en los ensayos sobre muestras alimentarias sirvieron para definir las siguientes especificaciones del sistema de medida a diseñar:

Especificaciones generales:

- Sistema económico, con un diseño adaptado para lograr operatividad con el menor coste posible.
- Sistema no destructivo, con capacidad para realizar medidas puntuales y que preserven la integridad de las muestras.
- Sistema portátil, cuyas reducidas dimensiones permitan realizar medidas in situ.
- Sistema de manejo sencillo y de fácil acceso para el usuario, que no requiera personal cualificado y proporcione un rápido y cómodo análisis de las medidas realizadas.
- Sistema fiable, que posea la precisión y exactitud necesarias para obtener una medida de calidad y confianza.
- Sistema flexible, apto para admitir la implementación de otras técnicas electroquímicas de medida, como voltametría cíclica y la voltametría de pulsos, con ligeras modificaciones.

Especificaciones técnicas:

- Generación de señales senoidales, bien de una en una (*modo manual*) o realizando un barrido frecuencial con distribución logarítmica de 6 décadas o lineal (*modo automático*). En este caso el número máximo de frecuencias por barrido es 50.
- Dos canales de muestreo simultáneos para la medida de la tensión aplicada y de la corriente obtenida.
- Amplio rango de frecuencia de las señales senoidales generadas: desde 1Hz a 1MHz.
- Amplitud variable de las señales. Tensión máxima 1Vpp con un offset de 0V.
- Cuatro rangos de corriente de salida configurables. Valores: 10mA, 1mA, 100 μ A y 10 μ A.
- Aplicación software que por una parte permita establecer la configuración de las señales y por otra sea capaz de calcular, visualizar y almacenar el módulo y fase de la impedancia medida mediante técnicas de Fourier.

1.1. Diagrama general del sistema de medida

El sistema de medida diseñado posee tres componentes:

- Aplicación software en PC
- Equipo electrónico de medida
- Electrodo

El usuario de la aplicación software establece el rango de frecuencias y la amplitud de las señales senoidales que se enviarán al electrodo. Para cada una de las frecuencias, la aplicación calcula 256 puntos correspondientes a la evolución temporal de la señal y direcciona dichos datos, junto con el resto de la información necesaria para la generación de la señal, al Equipo Electrónico de Medida a través del puerto de comunicaciones RS-232. Éste recibe la información remitida por el ordenador, la guarda en memoria y genera la señal senoidal que será aplicada a la muestra a través del electrodo; a continuación muestrea las señales de tensión y corriente y almacena los datos para posteriormente enviarlos al PC (256 puntos para la tensión y 256 puntos para la corriente). El PC recibe los datos muestreados y realiza un análisis de Fourier (DFT) sobre estas señales para calcular el módulo y la fase de la impedancia de la muestra. Este proceso se repite para el resto de frecuencias. Posteriormente la aplicación puede representar los resultados gráficamente, almacenar los datos en disco, etc.

La generación y muestreo simultáneo de señales senoidales de amplitud variable, en un rango de 1Hz a 1MHz requiere sistemas electrónicos capaces de realizar procesamiento paralelo de información a alta velocidad. En esta tesis se ha recurrido al uso de técnicas digitales de multiproceso basadas en lógica programable (CPLD's). Este bloque de *procesado digital* se complementa con tres memorias RAM estáticas de 2kB para el almacenamiento de datos.

La parte *analógica* del equipo está compuesta por bloques de adaptación de señales diseñados con amplificadores operacionales. Para la implementación del bloque de medida de corriente se ha utilizado un convertidor corriente-tensión configurado en puente autobalanceado para reducir los efectos capacitivos de las altas frecuencias sobre la medida.

Finalmente entre la parte analógica y la parte digital se ha utilizado un convertidor digital-analógico (DAC) de 10 bits y dos convertidores analógico-digital (ADC) de 8 bits.

El equipo electrónico de medida recibe la información enviada por el PC, la guarda en memoria y genera la señal senoidal que será aplicada a la muestra a través del electrodo. A continuación muestrea las señales de tensión y corriente y los datos los almacena para posteriormente enviarlos al PC (256 puntos para la tensión y 256 puntos para la corriente).

En la Figura 22 se muestra el diagrama de bloques general del sistema de medida desarrollado.

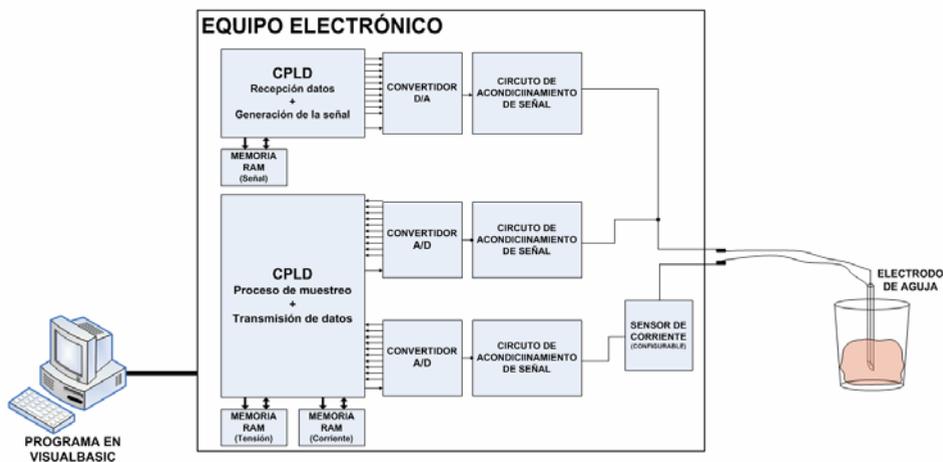


Figura 22. Diagrama de bloques del sistema de medida.

En la Figura 23 se observa la placa electrónica del equipo.

Resumiendo, el equipo electrónico de medida presenta:

- Un bloque de procesado digital compuesto por un transceiver RS-232, dos CPLD's y tres memorias RAM estáticas.
- Un bloque de interconexión entre el bloque de procesado digital y las etapas analógicas dotado de dos convertidores A/D y un convertidor D/A (Figura 24).

- Un bloque analógico integrado por amplificadores operacionales que llevan a cabo la adaptación de señales de los convertidores A/D y D/A (Figura 24).

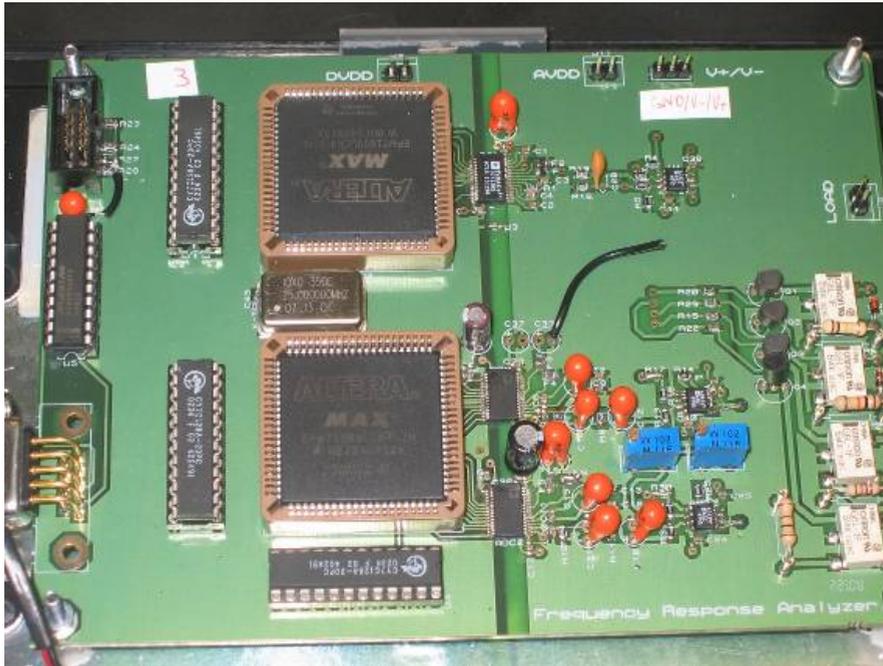


Figura 23. Detalle de la placa electrónica del equipo de medida.

- Un bloque correspondiente al circuito de medida de corriente formado por resistencias de *shunt* y un amplificador operacional conectados en configuración de puente autobalanceado (Figura 24).

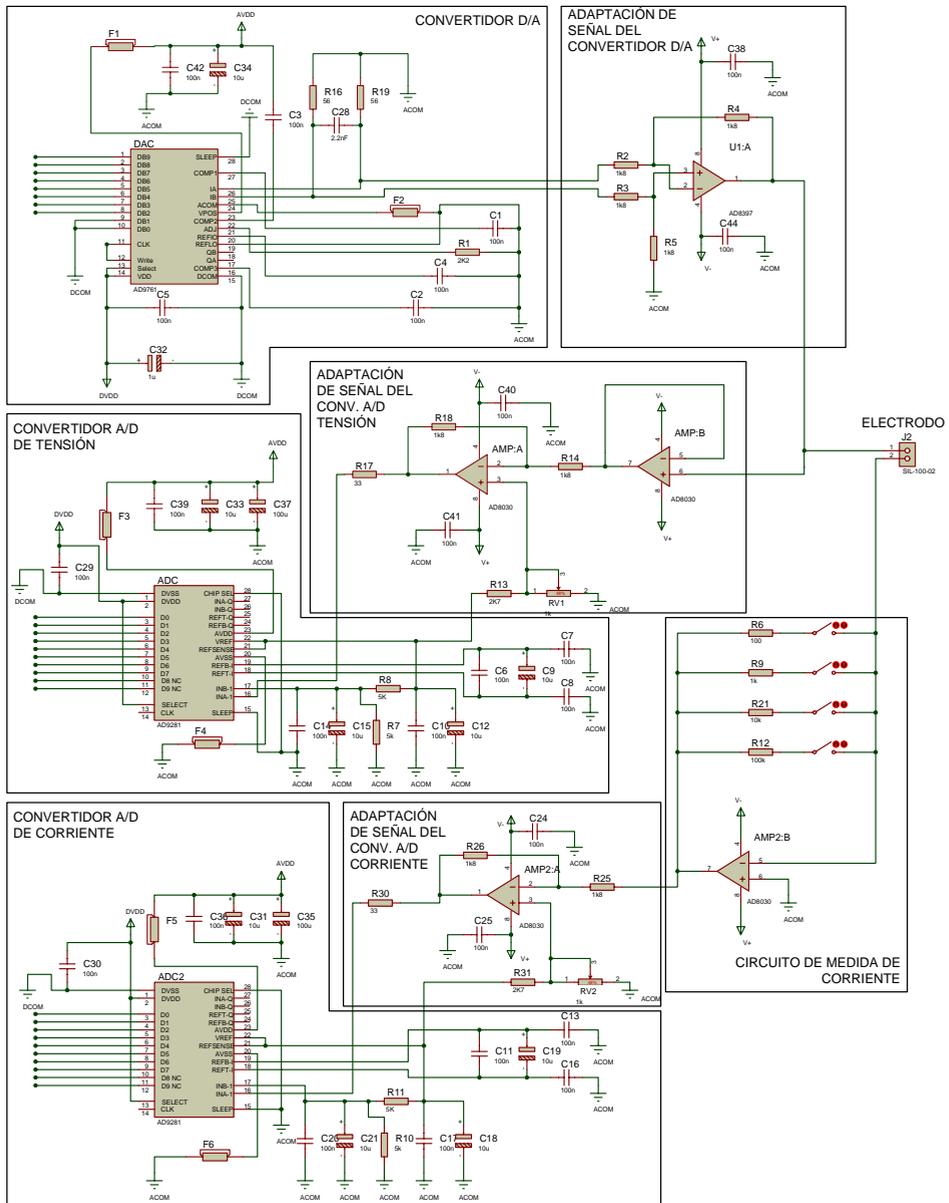


Figura 24. Esquema simplificado de los bloques de conversión A/D y D/A, de adaptación de señales analógicas y de medida de corriente.

2. Descripción del hardware del equipo electrónico de medida

2.1. Bloque de procesado digital

En las fases iniciales de diseño hubo dos posibles alternativas de desarrollo:

- *Sistema multiprocesador* basado en 3 microcontroladores (μC). Uno para la comunicación con el PC y la generación de la señal senoidal (microcontrolador principal) y los otros dos para el muestreo de la señal de tensión y la señal de corriente respectivamente. Una vez recibidos los datos del PC y almacenados en memoria RAM, el μC principal comenzaría la secuencia de generación de la señal senoidal. Simultáneamente, los otros dos μC 's muestrearían las señales de la tensión aplicada al electrodo y de la corriente que proviene del mismo. Una vez finalizado el proceso para un ciclo completo, el μC principal recogería los datos del muestreo realizado por los otros dos y los transmitiría al PC.

Se pensó realizar el diseño con microcontroladores de la familia PIC18 de Microchip. Dado que éstos pueden trabajar como máximo a 10MIPS (con un cristal oscilador de 40MHz), el número máximo de puntos que podrían utilizarse para representar señales de 1MHz sería de 10 puntos. Esto unido al hecho de la complejidad de trabajar con un sistema multiprocesador (los 3 μC 's deberían comunicarse con un bus I2C) hizo que esta opción fuera descartada.

- *Dispositivos de lógica programable*. Dado que se trata de un sistema digital en el que hay acciones que deben realizarse simultáneamente (multiproceso), la solución más adecuada es el uso de dispositivos de lógica programable. Para reducir costes y simplificar las tareas de montaje de componentes en el PCB se decidió utilizar CPLD's en lugar de una FPGA, ya que las primeras son más económicas y tiene encapsulados más fáciles de manejar. En concreto se utilizaron CPLD's de la familia MAX7000S de Altera. Estas CPLD's son de bajo coste y presentan encapsulados PLCC84 que pueden ser incorporados a zócalos de inserción lo que facilita su montaje en el PCB. Sin embargo tienen el inconveniente de tener un número de recursos (bloques lógicos) menor que las FPGA's y que otras CPLD's de gama alta. Esto obligó a utilizar

dos CPLD's, distribuyendo entre ambas las tareas a realizar por el bloque de procesado digital.

El trabajo que desarrolla el bloque de procesado digital es:

- Recepción y almacenamiento en RAM de los datos de generación de la señal senoidal enviados por el PC.
- Envío en paralelo al DAC de la secuencia de valores digitales almacenados en la RAM con la cadencia correspondiente a la frecuencia que se desea obtener.
- Lectura simultanea en paralelo y almacenamiento en RAM de los datos digitales provenientes de los ADC's que muestrean las señales de tensión y corriente.
- Envío al PC de los datos almacenados.

En la Figura 25 se muestra la estructura del bloque de procesado digital.

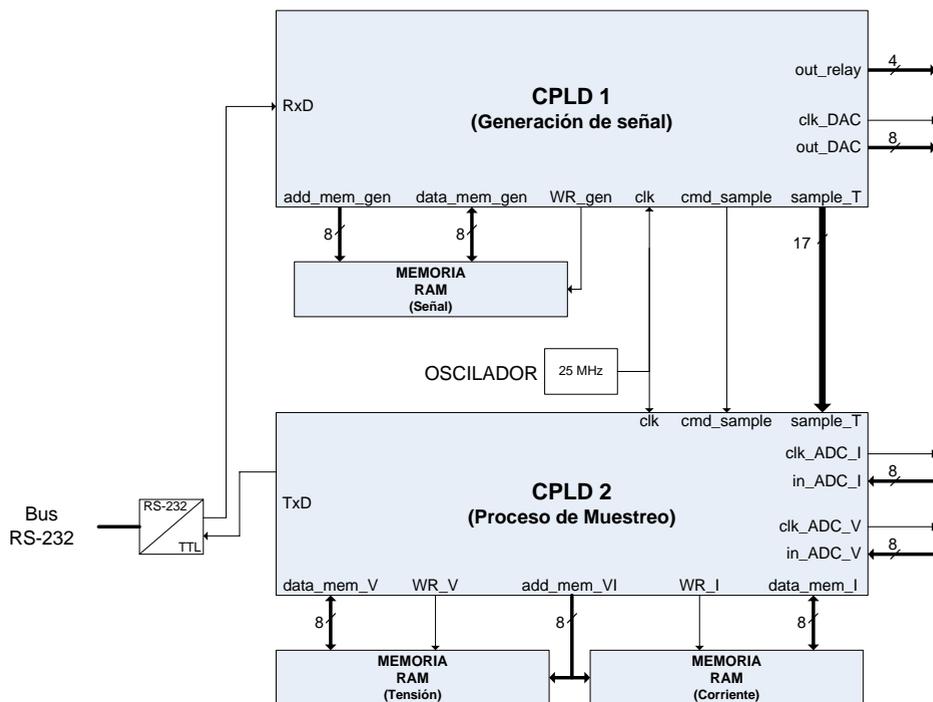


Figura 25. Diagrama del bloque de procesado digital.

Se compone de dos CPLD's, tres memorias RAM y un transceiver de TTL a RS-232.

El transceiver de TTL a RS-232 tiene como misión convertir las tensiones de las líneas *TxD* y *RxD* (mediante las cuales las CPLD's intercambian datos con el ordenador) de niveles TTL a niveles RS-232.

El procesado digital se lleva a cabo mediante dos CPLD's de la familia MAX7000S. La CPLD1 se encarga de la generación de la señal senoidal que se aplica al electrodo, mientras que la CPLD2 es responsable del muestreo de dicha señal y de la corriente que circula por el mismo. Dado que las tareas de generación de señal (CPLD1) requieren de mayor número de recursos, para su implementación se eligió el dispositivo EPM7160SLC84 mientras que para el proceso de muestreo (CPLD2) se utilizó el dispositivo EPM7128SLC84.

La CPLD1 recibe los datos del PC a través de la línea *RxD*. Son recibidos en formato UART (8 bits de datos, un bit de stop y sin bit de paridad) a 9600 baudios. Los datos incluyen los valores digitales de 8 bits correspondientes a la evolución temporal de la señal y son almacenados por la CPLD1 en una memoria RAM externa. Aunque la memoria RAM es de 2 KBytes solo se utilizan las primeras 256 posiciones, correspondientes al número de valores enviados por el PC, para representar la evolución temporal de la señal. La CPLD1 accede a la RAM mediante 8 líneas de dirección (*add_mem_gen*), 8 líneas de datos (*data_mem_gen*) y la línea de lectura/escritura (*WR_gen*). Lee los datos almacenados y los envía en paralelo al DAC a través de las 8 líneas *out_DAC*. La señal de reloj del DAC (*clk_DAC*) se toma directamente de la señal de reloj de las CPLD's (*clk*), por lo que el DAC realiza conversiones cada ciclo de reloj. El cambio de la tensión analógica a la salida del DAC viene por tanto marcado por el cambio del valor binario de 8 bits a la entrada del DAC. La CPLD1 saca por las líneas *out_DAC* los valores correspondientes a la evolución temporal de la señal con la cadencia necesaria para obtener la frecuencia de la señal senoidal deseada. Dicha cadencia viene marcada por uno de los datos enviados por el PC. El proceso de generación de la señal por parte de la CPLD1 se repite hasta que se recibe el comando de *PARO* desde el PC.

Cuando la CPLD1 ha generado un ciclo completo de la señal, le indica a la CPLD2 a través de la línea *cmd_sample* que puede iniciar las tareas de muestreo. Además a través del bus de 17 líneas *sample_T* la CPLD1 le indica a la CPLD2 cuál debe ser la cadencia de muestreo. Las señales de reloj de los

ADC's de muestreo de corriente y tensión (*clk_ADC_I* y *clk_ADC_V*) están directamente conectadas a la señal de reloj de las CPLD's (*clk*); es decir los ADC's realizan conversiones en cada ciclo de reloj. Sin embargo la CPLD2 solo recoge los datos de las muestras en los instantes marcados por el intervalo establecido en *sample_T*. Los datos son recogidos por los buses de entrada *in_ADC_I* e *in_ADC_V* y son almacenados en las memorias RAM externas. El acceso a las memorias RAM se realiza mediante un bus de direcciones común (*add_mem_VI*) y los buses de datos *data_mem_I* (para las muestras de corriente) y *data_mem_V* (para las muestras de tensión). Además se utilizan las líneas *WR_I* y *WR_V* para activar la operación de escritura en las memorias RAM. Una vez finalizado el proceso de muestreo de las señales de corriente y tensión, la CPLD2 toma los datos de las muestras almacenados en las memorias RAM y los envía al PC en formato UART a través de la línea *TxD*.

2.2. Módulo del Convertidor Digital Analógico (DAC)

Para la generación de la señal senoidal que debe aplicarse al electrodo se eligió el convertidor digital-analógico (DAC) de Analog Devices AD9761 de doble canal, de 10 bits de resolución y de 40MSPS de frecuencia máxima. En el sistema de medida desarrollado el convertidor trabaja a 25MHz, lo que permite para la frecuencia de 1MHz generar una señal senoidal con 25 puntos. Otras características del DAC son:

- Bajo consumo: opera con una tensión de alimentación de entre 3V y 5,5V con un consumo de 200 mW.
- Tensión de referencia interna de 1,20V compensada térmicamente.
- Rango de corriente de salida hasta 10mA.

Dado que solo se dispone de 8 bits para representar el valor que se desea convertir a tensión analógica se conectó la salida *out_DAC* de la CPLD1 a las entradas *DB9* a *DB2* del DAC dejando las entradas *DB1* y *DB0* conectadas a masa (Figura 26).

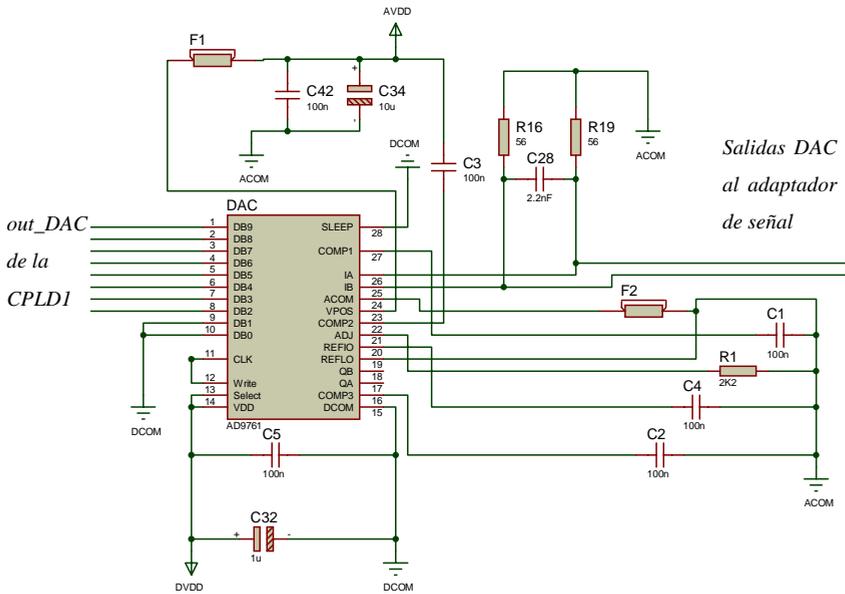


Figura 26. Módulo del convertidor D/A.

Si se trabaja con el DAC en modo de salida diferencial, las expresiones de las corrientes de salida $IOUTA$ y $IOUTB$ en función del valor digital de entrada $VALDIG$ se muestra en las Ecuación 14 y Ecuación 15.

$$IOUTA = \frac{VALDIG}{1024} \cdot IOUTFS \quad \text{Ecuación 14}$$

$$IOUTB = \frac{1023 - VALDIG}{1024} \cdot IOUTFS \quad \text{Ecuación 15}$$

Siendo $IOUTFS$ la corriente de salida máxima, que se obtiene a partir de la corriente de referencia mediante la Ecuación 16.

$$IOUTFS = 16 \cdot IREF \quad \text{Ecuación 16}$$

Por otra parte $IREF$ puede fijarse conectando una resistencia (R1) entre el pin ADJ del DAC y masa. El valor de $IREF$ puede entonces deducirse de la Ecuación 17.

$$I_{REF} = \frac{V_{REF}}{R1} \quad \text{Ecuación 17}$$

Siendo V_{REF} la tensión de referencia interna del DAC cuyo valor es de 1,2V.

Para convertir la salida de corriente en una salida de tensión que pueda ser posteriormente amplificada en corriente y aplicada al electrodo se utilizan unas resistencias conectadas entre las salidas IA e IB del DAC y masa ($R16$ y $R19$). Si se elige el mismo valor para $R16$ y $R19$ la expresión de la tensión de salida diferencial es la Ecuación 18.

$$VDIFF = (I_{OUTA} - I_{OUTB}) \cdot R19 \quad \text{Ecuación 18}$$

Considerando las ecuaciones anteriores se obtiene:

$$VDIFF = \frac{(2 \cdot VALDIG - 1023)}{1024} \cdot \frac{16 \cdot R19}{R1} \cdot V_{REF} \quad \text{Ecuación 19}$$

Dado que la tensión a aplicar al electrodo debe estar comprendida entre -0,5V y +0,5V se escogieron los siguientes valores para las resistencias:

$$R19 = R16 = 52 \, \Omega \text{ y } R1 = 2,2 \, k\Omega$$

Con ellos el DAC tiene el siguiente comportamiento de salida (ver Tabla 1):

Valor a la salida de la CPLD1	Valor leído por el DAC (10 bits)	Tensión diferencial de salida
255	1020	+0.4854V
128	512	0.0004V
0	0	-0.4882V

Tabla 1. Tensión diferencial de salida del DAC en función de los valores digitales de entrada.

El condensador $C28$ conectado entre las salidas IA e IB se utiliza para formar un filtro pasa bajo que elimine el ruido de alta frecuencia.

Para utilizar la referencia interna del DAC hay que activarla conectando el pin $REFLO$ a masa. En estas condiciones el DAC genera una tensión de 1,2V por el

pin *REFIO*. Dicha tensión tiene que ser estabilizada mediante un condensador *C4* de 100nF entre el pin *REFIO* y masa.

Por otro lado, para optimizar el comportamiento del circuito el fabricante aconseja conectar condensadores *C1*, *C3* y *C2* de 100nF entre los pines *COMP1*, *COMP2* y *COMP3* y masa.

El convertor dispone de dos alimentaciones: una analógica (*AVDD*) y otra digital (*DVDD*) con sus respectivas masas (*DCOM* y *ACOM*). La alimentación digital se desacopla mediante dos condensadores (*C5* de 100nF y *C32* de 1µF) entre *DVDD* y *DCOM*. La alimentación analógica utiliza un filtro compuesto por una ferrita (*F1*) y dos condensadores (*C42* de 100nF y *C34* de 10µF).

2.3. Módulo del Convertidor Analógico Digital (ADC)

Para el muestreo de la tensión y la corriente se requerían dos convertidores A/D capaces de trabajar a una velocidad de al menos 25 MSPS para muestrear señales senoidales de 1 MHz con la suficiente resolución temporal. Finalmente se eligió el convertidor AD9281 de Analog Devices que tiene una velocidad de muestreo máxima de 28 MSPS y una resolución de 8 bits. Aunque se trata de un ADC de doble canal en esta aplicación solo se utiliza uno de ellos (Figura 27).

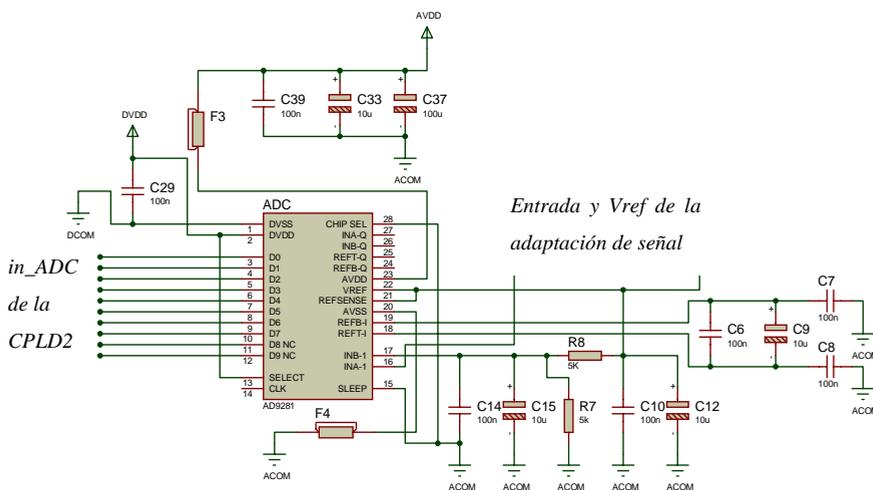


Figura 27. Módulo del convertidor A/D

El AD9281 posee un amplificador de muestreo y retención a la entrada. Internamente dispone de una arquitectura *pipeline* multietapa que garantiza la integridad de los datos.

Otras características son:

- Tensión de alimentación comprendida entre +2,7V y +5,5V
- Bajo consumo (225mW) trabajando a un tensión unipolar de 3V.
- Tensión de referencia interna compensada térmicamente.

Como se ha comentado anteriormente, el AD9281 integra dos convertidores internos de los cuales sólo se utiliza uno. La selección del canal en uso se efectúa conectando la entrada de selección (SELECT) a nivel alto (Figura 27). El ADC muestrea dicha entrada en cada flanco de subida de la señal de reloj. Después de la conversión el resultado es volcado en el bus digital de 8 líneas.

Dentro de la etapa de entrada del ADC hay un desplazador de nivel que permite el procesamiento de señales con valores analógicos negativos.

En la Figura 27 se muestra la configuración de la etapa de entrada. De acuerdo con las indicaciones detalladas en las hojas de datos del fabricante, en las entradas *IREFT-* y *IREFB-* se colocan condensadores de desacoplo (*C6*, *C7*, *C8* y *C9*).

Al conectar *VREF* y *REF SENSE* juntos se genera una referencia de 1V en dichos pines (que se filtra mediante los condensadores *C10* y *C12*). Utilizando un divisor de tensión (*R7* y *R8*) se obtiene en la entrada *IINB* una tensión de continua de 0,5V (que a su vez se filtra mediante los condensadores *C14* y *C15*). Con esta configuración el rango de tensión de entrada en el pin *IINA* es de 0V a 1V.

El conversor A/D incorpora dos alimentaciones: una analógica (*AVDD*) y otra digital (*DVDD*) con sus respectivas masas (*DCOM* y *ACOM*). La alimentación digital se desacopla mediante un condensador (*C29* de 100nF) entre *DVDD* y *DCOM*. La alimentación analógica utiliza un filtro compuesto por una ferrita (*F3*) y tres condensadores (*C39* de 100nF, *C33* de 10 μ F y *C37* de 100 μ F).

2.4. Circuitos de Adaptación de señal

Circuito de adaptación de señal del convertidor D/A

La señal senoidal a la salida del convertidor D/A debe amplificarse en corriente y adaptarse en tensión antes de ser aplicada al electrodo. El rango de tensión que se desea aplicar es $[-0,5V; +0,5V]$, debiendo proporcionar una corriente de hasta 100mA. Por otra parte el ancho de banda de la etapa debe ser de 1MHz. La alimentación de esta etapa será una alimentación simétrica de $-5V/+5V$.

En la Figura 28 se muestra el esquema eléctrico de la etapa de amplificación utilizada a la salida del convertidor D/A.

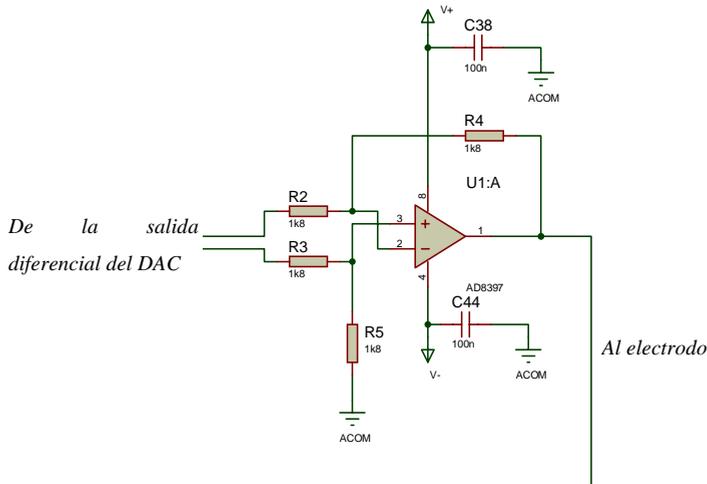


Figura 28. Circuito de adaptación de señal del convertidor D/A

Puesto que la salida del convertidor D/A es diferencial, se ha elegido una configuración de entrada diferencial para la etapa amplificadora. La tensión de salida viene dada por la Ecuación 20.

$$V_{out} = \frac{R2 + R4}{R3 + R5} \cdot \frac{R5}{R2} \cdot V2 - \frac{R4}{R2} \cdot V1 \quad \text{Ecuación 20}$$

Siendo $V1$ la tensión en $R2$ a la entrada del circuito y $V2$ la tensión en $R3$ a la entrada del circuito.

Eligiendo $R2 = R3 = R4 = R5 = 1K8\Omega$ se obtiene la Ecuación 21.

$$V_{out} = V2 - V1 \qquad \text{Ecuación 21}$$

El operacional elegido para esta etapa fue el AD8397 de Analog Devices cuyas características fundamentales son alta corriente de salida ($I_{OMAX}=170mA$) y gran ancho de banda ($BW=50MHz$).

Circuitos de adaptación de señal de los convertidores A/D

Los convertidores A/D muestrean las señales tanto de la tensión aplicada al electrodo como de la corriente que circula por el mismo. Son señales de alterna que deben adaptarse y elevarse para poder ser conectadas a la entrada de los convertidores A/D.

El circuito de adaptación de señal del convertidor A/D que muestrea la tensión se compone de un amplificador operacional en configuración seguidor y un amplificador operacional en configuración desplazadora (Figura 29). El circuito de adaptación de señal del convertidor A/D que muestrea la corriente (Figura 30) se compone únicamente de un amplificador operacional en configuración desplazadora (ya que va precedido del circuito de medida de corriente que hace las funciones de buffer).

- Bloque seguidor: funciona como adaptador de impedancias para evitar que la siguiente etapa no cargue a la anterior. Las características que debe tener el amplificador operacional utilizado son amplio ancho de banda y baja corriente de entrada. El operacional elegido fue el AD8030 (ancho de banda: 80MHz y corriente de entrada $0,7\mu A$).
- Bloque desplazador: el convertidor A/D puede procesar señales dentro del rango $[0V; 1V]$: al valor de tensión de entrada analógica 0V le hace corresponder el valor digital 0 y al valor de tensión analógica 1V le hace corresponder el valor digital 255. Sin embargo las señales que provienen del electrodo (tensión y corriente) tienen un rango de variación de $[-0,5V; +0,5V]$. Para adaptar este rango al de entrada del convertidor A/D es necesario elevarlas 0,5V. La Figura 29 muestra el circuito elevador

acoplado al convertidor A/D de tensión. Para su implementación se eligió también el AD8030.

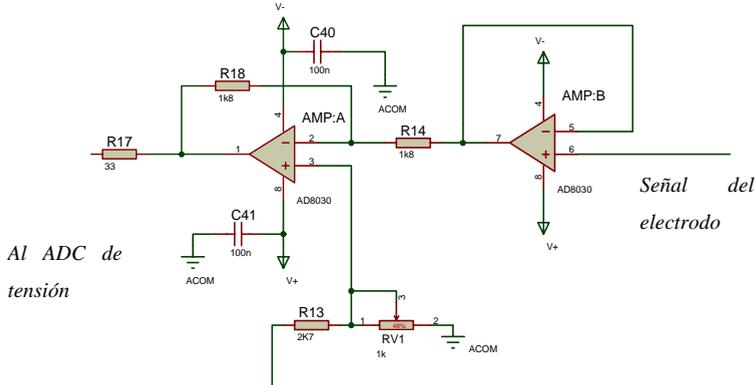


Figura 29. Circuito de adaptación de señal del convertidor A/D de tensión.

El valor de la tensión de salida para este circuito es:

$$V_{out} = (V_+ - V_{in}) \cdot \frac{R18}{R14} + V_+ \quad \text{Ecuación 22}$$

Siendo V_{in} la tensión en $R14$ a la entrada del bloque desplazador. Si se elige $R14 = R18 = 1K8\Omega$.

$$V_{out} = 2 \cdot V_+ - V_{in} \quad \text{Ecuación 23}$$

Para obtener una salida de 0,5V cuando a la entrada hay 0V la tensión de referencia V_+ deberá ser:

$$V_+ = \frac{V_{out} + V_{in}}{2} = 0,25V \quad \text{Ecuación 24}$$

La tensión de referencia del circuito desplazador se obtiene a partir de la tensión de referencia del convertidor A/D mediante un puente resistivo compuesto por una resistencia ($R13$) y un potenciómetro ($RV1$).

El diseño del circuito desplazador para el convertidor A/D de corriente es idéntico al de tensión (Figura 30).

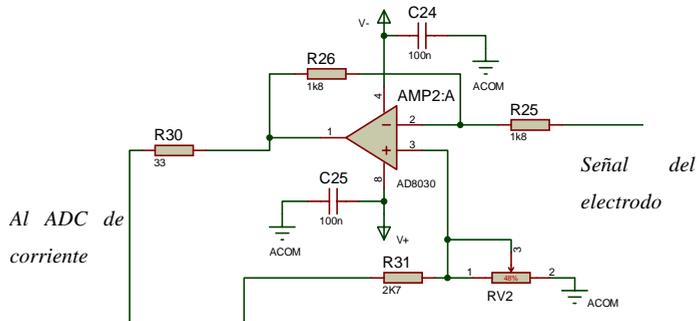


Figura 30. Circuito de adaptación de señal del convertidor A/D de corriente

2.5. Circuito de medida de corriente (puente autobalanceado)

Como se explica en el apartado de *Antecedentes - 3 Lenguas electrónicas* página 27, la técnica elegida para la medida de corriente es el puente autobalanceado (auto-balancing bridge). El circuito diseñado a tal efecto se muestra en la Figura 31. Mediante la resistencia de *shunt* la corriente se convierte en tensión. En el sistema de medida se han colocado varias resistencias de *shunt*, que permiten disponer de varias escalas de corriente, con objeto de poder cubrir un mayor rango de impedancia. En concreto hay 4 resistencias de *shunt* de valores 100Ω, 1kΩ, 10kΩ, 100kΩ. La selección de la resistencia utilizada en cada momento se lleva a cabo mediante unos relés (representados en la Figura 31 con interruptores para simplificar el esquema) controlados por unas señales digitales que provienen de la CPLD1. En cada medida la aplicación del PC establece cual debe ser la resistencia de *shunt* utilizada para medir la corriente. Si al analizar los datos la aplicación detecta que la corriente es muy baja repite la medida seleccionando una resistencia de *shunt* mayor.

El amplificador operacional utilizado es el AD8030 por tener un amplio ancho de banda, una alta impedancia de entrada y una alta corriente de salida.

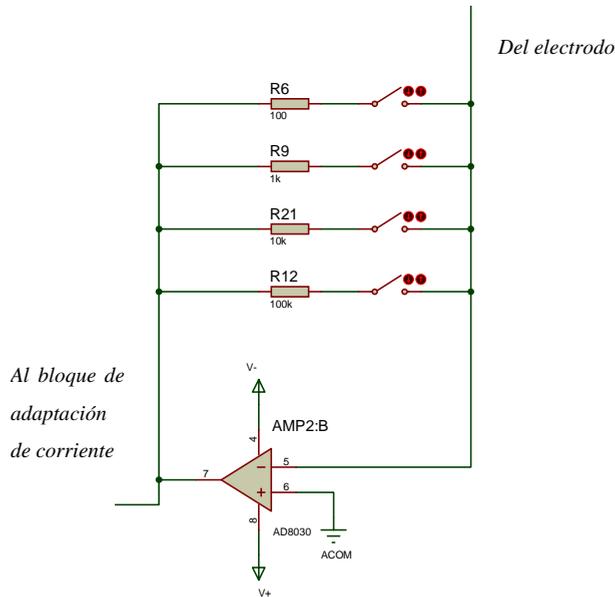


Figura 31. Circuito de medida de corriente (puente autobalanceado).

2.6. Alimentación del equipo

Para evitar que el ruido generado en el bloque digital afectara a los circuitos analógicos se utilizaron alimentaciones diferentes. Sin embargo, con el fin de no complicar en exceso el diseño, no se optoacoplaron las señales digitales que van de la CPLD1 al DAC y de los ADC's a la CPLD2. Por tanto la masa es común tanto para la parte digital como para la parte analógica. En el diseño del PCB (*Capítulo 1. Desarrollo del sistema de medida - 2.7 Tratamiento del ruido* página 70) se trazaron planos de masa independientes para cada una de las partes, uniéndolos en un único punto. En consecuencia el circuito incorpora dos conectores de alimentación independientes: uno para la parte digital y otro para la parte analógica.

Alimentación parte analógica

En la parte analógica se integran los amplificadores operacionales de los bloques de adaptación de señal y del circuito de medida de corriente. Dichos amplificadores operacionales se alimentan con tensiones simétricas de +5V/-5V, puesto que al electrodo se le debe aplicar una tensión alterna. Dado que las señales analógicas son sensibles al ruido generado por las fuentes de alimentación conmutadas se utilizó una fuente de alimentación lineal con salida de tensión simétrica +5V/-5V de 500mA (FE8 de CEBEK).

Alimentación parte digital

El sistema digital trabaja con una única tensión de alimentación, 5V. También se empleó una fuente lineal para el sistema digital, puesto que el ruido generado por una fuente de alimentación conmutada podría afectar a las señales analógicas y el consumo de la parte digital no era excesivamente elevado. Finalmente se optó por una fuente lineal de 5V 1A (FE3 de CEBEK).

2.7. Tratamiento del ruido

La reducción del ruido es una parte importante en el diseño de cualquier sistema electrónico. Existen dos tipos de ruido: ruido externo (generado por dispositivos externos al sistema) y ruido interno (generado dentro del propio sistema).

Pueden emplearse un gran número de técnicas para reducir la generación de ruido de un sistema electrónico y para protegerlo del ruido interno y externo.

En sistemas en los que se mezclan señales digitales con señales analógicas la problemática del ruido aumenta. En el diseño del equipo se ha procurado utilizar técnicas que reduzcan la influencia del ruido sobre las medidas. Cuando se trabaja con señales de frecuencias del orden del megahercio es importante tener especial cuidado con el diseño del hardware, puesto que las impedancias parásitas de cualquiera de los subsistemas (componentes electrónicos, pistas del PCB, etc.) empiezan a cobrar relevancia.

Al representar el camino recorrido por una señal entre dos circuitos de un mismo sistema electrónico (Figura 32), se identifica el trayecto de ida y vuelta. Si las referencias de los dos circuitos están unidas, el retorno de la señal se realizará por el punto de unión. Esta conexión tiene una impedancia que, a determinadas frecuencias, puede provocar diferencias de potencial entre las referencias de ambos circuitos. Por otro lado, al tratarse de una conexión entre referencias, pueden circular por ella otras corrientes de retorno provenientes de otros circuitos, que pueden generar ruido adicional no correlacionado.

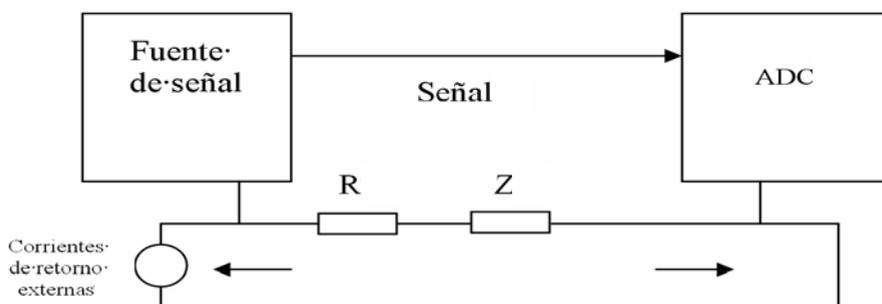


Figura 32. Trayectoria de las corrientes en circuitos con la misma referencia.

Cuando una señal que va de un circuito a otro no dispone de una conexión propia entre las referencias para que circule la corriente de retorno, dicha corriente buscará otro camino para llegar a la referencia origen, generando ruido en otras conexiones. Esto es especialmente grave cuando la señal que genera el ruido presenta corrientes altas que varían constantemente (por ejemplo las corrientes pulsantes de las señales digitales).

Un bucle de tierra se da cuando la conexión a la referencia de algunos circuitos del sistema se hace a través de más de un camino. Las corrientes de retorno de las señales generadas por estos circuitos circulan produciendo ruido. Para prevenir los bucles de tierra es conveniente que todas las referencias de los circuitos que componen el sistema se conecten en un único punto. Es lo que se conoce como *Star Ground*.

Cuando hay señales digitales mezcladas con señales analógicas es importante que las corrientes de retorno pulsantes de los circuitos digitales no afecten a las señales analógicas. Para ello las referencias de los circuitos digitales y las referencias de los circuitos analógicos deben unirse en un único punto, de forma

que las corrientes de retorno de las señales digitales no circulen por las conexiones de las referencias de los circuitos analógicos.

Si los circuitos analógicos comparten alimentación con los circuitos digitales, al conectar la fuente de alimentación se podría generar un bucle de tierra. De ahí que sea conveniente utilizar fuentes de alimentación diferentes para los circuitos analógicos y los digitales.

Además, con objeto de disminuir la impedancia de las conexiones de las referencias de los circuitos digitales por un lado y de los circuitos analógicos por otro, se necesitan sendos planos de masa. Por el plano de masa de los circuitos digitales circularán las corrientes de retorno de las señales digitales y por el de los circuitos analógicos las corrientes de retorno de las señales analógicas.

También se puede minimizar el ruido con un correcto trazado de las pistas que transportan las señales en el PCB, para evitar que éstas interfieran entre si.

Las fuentes de alimentación no son sistemas perfectos. En primer lugar todas ellas generan cierta cantidad de ruido que puede ser de alta o de baja frecuencia. Por otro lado su impedancia de salida es no nula, por lo que cualquier cambio en la corriente que suministra provocará un cambio en la tensión de salida. Este efecto puede atenuarse utilizando condensadores de desacoplo.

Las precauciones que se han tomado a la hora de realizar el ruteado de la placa de circuito impreso han sido:

- Separación de las señales analógicas y de las digitales para evitar que las rápidas conmutaciones digitales induzcan ruido en los circuitos analógicos.
- Especial cuidado en el ruteado de las señales de entrada a los convertidores A/D (el ruido que se induzca en esa zona será recogido directamente por el sistema) y cualquier señal conectada a entradas de alta impedancia, por ser más sensibles al ruido. En general se procuró que las pistas correspondientes a las señales más sensibles al ruido fueran lo más cortas posible.

- Las líneas de entrada se situaron lejos de las señales de salida de los circuitos para evitar la diafonía (*crosstalk*).
- Para minimizar los efectos del ruido presente a la salida de una fuente de alimentación las conexiones de entrada al circuito de las alimentaciones digital y analógica se separaron y desacoplaron tanto para bajas como para altas frecuencias.
- Se incorporaron condensadores de desacoplo para los circuitos, tanto analógicos como digitales, situándolos lo más cerca posible del pin de alimentación. En aquellos circuitos que presentan varios pines de alimentación (como por ejemplo las CPLD's) se incorporó un condensador de desacoplo por cada pin de alimentación. En cuanto a los convertidores A/D y D/A, se filtró la alimentación analógica mediante filtros LC consistentes en una batería de condensadores en paralelo asociada en serie con una ferrita. La alimentación digital de dichos componentes se desacopló mediante condensadores.
- Se utilizaron planos de masa tanto para la parte analógica como para la digital. Ambos planos de masa se unieron en un único punto situado a mitad de los convertidores A/D y D/A. De esta forma se evitaron los bucles de tierra y se redujo la impedancia del camino de las corrientes de retorno.
- Se procuró cubrir las zonas que quedaron libres con planos de masa. No obstante, no se colocaron cerca de zonas en las que se quería reducir las capacitancias parásitas (por ejemplo para evitar la reducción del ancho de banda de los amplificadores).
- En el diseño de la placa de circuito impreso se utilizaron 4 capas, con la siguiente distribución en cuanto a los planos de masa y alimentación:
 - ✓ Capa Top: planos de las masas digital y analógica
 - ✓ Capa Bottom: planos de las masas digital y analógica
 - ✓ Capa Interna 1: plano de la alimentación digital
 - ✓ Capa Interna 2: plano de la alimentación analógica

3. Descripción del software del Equipo Electrónico de Medida.

3.1. *Quartus II de Altera*

Para la elaboración del código de las CPLD's se utilizó la herramienta de desarrollo Quartus II Web Edition de Altera. Se trata de un software gratuito que permite la generación de los ficheros de programación de los dispositivos de lógica programable del fabricante. En concreto Quartus II permite:

- Introducción de los datos del diseño: el diseño se puede representar mediante esquemáticos, lenguajes de programación hardware (VHDL, Verilog y AHDL) o a partir de la información generada con otras herramientas EDA (mediante ficheros de netlist por ejemplo).
- Compilación del diseño (síntesis y ruteado).
- Simulación del diseño: el software permite establecer la evolución temporal de las señales de entrada y aplicar dichas señales al diseño, obteniendo la evolución temporal de las salidas del circuito.
- Programación de los dispositivos de lógica programable: el proceso de compilación genera los ficheros necesarios para la programación de los dispositivos de lógica programable (.pof o .sof). Mediante un cable de programación, Quartus II permite la programación y verificación de los dispositivos.

Para la implementación del código de las dos CPLD's se decidió utilizar el lenguaje de programación VHDL dado que era un método compacto, sencillo y portable de representar el diseño. Se realizaron dos programas VHDL con sus respectivos proyectos, uno para cada CPLD's.

3.2. *Código de la CPLD1 (Generación de señales)*

En la Figura 33 aparece la estructura interna del programa VHDL de la CPLD1.

El programa se compone de tres sentencias concurrentes en el primer nivel del cuerpo de la arquitectura:

- Una asignación no condicional que establece que el valor de la salida *clk_DAC* (señal de reloj del DAC) se obtiene directamente de la señal de reloj de la CPLD1 (*clk*).
- El proceso *SIN_GEN* encargado del almacenamiento de los datos recibidos del ordenador y de la generación de la señal senoidal.
- El proceso *RX* encargado de la recepción en serie de los datos enviados por el PC en formato UART y su conversión a datos paralelos que son transmitidos al proceso *SIN_GEN*.

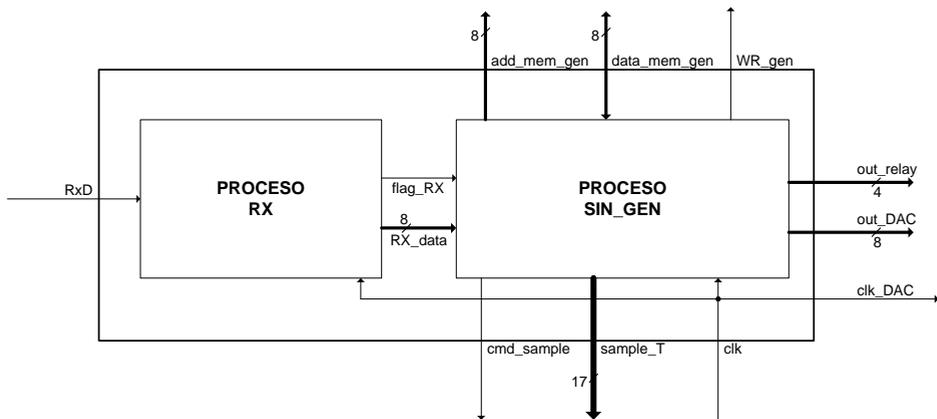


Figura 33. Estructura interna de la CPLD1 (generación de señales).

3.2.1. Proceso RX

El *proceso RX* se encarga de la recepción de los datos enviados en serie por el PC y su posterior transmisión en paralelo al proceso *SIN_GEN*. Incluye únicamente la señal de reloj en la lista de sensibilidades, es decir el proceso sólo “ocurre” cuando hay un cambio en la señal de reloj *clk*. Además, la primera instrucción del proceso es una sentencia “if”, que condiciona la ejecución del resto del código a que se produzca un flanco de subida en la señal de reloj. Es decir, todo lo que ocurre dentro del proceso tendrá lugar únicamente en los

flancos de subida de la señal de reloj, que tiene una frecuencia de 25MHz (por consiguiente el proceso ocurre 25 millones de veces por segundo).

El formato de las tramas de bits UART enviadas por el PC es: 8 bits de datos, sin bit de paridad y 1 bit de parada (ver Figura 34). La velocidad de comunicación es de 38.400 baudios.

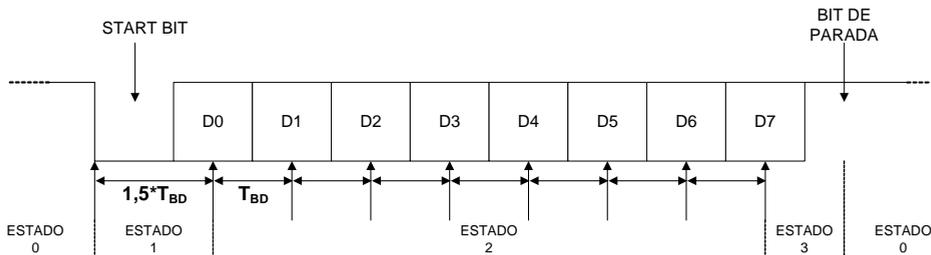


Figura 34. Formato de trama UART.

En reposo la línea de recepción de datos *RxD* está a nivel alto. Cuando el PC inicia la transmisión de un byte, pone la línea *RxD* a nivel bajo durante un tiempo de bit T_{BD} , siendo el tiempo de bit igual a la inversa de la velocidad de comunicación (baudrate). A continuación el PC envía los 8 bits de datos, empezando por el menos significativo (mantiene el valor de cada uno de los bits durante un tiempo de bit en la línea). Para finalizar el PC pone la línea a nivel alto durante un tiempo de bit (bit de parada).

El *proceso RX* se ha implementado mediante una máquina de estados. En la Figura 35 se muestra el diagrama de estado simplificado.

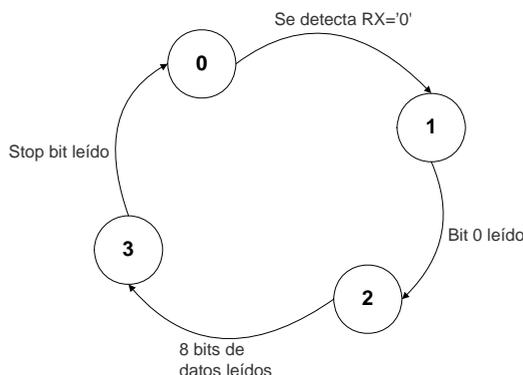


Figura 35. Máquina de estados del *proceso RX*.

El funcionamiento de la máquina de estados del *proceso RX* es el siguiente:

- Estado 0 (estado inicial): durante este estado el proceso está a la espera de que la línea *RX* se ponga a '0'. Cuando esto ocurre pasa al estado 1. Además en el estado 0 la línea *flag_RX* se pone a 0.
- Estado 1: sirve para realizar una temporización de $1,5T_{BD}$. Su finalidad es dejar pasar el tiempo suficiente para que se haya transmitido el start bit completo y la mitad del primer bit. El mejor momento para leer un bit es cuando se ha cubierto la mitad de su transmisión, dado que en ese instante la información transmitida está menos afectada por las deformaciones de la señal. Para implementar esta temporización se utiliza un contador (*div_rx*) que se pone a cero cuando se cambia al estado 1 y que se incrementa dentro del estado 1 en cada ciclo de la señal de reloj. Esta variable se incrementa hasta que alcanza el valor:

$$\frac{1,5 \cdot T_{BD}}{T_{CLK}} = 1,5 \cdot \frac{F_{CLK}}{BAUDRATE} = 1,5 \cdot \frac{25 \cdot 10^6}{38400} = 976$$

Una vez alcanzado dicho valor, se lee el estado de la línea (éste se corresponde con el valor del primer bit) y se pasa al estado 2 inicializando la variable *div_rx* a 0. Los bits leídos se van almacenando en la señal *RX_data* que es una array de bits.

- Estado 2: se leen los otros 7 bits de datos. Para cada uno de los bits se establece una temporización de T_{BD} , lo que nos permite leer la información recibida justo a mitad de cada bit. Para ello se utiliza el contador *div_rx* que se pone a cero cada vez que se ha leído un bit: Dicha variable se incrementa dentro del estado 2 en cada ciclo de la señal de reloj hasta que alcanza el valor:

$$\frac{T_{BD}}{T_{CLK}} = \frac{F_{CLK}}{BAUDRATE} = \frac{25 \cdot 10^6}{38400} = 651$$

Una vez alcanzado dicho valor, se lee el estado de la línea (esto se corresponde con el valor del bit que se quiere leer), se almacena el valor leído en la posición correspondiente de *RX_data* y se incrementa una variable que indica qué bit se está leyendo (*num_bit_rx*). Cuando esta

variable alcanza el valor 8, todos los bits de datos han sido leídos y se pasa al estado 3 poniendo a cero *div_rx*.

- Estado 3: se confirma la validez de la trama UART leyendo el bit de parada. Para ello se establece una nueva temporización de T_{BD} , (lo que le permite situarse justo a mitad del bit de parada) y se lee el estado de la línea *RxD*. Si la línea está a nivel alto significa que el bit de parada es correcto y se puede dar el dato recibido como válido. En dicho caso se pone a '1' la línea *flag_RX* para indicarle al proceso *SIN_GEN* que puede disponer del dato almacenado en *RX_data* y se pasa al estado 0. Sin embargo si la línea *RxD* está a nivel bajo, el bit de parada sería incorrecto y no se pondría la línea *flag_RX* a '1'; por lo tanto el dato recibido no será tenido en cuenta por el proceso *SIN_GEN*.

3.2.2. Proceso *SIN_GEN*

El proceso *SIN_GEN* se encarga de procesar los datos recibidos del PC, almacenar los datos que corresponden a la evolución temporal de la señal senoidal en la memoria RAM y enviarlos al DAC con la cadencia indicada por el PC.

Al igual que ocurre con el proceso *RX*, el proceso *SIN_GEN* incluye únicamente la señal de reloj en la lista de sensibilidades y su primera instrucción es una sentencia "if" que condiciona la ejecución del resto del código a que se produzca un flanco de subida en la señal de reloj. Por tanto todo lo que "ocurre" dentro del proceso *SIN_GEN* tendrá lugar únicamente en los flancos de subida de la señal de reloj.

Como se indica en la Figura 36, el PC envía un total de 261 bytes a la CPLD1:



Figura 36. Datos enviados del PC a la CPLD1.

El primer byte es un byte de cabecera que siempre tiene el valor hexadecimal AAH. Los siguientes 256 bytes corresponden a los valores de la evolución

temporal de la señal. A continuación vienen 3 bytes mediante los cuales el PC le indica a la CPLD1 con qué cadencia debe sacar los datos al DAC para obtener la frecuencia de la señal senoidal deseada. En realidad este valor de 3 bytes se corresponde con el número de veces que la CPLD debe incrementar un contador antes de sacar un nuevo dato. Por ejemplo, si se quiere generar una señal senoidal de 1Hz, los 256 puntos correspondientes a la evolución temporal deben sacarse con una cadencia de T_{CADENCIA} igual a $1/256$ segundos por dato. La CPLD1 incrementa el contador en cada ciclo de reloj. Para obtener una temporización de $1/256$ la variable contador deberá incrementarse:

$$DIV = \frac{T_{\text{CADENCIA}}}{T_{\text{CLK}}} = \frac{25 \cdot 10^6}{256} = 97656$$

El valor transmitido es un valor de 17 bits. El PC transmite primero la parte baja del valor calculado (div1), luego el segundo byte (div2) y por último el byte más significativo (div3) que en realidad solo contiene un bit de información relevante.

El siguiente byte indica cuál debe ser el estado del los relés que permiten la selección de la resistencia de *shunt* del circuito de medida de corriente.

Para generar señales de determinadas frecuencias no siempre es posible trabajar con 256 puntos. Por ejemplo, para generar señales de 1MHz solo se pueden utilizar 25 puntos ya que la frecuencia máxima de trabajo de la CPLD1 es de 25MHz. A pesar de todo, el PC siempre envía 256 puntos y la CPLD1 siempre almacena en la memoria RAM externa esos 256 bytes. Sin embargo, a la hora de volcar esos datos al DAC, la CPLD1 sí que tiene en cuenta cuál es el número de puntos que se corresponden realmente con un periodo de la señal. El último byte de la trama enviada indica el número de puntos que la CPLD1 debe utilizar para generar un ciclo de la señal. Si bien en la mayoría de los casos ese valor es 256, para determinadas frecuencias puede variar.

El proceso *SIN_GEN* se implementa mediante una máquina de estados. En la Figura 37 se muestra su estructura simplificada.

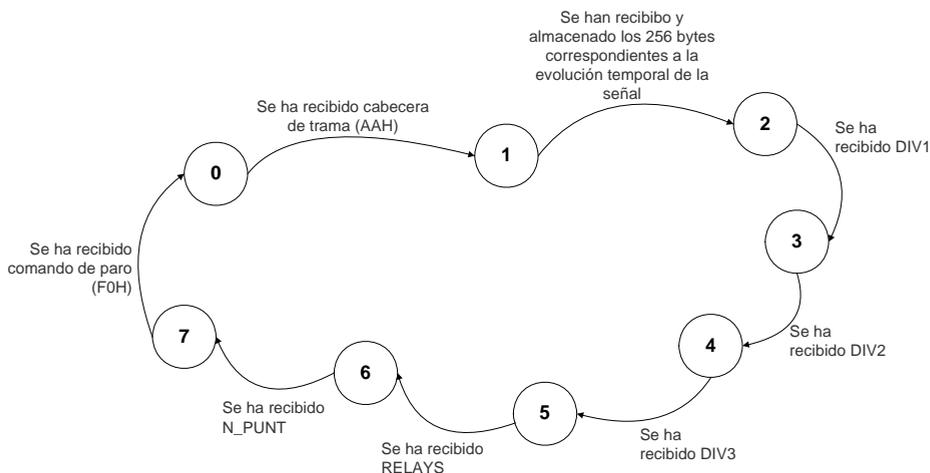


Figura 37. Máquina de estados del proceso SIN_GEN.

- Estado 0 (estado inicial): el proceso está a la espera de que recibir la cabecera de trama (valor hexadecimal AAH). Para ello monitoriza el estado de la señal *flag_TX* proveniente del proceso *RX*. Cuando *flag_TX* se pone a '1', el proceso comprueba el valor de *RX_data*. Si es igual a AAH se pasa al estado 1.
- Estado 1: se leen los 256 bytes correspondientes a los valores de la evolución temporal de la señal. Se monitoriza el nivel de la señal *flag_RX*. Cada vez que dicha señal se pone a '1' (se ha recibido un dato del PC) se lee el dato recibido de *RX_data* y se almacena en la memoria RAM externa. Para almacenar el dato se coloca el valor de la dirección en la que se quiere escribir en el bus *add_mem_gen*, se escribe el dato leído en *data_mem_gen* y se mantiene la línea *WR_gen* a '0'. Cada vez que se escribe un dato se incrementa el valor de *add_mem_gen* y se comprueba si ha llegado a 255. Si es así significa que se han recibido y almacenado los 256 bytes correspondientes a los valores de la evolución temporal de la señal. En dicho caso se pasa al estado 2. En caso contrario, se permanece en el estado 1 a la espera de que *flag_RX* se vuelva a poner a '1'.
- Estado 2: se lee el byte menos significativo del valor de *cadencia (DIV)*. Si *flag_RX* se pone a '1' el valor de *RX_data* se almacena en la parte baja de la variable *div_gen* y se pasa al estado 3. Además en este estado se

configura la memoria RAM externa en modo lectura, poniendo la línea de salida *WR_gen* a '1'.

- Estado 3: se lee el segundo byte menos significativo del *valor* de cadencia. Si *flag_RX* se pone a '1' el valor de *RX_data* se almacena en el segundo byte menos significativo de la variable *div_gen* y se pasa al estado 4.
- Estado 4: se lee el byte más significativo del valor de *cadencia* (de este byte en realidad solo se utiliza el bit 0, que corresponde al bit 17 del valor de cadencia). Si *flag_RX* se pone a '1' el bit 0 de *RX_data* se almacena en el bit más significativo de *div_gen* y se pasa al estado 5.
- Estado 5: se lee el valor de la configuración de los relés que *seleccionan* la resistencia de *shunt*. Si *flag_RX* se pone a '1' los 4 bits menos significativos del valor de *RX_data* se vuelcan en la salida *out_relay* y se pasa al estado 6.
- Estado 6: se lee el valor del número de puntos que deben utilizarse para establecer la evolución temporal de la señal senoidal. Si *flag_RX* se pone a '1' el valor de *RX_data* se almacena en la variable *var_time* y se pasa al estado 7.
- Estado 7: se lleva a cabo la generación de la señal senoidal utilizando los datos recibidos del PC. Cada vez que se entra en el estado 7 se compara el valor de un contador (*cnt_gen*) con el valor de cadencia recibido *div_gen*. Si el valor de *cnt_gen* es igual al valor de *div_gen* se pasa al DAC un nuevo punto, se pone a cero *cnt_gen*, se toma el valor de *data_mem_gen* y se escribe en *out_DAC*. Además se prepara la memoria RAM para que vuelque en el bus de datos el valor del siguiente punto. Para ello se incrementa el valor de la salida *add_mem_gen*. Cada vez que se incrementa *add_mem_gen* se debe comprobar si ya se ha recorrido el número de puntos correspondiente a un periodo de la señal. Se compara el valor de *add_mem_gen* con el valor de *var_time*. Si son iguales significa que se ha generado un periodo completo. En ese caso se debe reiniciar a 0 el valor de *add_mem_gen* e indicarle a la CPLD2 que puede iniciar el proceso de muestreo. Para ello pone a '1' *cmd_sample* y escribe el valor de la variable *div_gen* en la salida *sample_T*, ya que la CPLD2

también necesita conocer con qué cadencia debe llevar a cabo el muestreo de la señal.

El proceso de generación de la señal senoidal se detendrá en el momento en el que el PC envíe un comando de paro (valor en hexadecimal F0H). Cada vez que se entra en el estado 7 se comprueba si la señal *flag_RX* está a '1'. Si es así, se verifica el valor de *RX_data*; si es igual a F0H se pone *cmd_sample* a '0' para que la CPLD2 finalice el proceso de muestreo y pase al estado 0.

3.3. Código de la CPLD2 (Proceso de Muestreo)

En la Figura 38 aparece la estructura interna del programa VHDL de la CPLD2. El programa se compone de cuatro sentencias concurrentes en el primer nivel del cuerpo de la arquitectura:

- Una asignación no condicional que establece que el valor de la salida *clk_ADC_I* (señal de reloj del ADC de corriente) se obtiene directamente de la señal de reloj de la CPLD2 (*clk*).
- Una asignación no condicional que establece que el valor de la salida *clk_ADC_V* (señal de reloj del ADC de tensión) se obtiene directamente de la señal de reloj de la CPLD2 (*clk*).
- El proceso *SAMPLER*, encargado de tomar los valores digitales correspondientes a las muestras de las señales de corriente y tensión en el electrodo, almacenarlos en las memorias RAM externas y enviarlos en paralelo al proceso *TX_UART* para su posterior transmisión al PC.
- El proceso *TX_UART* encargado de la transmisión en serie al PC, en formato UART, de los datos recibidos en paralelo del proceso *SAMPLER*.

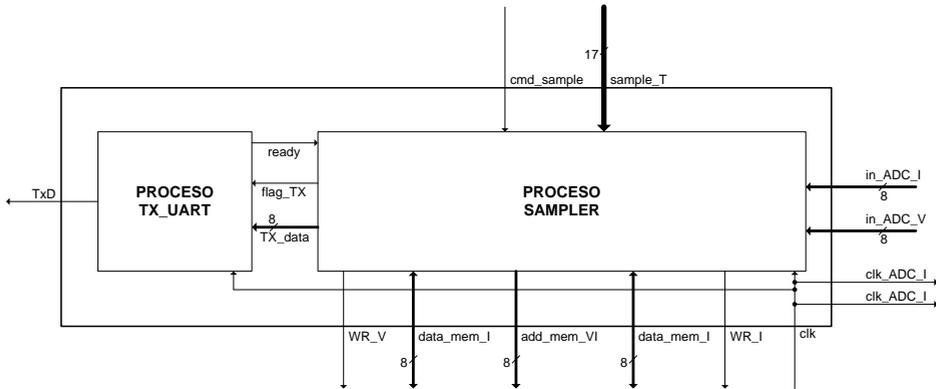


Figura 38. Estructura interna del programa VHDL de la CPLD2

3.3.1. Proceso TX_UART

El proceso *TX_UART* se encarga de transmitir con formato UART (38.400 baudios, 8 bits de datos, sin bit de paridad y un bit de parada) los datos en serie que recibe en paralelo del proceso *SAMPLER*.

El proceso *TX_UART* incluye únicamente la señal de reloj en la lista de sensibilidades, es decir el proceso sólo sucede cuando hay un cambio en la señal de reloj *clk*. Además, la primera instrucción del proceso es una sentencia “if” que condiciona la ejecución del resto del código a que se produzca un flanco de subida en la señal de reloj. Es decir, todo lo que “ocurre” dentro del proceso tendrá lugar únicamente en los flancos de subida de la señal de reloj.

Se ha implementado mediante una máquina de estados y una estructura *case*. En la Figura 39 se muestra el diagrama de estado simplificado del proceso.

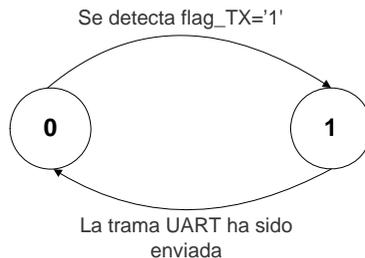


Figura 39. Máquina de estados del proceso TX_UART

El funcionamiento de la máquina de estados del proceso *TX_UART* es el siguiente:

- Estado 0 (estado inicial): En primer lugar se pone la señal de *ready* a '1' para indicarle al proceso *SAMPLER* que el sistema está preparado para enviar datos al PC. Durante este estado el proceso está a la espera de que la señal *flag_TX*, proveniente del proceso *SAMPLER*, se ponga a '1'. Cuando esto ocurre el proceso *SAMPLER* le indica al proceso *TX_UART* que debe enviar el dato de *TX_data*. Una vez realizada la transmisión se inicializa la variable *num_bit_tx* a 0, se pone la línea *ready* a '0' y se pasa al estado 1.
- Estado 1: se incrementa la variable *num_bit_tx* que indica qué bit se está transmitiendo en cada momento. La cadencia de incremento de esta variable debe cumplir con la especificación de la velocidad de comunicación; es decir *num_bit_tx* debe incrementarse cada $T_{BD}=1/38400$ segundos. Dado que el estado 1 ocurre cada flanco de subida de la señal de reloj (25MHz), se necesita una variable contador (*div_tx*) que se vaya incrementando hasta alcanzar un valor límite. Dicho valor debe calcularse de forma que cuando *div_tx* alcance el valor límite haya transcurrido T_{BD} , es decir:

$$\frac{T_{BD}}{T_{CLK}} = \frac{F_{CLK}}{BAUDRATE} = \frac{25 \cdot 10^6}{38400} = 651$$

Cada vez que se cumple con la temporización de T_{BD} (es decir cada vez que *div_tx* llega al valor 651) se pone *div_tx* a 0 y se incrementa *num_bit_tx*. Tras cada incremento de *num_bit_tx* debe comprobarse si ha llegado al valor 20; si es así se pasa al estado 0.

De esta forma, cada vez que el proceso *SAMPLER* pone la línea *flag_TX* a '1' la máquina de estados incrementa la variable *num_bit_tx* de 0 a 20 con una cadencia de T_{BD} . Esta variable indica qué bit se está transmitiendo en cada instante:

- ✓ *num_bit_tx* igual a 0 corresponde al start bit
- ✓ *num_bit_tx* entre 1 y 8 corresponde a los 8 bits de datos
- ✓ *num_bit_tx* igual a 9 corresponde al bit de parada

- ✓ *num_bit_tx* entre 9 y 20 corresponde al estado de reposo (se deja cierto tiempo entre la transmisión de los bits para evitar la saturación del puerto serie del PC)

Por tanto, el estado de la línea de transmisión *TxD* debe ir en concordancia con el valor de *num_bit_tx*. La estructura “case” incorporada en el proceso *TX_UART* lo permite:

```

case num_bit_tx is
  when 0 => TxD <= '0'; -- Bit de Start
  when 1 => TxD <= Tx_data(0); -- Bit 0 de datos
  when 2 => TxD <= Tx_data(1); -- Bit 1 de datos
  when 3 => TxD <= Tx_data(2); -- Bit 2 de datos
  when 4 => TxD <= Tx_data(3); -- Bit 3 de datos
  when 5 => TxD <= Tx_data(4); -- Bit 4 de datos
  when 6 => TxD <= Tx_data(5); -- Bit 5 de datos
  when 7 => TxD <= Tx_data(6); -- Bit 6 de datos
  when 8 => TxD <= Tx_data(7); -- Bit 7 de datos
  when others=> TxD <='1'; -- Bit de Stop + bits de reposo
end case;

```

3.3.2. Proceso *SAMPLER*

El proceso *SAMPLER* debe tomar los datos en paralelo de los convertidores A/D y almacenarlos en las memorias RAM externas. Una vez se ha muestreado un periodo completo, el proceso *SAMPLER* envía en paralelo los datos de las muestras al proceso *TX_UART* para que éste los transmita al PC.

Al igual que ocurre con el proceso *TX_UART*, el proceso *SAMPLER* incluye únicamente la señal de reloj en la lista de sensibilidades y su primera instrucción es una sentencia “if” que condiciona la ejecución del resto del código a que se produzca un flanco de subida en la señal de reloj. Por tanto todo lo que “ocurre” dentro del proceso *SAMPLER* tendrá lugar únicamente en los flancos de subida de la señal de reloj.

Al igual que ocurre con la generación de la señal en el proceso *SIN_GEN*, el muestreo de la señal debe hacerse con una cadencia que se corresponda con su

frecuencia. La cadencia viene determinada por el valor de la entrada *sample_T* (que proviene de la CPLD1). El inicio del proceso de muestreo viene marcado por la entrada *cmd_sample* (que proviene de la CPLD1). Cuando la línea *cmd_sample* se pone a '1' el proceso *SAMPLER* inicia el proceso de muestreo.

El orden en el que las muestras se transmiten al PC aparece en la Figura 40.



Figura 40. Datos enviados de la CPLD2 al PC.

Primero se transmiten los 256 bytes correspondientes a las muestras de tensión y luego se transmiten los 256 bytes correspondientes a la corriente.

El proceso *SAMPLER* se implementa mediante una máquina de estados. En la Figura 41 se muestra su estructura simplificada.

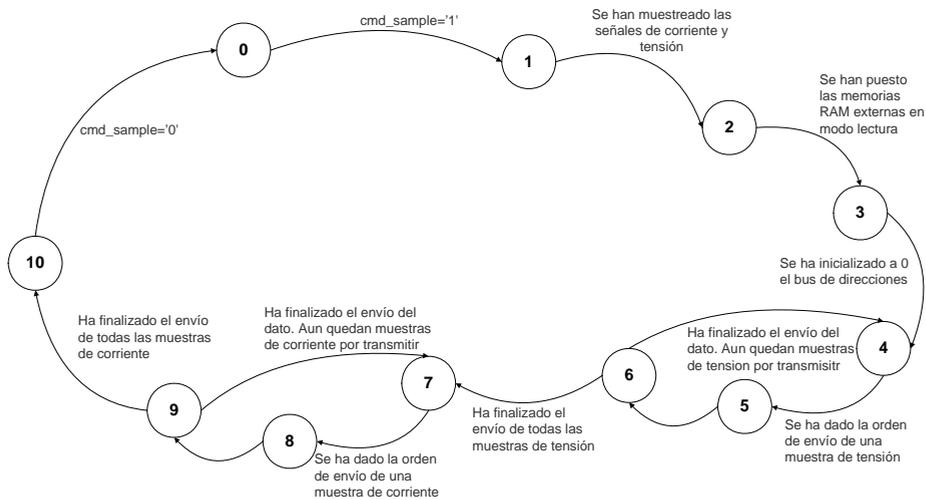


Figura 41. Máquina de estados del proceso *SAMPLER*.

- Estado 0 (estado inicial): el proceso está a la espera de que la CPLD1 le dé la orden de iniciar las tareas de muestreo a través de la línea *cmd_sample*. Al entrar en estado 0 se ponen las dos memorias RAM externas en modo escritura. Mientras la línea de entrada *cmd_sample*

esté a '0' el proceso se mantiene en el estado 0. Cuando *cmd_sample* se pone a '1' se inicializa el bus de direcciones *add_mem_VI* a 0, se preparan en los respectivos buses de datos *data_mem_V* y *data_mem_I* los valores correspondientes a las primeras muestras de tensión y corriente (*in_ADC_V* e *in_ADC_I*), se inicializa el contador de cadencia de muestreo *cnt_sample* a 0 y se pasa al estado 1.

- Estado 1: se toman las 256 muestras de tensión y corriente y se almacenan simultáneamente en las memorias RAM. Como las muestras deben tomarse con la cadencia correspondiente a la frecuencia de la señal muestreada, primero se incrementa el contador de cadencia *cnt_sample* hasta que alcanza el valor la entrada *sample_T*. Cuando esto ocurre, el tiempo de muestreo ha transcurrido y se puede pasar a tomar la siguiente muestra. El proceso pone el contador de cadencia a 0, toma los valores de las salidas de los convertidores A/D *in_ADC_I* e *in_ADC_V* y los escribe en los respectivos buses de datos de las memorias RAM externas (*data_mem_V* y *data_mem_I*). Además incrementa el valor del bus de direcciones para apuntar a la siguiente dirección de las memorias RAM y comprueba si se ha alcanzado el valor de 255. Si se llega a esta cifra es porque ya se han almacenado las 256 muestras de tensión y corriente, en cuyo caso se ponen los buses de datos en modo de entrada y se pasa al estado 2.
- Estado 2: se sitúan las dos memorias en modo lectura para evitar cortocircuitos en el bus de datos. Para ello se ponen las líneas *WR_V* y *WR_I* a '1' y se pasa al estado 3.
- Estado 3: se inicializa el valor del bus de direcciones a 0 y se pasa al estado 4.
- Estado 4: se le pasa al proceso *TX_UART* el dato en paralelo de los valores de las muestras de tensión y se le da la orden de transmitirlo al PC. Para ello se le asigna a la señal *TX_data* el valor del bus de datos de tensión de la memoria RAM externa (*data_mem_V*), se pone a '1' la señal *flag_TX* y se pasa al estado 5.
- Estado 5: estado de transición necesario para que el proceso *TX_UART* pueda leer el valor de *flag_TX* y pueda poner la señal ready a '1'. Si se pasase directamente del estado 4 al estado 6 (donde se comprueba el

valor de *ready*), al proceso *TX_UART* no le habría dado tiempo de procesar el cambio en *flag_TX* y por lo tanto *ready* seguiría a '1'. Eso supondría que se le pasaría un nuevo dato a *TX_UART* antes de que hubiese acabado de transmitir el dato anterior.

- Estado 6: se pone *flag_TX* a '0' y se espera a que el proceso *TX_UART* haya finalizado la transmisión del dato correspondiente a la muestra. Se comprueba el estado de la señal *ready*. Cuando se pone a '1' (dato transmitido completamente) se incrementa el valor del bus de direcciones para apuntar al siguiente dato de la memoria de tensión y se comprueba si se ha llegado a la dirección 255. Si todavía no se ha alcanzado se tienen que transmitir más muestras de tensión y se pasa al estado 4. Si el bus de direcciones marca el valor 255 es porque se han transmitido todas las muestras de tensión. En ese caso se pone el bus de direcciones a 0 y se pasa al estado 7 para iniciar el envío de las muestras de corriente.
- Estado 7: se le pasa al proceso *TX_UART* el dato en paralelo de los valores de las muestras de corriente y se le da la orden de transmitirlo al PC. Para ello se le asigna a la señal *TX_data* el valor del bus de datos de la memoria RAM externa de corriente (*data_mem_I*), se pone a '1' la señal *flag_TX* y se pasa al estado 8.
- Estado 8: al igual que el estado 5, es un estado de transición necesario para que el proceso *TX_UART* pueda leer el valor de *flag_TX* y pueda poner la señal *ready* a '1'.
- Estado 9: se pone *flag_TX* a '0' y se espera a que el proceso *TX_UART* haya finalizado la transmisión del dato. Se comprueba el estado de la señal *ready*. Cuando *ready* se pone a '1' (dato transmitido completamente) se incrementa el valor del bus de direcciones para apuntar al siguiente dato de la memoria de corriente y se comprueba si se ha llegado a la dirección 255. Si no se ha alcanzado todavía se tienen que transmitir más muestras de corriente y se pasa al estado 7. Si el bus de direcciones marca el valor 255 es porque se han transmitido todas las muestras de corriente. En ese caso se pone el bus de direcciones a 0 y se pasa al estado 10.
- Estado 10: se bloquea el proceso hasta que desde la CPLD1 se dé por concluido el ciclo de medida poniendo la línea *cmd_sample* a '0'. Por

tanto en este estado únicamente se comprueba el nivel de *cmd_sample*. Si está a '1' se permanece en el estado 10. Si está a '0' se pasa al estado 0.

4. Código de la aplicación de PC

La herramienta de desarrollo elegida para generar la aplicación de PC ha sido el software Visual Basic 6.0. Se trata de un compilador basado en el lenguaje de alto nivel *basic* que permite el desarrollo de aplicaciones con un interfaz gráfico de usuario vistoso (botones, cajas de texto, *sliders*, barras de progreso, etc.).

El objetivo principal de la aplicación es medir la impedancia de una muestra. La aplicación presenta dos opciones de medida: la medida de la impedancia para una sola frecuencia (*Ensayo Manual*) y la medida de la impedancia para un espectro de frecuencias (*Ensayo Automático*).

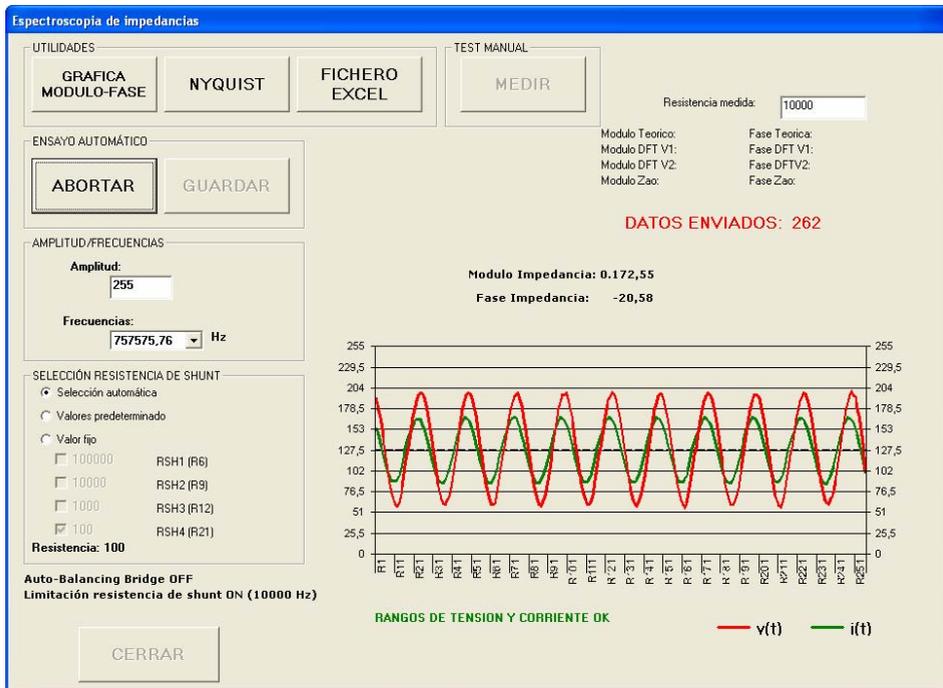


Figura 42. Interfaz gráfico de usuario del formulario de medida.

Además el software incluye una serie de herramientas que permiten la configuración del sistema y de los ensayos, la visualización gráfica de las medidas (en modo *Módulo y Fase* o en modo *Nyquist*) y el almacenamiento de los datos en un fichero de texto (formato compatible con Excel) que permite su posterior procesamiento estadístico.

En la Figura 42 se muestra el interfaz gráfico de usuario del formulario de medida.

4.1. Módulo de Ensayo Manual (frecuencia individual)

El módulo de *Ensayo Manual* realiza la medida de la impedancia de la muestra para una única frecuencia. El usuario selecciona la frecuencia a la que desea realizar la medida así como el valor de la resistencia de *shunt* que debe utilizarse en la medida de corriente.

El proceso incluye las siguientes etapas:

- Preparación de los datos que deben enviarse al equipo electrónico de medida para que éste lleve a cabo la generación de la señal y el muestreo de los valores de tensión y corriente en el electrodo.
- Transmisión de los datos al equipo electrónico de medida a través del puerto RS-232.
- Recepción de los datos enviados por el equipo electrónico de medida.
- Procesamiento de los datos recibidos para obtener el módulo y la fase de la impedancia de la muestra.

4.1.1. Preparación de los datos

Como se vio en el apartado 3.2.2.- *Proceso SIN_GEN*, los datos que debe enviar el PC al equipo electrónico de medida para la generación de la señal son los que aparecen en la Figura 36.

Estos datos incluyen:

- Un byte de cabecera para que el equipo electrónico de medida identifique el inicio de la trama (AAH).
- Los 256 bytes correspondientes a la evolución temporal de la señal. Cada byte se relaciona con el valor digital de la tensión analógica que debe aplicarse al electrodo en un instante determinado.
- Un valor de 17 bits que indica cuál debe ser la cadencia con la que se debe reproducir la señal aplicada al electrodo y con la que se deben muestrear las señales de tensión y corriente. Este valor se divide en 3 bytes: *DIV1* (bits del 7 al 0), *DIV2* (bits del 15 al 8) y *DIV3* (bit 16).
- Un byte que establece cuál debe ser la combinación de resistencias de *shunt* utilizadas para la medida de corriente. Los cuatro bits menos significativos del byte *RELAYS* se corresponden con cada una de las 4 resistencias que se pueden seleccionar. Si el bit está a '1' se seleccionará la resistencia correspondiente (*Capítulo 1. Desarrollo del sistema de medida - 2.5.- Circuito de medida de corriente (puente autobalanceado)* página 68).
- Como se mencionó en el apartado *Capítulo 1. Desarrollo del sistema de medida- 3.2.- Código de la CPLD1 (Generación de señales) 3.2.2.- Proceso SIN_GEN* página 78, para determinadas frecuencias no se utilizan 256 valores para establecer la evolución temporal de la señal en un periodo. En ese caso el sistema electrónico debe conocer cuál es el número de puntos que debe utilizar a la hora de generar la señal y cuál es el número de muestras que debe recoger para completar un periodo. Ese dato viene establecido en *N_PUNT*.

El proceso de preparación de los datos se compone de las siguientes etapas:

Primera etapa. Cálculo del número de puntos óptimo para la frecuencia establecida.

En primer lugar se debe establecer cuál es el número de puntos que permite representar un periodo de la señal. Este dato debe calcularse de forma que la frecuencia real generada sea lo más aproximada posible a la frecuencia teórica deseada. El número de muestras se obtiene a partir de la siguiente Ecuación 25.

$$NMuestras = \frac{T_{SEÑAL}}{T_{MUESTREO}} \quad \text{Ecuación 25}$$

Siendo $T_{SEÑAL}$ el periodo de la señal senoidal y $T_{MUESTREO}$ el tiempo de muestreo. Como se vio en el apartado 3.2.2.- *Proceso SIN_GEN* página 78, el tiempo de muestreo se establece incrementando una variable hasta que alcance el valor límite div_gen . Dentro de las CPLD's los incrementos ocurren con la frecuencia del oscilador principal ($F_{OSC}=25\text{MHz}$). Por tanto el tiempo de muestreo puede expresarse como:

$$T_{MUESTREO} = \frac{div_gen}{F_{OSC}} \quad \text{Ecuación 26}$$

De lo que se puede deducir el valor del número de muestras como:

$$NMuestras = \frac{F_{OSC}}{div_gen \cdot F_{TEO}} \quad \text{Ecuación 27}$$

Siendo $F_{TEO} = \frac{1}{T_{SEÑAL}}$ la frecuencia teórica de la señal senoidal.

Pero el valor de div_gen tiene que ser entero. Es decir, para un determinado valor de $NMuestras$ el valor que se transmitirá a la CPLD1 para que genere la señal senoidal será un valor redondeado (Ecuación 28).

$$div_gen_{ENTERA} = \text{round}\left(\frac{F_{OSC}}{NMuestras \cdot F_{TEO}}\right) \quad \text{Ecuación 28}$$

Por tanto, para un determinado valor de $NMuestras$ el valor de la frecuencia que realmente generará la CPLD1 será:

$$F_{REAL} = \frac{F_{OSC}}{div_gen_{ENTERA} \cdot NMuestras} = \frac{F_{OSC}}{\text{round}\left(\frac{F_{OSC}}{NMuestras \cdot F_{TEO}}\right) \cdot NMuestras} \quad \text{Ecuación 29}$$

Dado que el redondeo se realiza siempre al alza, ajustándose al entero superior, para determinados valores de $NMuestras$ la frecuencia real estará más próxima

al valor teórico y en otras ocasiones más alejada. Para corregir esta desviación el número de muestras a considerar será $N_{Muestras}-1$.

Para establecer cuál es el valor de $N_{Muestras}$ óptimo se aplica el algoritmo mostrado en la Figura 43.

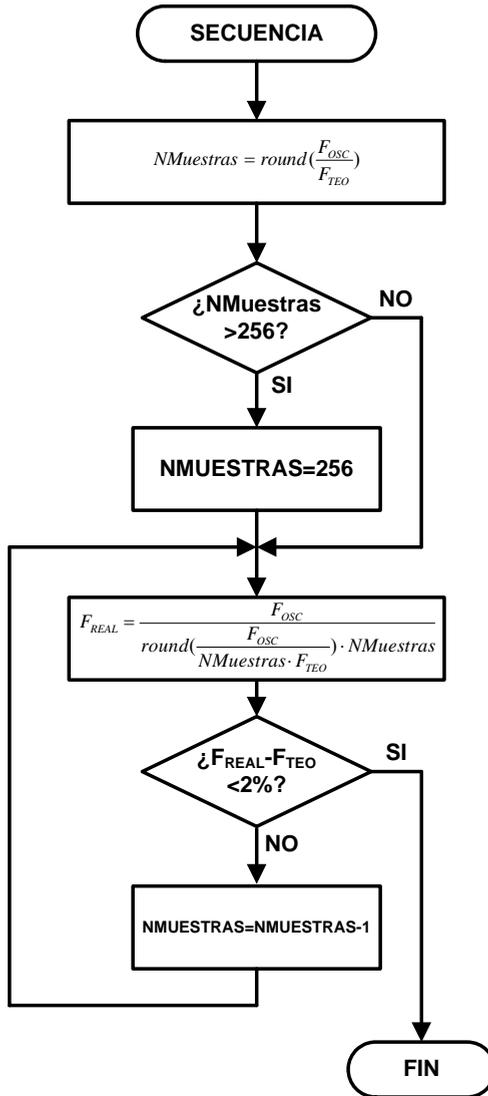


Figura 43. Algoritmo de generación de $N_{Muestras}$.

En primer lugar, mediante la relación entre la frecuencia del oscilador principal de las CPLD's y el valor de la frecuencia teórica de la señal senoidal, se establece el valor inicial de $N_{Muestras}$, limitándolo a un máximo de 256.

A partir de este valor se calcula la frecuencia real y se compara con el valor teórico deseable. Si la diferencia es menor del 2% se da por válido el valor de $N_{Muestras}$ y concluye el proceso. Si es mayor del 2%, se decrementa el valor de $N_{Muestras}$ y se repite el proceso anterior (cálculo de la frecuencia real y comparación con el valor teórico) hasta que la desigualdad entre ambos es inferior al 2%.

Segunda etapa. Cálculo de los valores correspondientes a la evolución temporal.

Se implementa mediante un bucle *for* desde 0 hasta $N_{Muestras}$, que calcula el valor de 8 bits, equivalentes a cada uno de los puntos de la senoide para un periodo, aplicando la Ecuación 30.

$$dato_sen[i] = 128 + Amplitud \cdot \sin\left(\frac{2 \cdot \pi \cdot i}{N_{Muestras}}\right) \quad \text{Ecuación 30}$$

Siendo i el índice de 0 a $N_{Muestras}-1$ y $Amplitud$ el valor digital de la amplitud de la señal senoidal establecida por el usuario. Su valor puede oscilar entre 10 y 127.

Tercera etapa. Cálculo del valor de 17 bits que fija la frecuencia de muestreo.

Es el valor resultante de la Ecuación 31.

$$div_gen = round\left(\frac{F_{OSC}}{N_{Muestras} \cdot F_{REAL}}\right) \quad \text{Ecuación 31}$$

Dado que se trata de un valor de 17 bits y el envío se realiza a través del puerto serie RS-232 que trabaja en formato UART de 8 bits, div_gen debe ser separado

en 3 bytes: *DIV1* (bits del 7 al 0), *DIV2* (bits del 15 al 8) y *DIV3* (bit 16). Para lograrlo se aplica la división entera y el operador *mod* (resto de la división).

Cuarta etapa. Obtención del byte de configuración de las resistencias de shunt del circuito de medida de corriente.

Como se vio en el apartado *Capítulo 1. Desarrollo del sistema de medida - 2.5.- Circuito de medida de corriente (puente autobalanceado)* página 68, el circuito de medida de corriente incorpora 4 resistencias de *shunt* que pueden ser seleccionadas mediante relés activados desde la CPLD1. La configuración de estos relés se establece desde el software del PC. En el formulario de medida el usuario dispone de 4 *CheckBox* (uno para cada una de las 4 resistencias de *shunt*). Se pueden seleccionar varias resistencias simultáneamente, lo que implicará que el valor resultante será el paralelo de las seleccionadas. El software lee el estado de los *CheckBox* y establece el valor de la variable *RELAYS* de la siguiente forma: si el *CheckBox* de la primera resistencia de *shunt* está activado entonces pone a '1' el bit 0 de *RELAYS*, si el *CheckBox* de la segunda resistencia de *shunt* está activado entonces pone a '1' el bit 1 de *RELAYS*, y así sucesivamente (Figura 44).

bit 7	bit 6	bit 5	bit 4	bit 3	bit 2	bit 1	bit 0
-	-	-	-	ACTIVACIÓN RESISTENCIA DE SHUNT 4	ACTIVACIÓN RESISTENCIA DE SHUNT 3	ACTIVACIÓN RESISTENCIA DE SHUNT 2	ACTIVACIÓN RESISTENCIA DE SHUNT 1

RELAYS

Figura 44. Configuración de los bits de la variable *RELAYS* donde se establece la selección de las resistencias de *shunt*.

4.1.2. Transmisión de los datos

La comunicación entre el PC y el sistema electrónico se realiza a través del puerto RS-232. Visual Basic 6.0 dispone de una herramienta que facilita la comunicación a través de dicho puerto. Se trata del objeto *MSCOMM*. Sus principales propiedades son:

- *CommPort*: establece el nº de puerto (COM1, COM2, etc.).
- *PortOpen*: abre el puerto para que se puedan iniciar las tareas de transmisión/recepción.
- *Settings*: establece la configuración del puerto: (velocidad de comunicación, número de bits de datos, número de bits de parada y configuración del bit de paridad).
- *Input*: permite la lectura del búfer de recepción. Se utiliza para leer los datos recibidos.
- *Output*: permite escribir datos en el búfer de transmisión. Se utiliza para enviar datos.

El objeto *MSCOMM* tiene un único evento, que se dispara cada vez que sucede algo en el puerto (recepción de datos, fin de transmisión de datos, errores o cambios en las líneas de control de flujo de puerto RS-232).

Dado que el objeto *MSCOMM* dispone de un buffer de transmisión que puede configurarse con un tamaño de hasta 32.767 bytes y que el tamaño de la trama que el PC envía al equipo electrónico de medida es de 262 bytes, no es necesaria la utilización del evento *OnComm* en transmisión. Configurando el tamaño del búfer de transmisión a 512 bytes los datos pueden ser enviados sin necesidad de realizar ninguna comprobación. El objeto *MSCOMM* almacenará los datos a transmitir en el búfer de transmisión y los irá enviando uno a uno a través de puerto RS-232.

El objeto *MSCOMM* sólo admite datos de tipo carácter en el modo de transmisión, por tanto antes de enviar cualquier dato éste debe ser transformado a carácter; para ello se utiliza la función *Chr()* de Visual Basic. Preparados de este modo, basta con escribirlos en el buffer de transmisión mediante la propiedad *Output* del objeto *MSCOMM*.

4.1.3. Recepción de los datos

Una vez transmitidos los datos, la aplicación de PC queda a la espera de que el equipo electrónico de medida envíe los valores correspondientes al test realizado (512 bytes correspondientes a la evolución temporal de las señales de tensión aplicada al electrodo y de corriente que circula por el mismo). El modo de espera de los valores puede configurarse:

- Mediante un bucle “While” que espere a que los 512 bytes transmitidos por el equipo hayan sido recibidos. Este método bloquearía el funcionamiento del PC hasta la finalización de la recepción de los datos.
- Mediante un evento de un objeto *Timer* que periódicamente compruebe la propiedad *InBufferCount* (que indica el número de bytes presentes en el búfer de recepción).
- Mediante el evento *OnComm* programado en recepción de forma que se dispare cada vez que se recibe un dato. Dentro de dicho evento se comprobará si el número de bytes en el búfer de recepción ha llegado a 512 y si es así se procesarán los datos.

Finalmente se optó por esta última opción. Se configuró el objeto *MSCOMM* para que el evento *OnComm* se generara cada vez que se recibiera un dato (propiedad *RThreshold* a 1). Dentro del evento *OnComm* se comprueba el valor de la propiedad *InBufferCount* que indica el número de bytes presentes en el búfer de recepción. Cuando dicho valor es de 512 se leen los datos y se almacena en dos matrices: *Tension()* y *Corriente()*. El objeto *MSCOMM* permite dos modalidades de lectura de los datos recibidos: modo binario y modo texto. Cuando se reciben datos de un sistema electrónico digital la mejor opción es el modo binario. Para leer datos del búfer de recepción en modo binario primero deben leerse con una variable de tipo *Variant*. Los datos quedan almacenados en dicha variable como una amalgama de bytes sin un tipo definido. A continuación se asigna esta variable a una de tipo array de bytes. En dicha variable quedan almacenados los 512 bytes recibidos que posteriormente son distribuidos en las variables *Tension()* y *Corriente()*.

4.1.4. Procesado de los datos

El procesado de los datos recibidos se compone de diversas etapas (Figura 45).

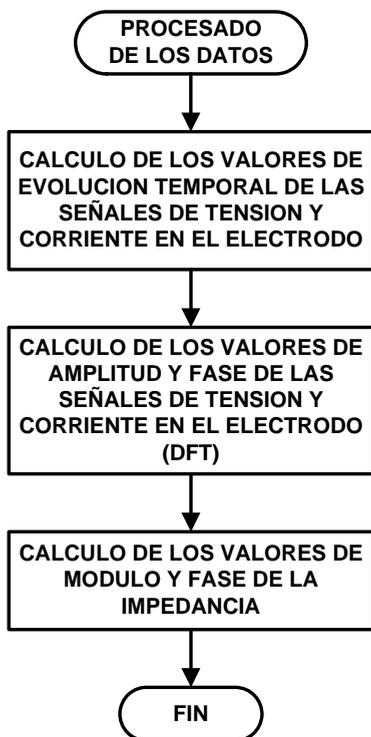


Figura 45. Algoritmo de procesado de los datos recibidos.

Primera etapa. Cálculo de los valores correspondientes a la evolución temporal de las señales de tensión y corriente.

Como se observa en la Figura 46 los datos recibidos del equipo corresponden a la evolución temporal de la señal aplicada al electrodo *Tension()* y de la de salida del operacional del circuito del puente autobalanceado *Corriente()*. Debido al efecto de tierra virtual del operacional, *Tension()* corresponde a la tensión en bornes del electrodo. En cuanto a *Corriente()* su relación con la corriente que circula por el electrodo es:

$$Corriente \text{ por el electrodo} = -\frac{Corriente()}{R_{SHUNT}} \quad \text{Ecuación 32}$$

El signo menos se debe al efecto inversor del puente autobalanceado.

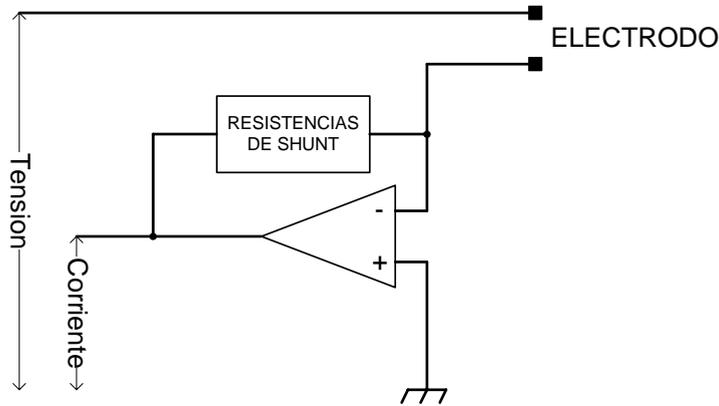


Figura 46. Detalle del puente autobalanceado.

Puesto que los convertidores A/D son de 8 bits, los valores recibidos del equipo electrónico de medida son valores de 0 a 255 (Tabla 2).

Valor de tensión	Valor digital (8 bits)
-0,5V	00000000
0V	10000000
+0,5V	11111111

Tabla 2. Conversión de valores de tensión a valores digitales de 8 bits.

Por lo tanto para cambiar de signo los valores del array *Corriente()* basta con hacer un bucle que recorra todo el array y que realice la siguiente operación sobre cada uno de los elementos:

$$Corriente(i)=255-Corriente(i)$$

Por último, estos valores se dividen por la resistencia de *shunt* seleccionada para obtener los valores correspondientes a la evolución temporal de la corriente que circula por el electrodo.

Las señales de tensión y corriente resultantes se representan en un gráfico, para que el usuario pueda detectar alguna anomalía en la medida (saturación de las señales, exceso de ruido, distorsión de las señales, niveles de amplitud bajos, etc.). El objeto *MSChart* de Visual Basic 6.0 que permite la representación gráfica de una o varias series de valores numéricos (Figura 42).

Segunda etapa. Cálculo de los valores amplitud y fase de las señales de tensión y corriente.

Aplicando un algoritmo DFT (Discret Fourier Transform) [122] a los valores de los arrays *Tension()* y *Corriente()* se obtienen los valores de amplitud y fase. El algoritmo DFT extrae la parte real y la parte imaginaria de una de las componentes armónicas de una señal discreta (conjunto de valores digitales que representan la evolución temporal de una señal analógica). En este caso la componente principal de las señales de tensión y corriente. Una sencilla transformación convierte la parte real e imaginaria en módulo y fase. La aplicación del algoritmo DFT además filtra el ruido de las señales, dado que sólo analiza la componente principal, eliminando el efecto del resto de armónicos.

El algoritmo DFT para una señal discreta $x(n)$ viene dado por la Ecuación 33.

$$X(k) = \sum_{n=0}^{N-1} x(n) \cdot e^{-j\frac{2\pi}{N}kn} \quad \text{Ecuación 33}$$

Siendo:

- $X(k)$ la componente frecuencial k de la señal
- $x(n)$ el conjunto de puntos que describen la evolución temporal de la señal (conjunto de muestras)
- N el número de muestras

Dado que únicamente interesa la componente fundamental (la primera componente frecuencial, $k=1$) y que las muestras de las señales de tensión y corriente son valores reales (parte imaginaria igual a 0), la expresión se simplifica:

$$X(1) = \sum_{n=0}^{N-1} \left[x(n) \cdot \cos\left(\frac{2\pi n}{N}\right) + j \cdot x(n) \cdot \sin\left(\frac{2\pi n}{N}\right) \right] \quad \text{Ecuación 34}$$

De manera que la parte real y la parte imaginaria de la componente fundamental de la señal muestreada queda:

$$X_{real}(1) = \sum_{n=0}^{N-1} x(n) \cdot \cos\left(\frac{2\pi n}{N}\right) \quad \text{Ecuación 35}$$

$$X_{imag}(1) = \sum_{n=0}^{N-1} x(n) \cdot \sin\left(\frac{2\pi n}{N}\right) \quad \text{Ecuación 36}$$

Donde:

- $X_{real}(1)$: es la parte real de la componente fundamental
- $X_{imag}(1)$: es la parte imaginaria de la componente fundamental

La componente fundamental $X(1)$ puede expresarse de la siguiente forma:

$$X(1) = X_{real}(1) + jX_{imag}(1) = X_{mag}(1) \angle X_{\phi}(1) \quad \text{Ecuación 37}$$

Donde:

- $X_{mag}(1)$: es la magnitud de la componente fundamental. Esta magnitud no debe confundirse con la amplitud de la componente fundamental: $A(1)$.
- $X_{\phi}(1)$: es la fase de la componente fundamental.

Estos valores pueden obtenerse a partir de la parte real e imaginaria aplicando:

$$X_{mag}(1) = \sqrt{X_{real}^2(1) + X_{imag}^2(1)} \quad \text{Ecuación 38}$$

$$X_{\phi}(1) = \arctg \frac{X_{imag}(1)}{X_{real}(1)} \quad \text{Ecuación 39}$$

La amplitud de la componente fundamental se deduce de $X_{mag}(1)$ de la siguiente forma (si la señal discreta $x(n)$ es real):

$$A(1) = \frac{X_{mag}(1)}{N/2} \quad \text{Ecuación 40}$$

A nivel de código el algoritmo se implementa de la siguiente forma (para la tensión, por ejemplo):

```
Fk(1).Real = 0
Fk(1).Imag = 0
For n = 0 To NMuestras - 1
    Temp_Real = Tension(n) * Cos((2 * Pi * k * n) / NMuestras)
    Temp_Imag = Tension(n) * (-Sin((2 * Pi * k * n) / NMuestras))
    Fk(1).Real = Fk(1).Real + Temp_Real
    Fk(1).Imag = Fk(1).Imag + Temp_Imag
Next n
VampL_V = Sqr(Fk(1).Real * Fk(1).Real + Fk(1).Imag * Fk(1).Imag) / (NMuestras / 2)
Fase_DFT_V = Atn(Fk(1).Imag, Fk(1).Real)
```

Tercera etapa. Cálculo de los valores de módulo y fase de la impedancia.

Obtenidas las amplitudes y las fases de las señales de tensión y corriente, el cálculo del módulo y la fase de la impedancia del electrodo es directo:

$$\text{Módulo de la impedancia} = \frac{\text{Amplitud Tensión}}{\text{Amplitud Corriente}}$$

$$\text{Fase de la impedancia} = \text{Fase Tensión} - \text{Fase Corriente}$$

Los valores obtenidos en cada ensayo se muestran en pantalla.

4.2. Módulo de Ensayo Automático (espectro de frecuencias)

El modo de ensayo automático es una repetición del ensayo manual para todo el espectro de frecuencias configurado por el usuario.

El espectro de frecuencias se establece en la opción de configuración. El usuario escoge las frecuencias a las que quiere medir la impedancia. La selección queda almacenada en el fichero de configuración de la aplicación para ser recorrida durante el ensayo automático.

Los datos de módulo y fase obtenidos para cada una de las frecuencias se almacenan en un fichero de texto para su posterior tratamiento.

A diferencia del modo manual, en el modo automático se puede configurar la aplicación para que establezca automáticamente la resistencia de *shunt* óptima en cada medida. La evolución de la impedancia a lo largo del espectro puede hacer que la misma resistencia de *shunt* no sea válida para todas las medidas. La aplicación, después de recibir los datos del equipo electrónico de medida, calcula la amplitud de la corriente y la compara con un valor umbral. Si la amplitud de la corriente está por debajo de dicho valor (señal muy débil) pasa a una resistencia de *shunt* superior. Si se ha alcanzado el valor máximo de resistencia de *shunt* y la amplitud de la corriente sigue siendo pequeña, se indica en el fichero donde se almacenan los datos que la medida de corriente se ha realizado fuera de rango (CFR).

La Figura 47 muestra el flujograma simplificado del proceso de ensayo automático.

El proceso se inicia con la primera frecuencia (se empieza siempre con la frecuencia más alta del espectro) y con la resistencia de *shunt* más baja. Se preparan los datos del primer ensayo tal y como se describe en el apartado del ensayo manual. De igual modo se transmiten los datos y se recibe la respuesta del equipo electrónico de medida. Se calculan los valores correspondientes a la evolución temporal de la tensión y la corriente en el electrodo. Aplicando un algoritmo DFT se determina la amplitud y la fase de la tensión y de la corriente y se obtiene el módulo y la fase de la impedancia para la primera frecuencia. Hasta aquí el procedimiento seguido es idéntico al descrito en el apartado de ensayo manual. Posteriormente se comprueba si la amplitud de la señal de corriente es superior a un determinado umbral (el umbral se establece como una décima parte de la amplitud máxima):

- Si la amplitud de la corriente medida es superior al valor umbral, se almacenan en el fichero de datos los valores del módulo y la fase calculados para la frecuencia correspondiente. Se comprueba si se ha llegado a la última frecuencia. Si no es así, se repite el proceso con la siguiente frecuencia del espectro. Si se ha alcanzado la última frecuencia, se cierra el fichero de datos y concluye el proceso de ensayo automático.

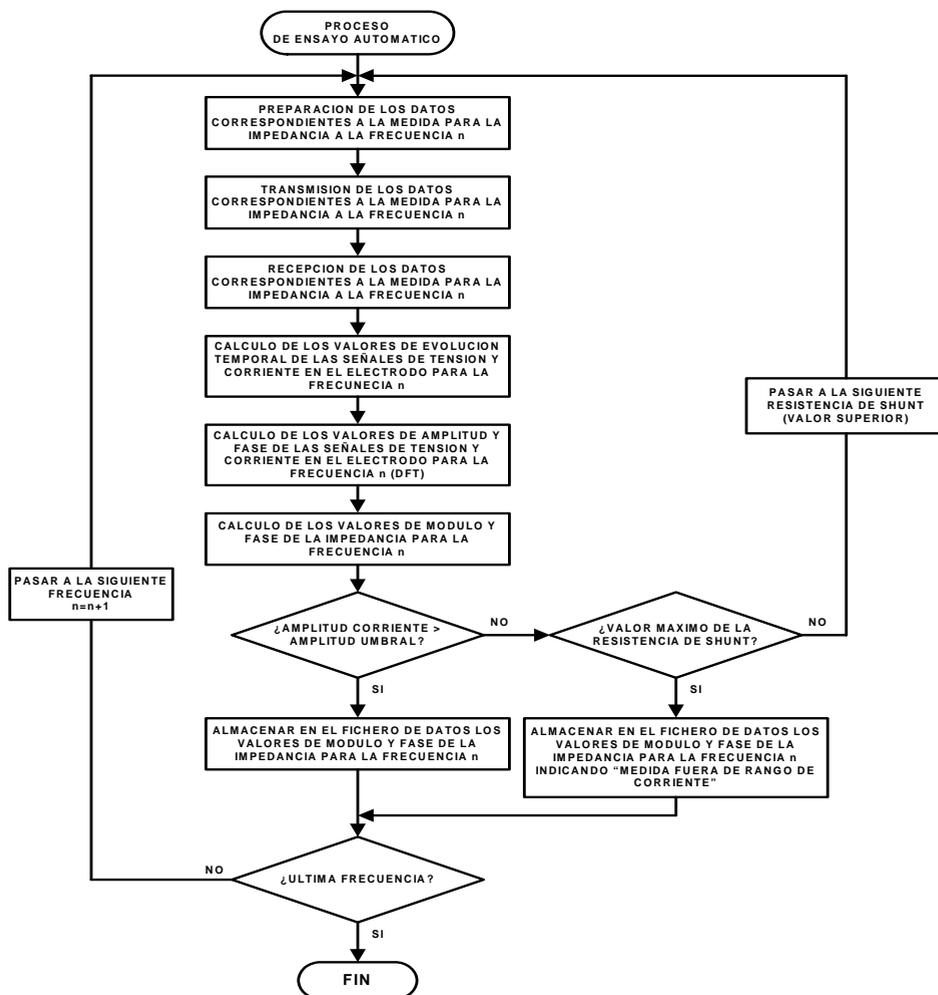


Figura 47. Proceso de ensayo automático.

- Si la amplitud de la corriente medida no es superior al valor umbral se comprueba si se ha alcanzado el valor máximo de resistencia de *shunt*. Si no es así, se aumenta el valor de la resistencia de *shunt* y se repite el proceso para la misma frecuencia. Si se ha alcanzado el valor máximo de resistencia de *shunt* se almacenan en el fichero los datos para la frecuencia correspondiente, indicando que la medida ha sido realizada fuera del rango medida de corriente. Se comprueba si se ha llegado a la última frecuencia. Si no es así, se repite el proceso con la siguiente

frecuencia del espectro. Si se ha alcanzado la última frecuencia, se cierra el fichero de datos y concluye el proceso de ensayo automático.

4.3. Módulo de utilidades

La aplicación incorpora una serie de utilidades que facilitan el manejo del sistema y permiten la visualización gráfica de los resultados.

4.3.1. Configuración

En el modo de configuración la aplicación permite al usuario establecer ciertos parámetros de funcionamiento del sistema (Figura 48):

- Puerto serie RS-232 de comunicación con el equipo electrónico de medida. El usuario puede elegir el puerto RS-232 del PC al que se conectará el equipo de medida. La aplicación muestra una lista desplegable con todos los puertos RS-232 disponibles (COM1, COM2, COM3, etc.).
- Valores de las resistencias de *shunt*. Dado que las resistencias de *shunt* que se colocan en el equipo electrónico de medida pueden variar según el ensayo a realizar, la aplicación permite modificar sus valores en el software del sistema. Los valores de las resistencias de *shunt* son utilizados en la aplicación para calcular la corriente a partir de la tensión de salida del circuito de puente autobalanceado.
- Espectro de frecuencias para el ensayo automático. El usuario establece el barrido de frecuencias a realizar en el ensayo automático. La aplicación solicita las frecuencias inferior y superior y el número de frecuencias deseado dentro del rango establecido. Además se puede elegir entre una distribución lineal o logarítmica.

Número	Frec. Teórica	Frec. Real	R. shunt
1	1,00	1,00	RSH1
2	1,33	1,33	RSH1
3	1,76	1,76	RSH1
4	2,33	2,33	RSH1
5	3,09	3,09	RSH1
6	4,09	4,09	RSH1
7	5,43	5,43	RSH1
8	7,20	7,20	RSH1
9	9,54	9,54	RSH1
10	12,65	12,65	RSH1
11	16,77	16,77	RSH1
12	22,23	22,23	RSH1
13	29,47	29,47	RSH1
14	39,07	39,06	RSH1
15	51,79	51,81	RSH1
16	68,66	68,68	RSH2
17	91,03	91,01	RSH2
18	120,68	120,71	RSH2

Figura 48. Formulario de configuración.

4.3.2. Representación grafica del diagrama de Bode (módulo y fase)

La aplicación dispone de un formulario para visualizar el diagrama de Bode de la impedancia (módulo de la impedancia frente a frecuencia / fase de la impedancia frente a frecuencia). En este formulario aparece un objeto *MSChart* en el que se representa, para cada valor de frecuencia dentro del espectro configurado, el valor correspondiente del módulo o la fase.

Es posible observar varios diagramas de Bode simultáneamente (diagramas de Bode correspondientes a ensayos automáticos almacenados en disco e incluso el diagrama de Bode correspondiente al ensayo automático en curso). Unos botones de opción permiten elegir si desea visualizar módulo o fase, y otros establecer el eje de las abscisas (frecuencias) en escala lineal o logarítmica (Figura 49 y Figura 50).

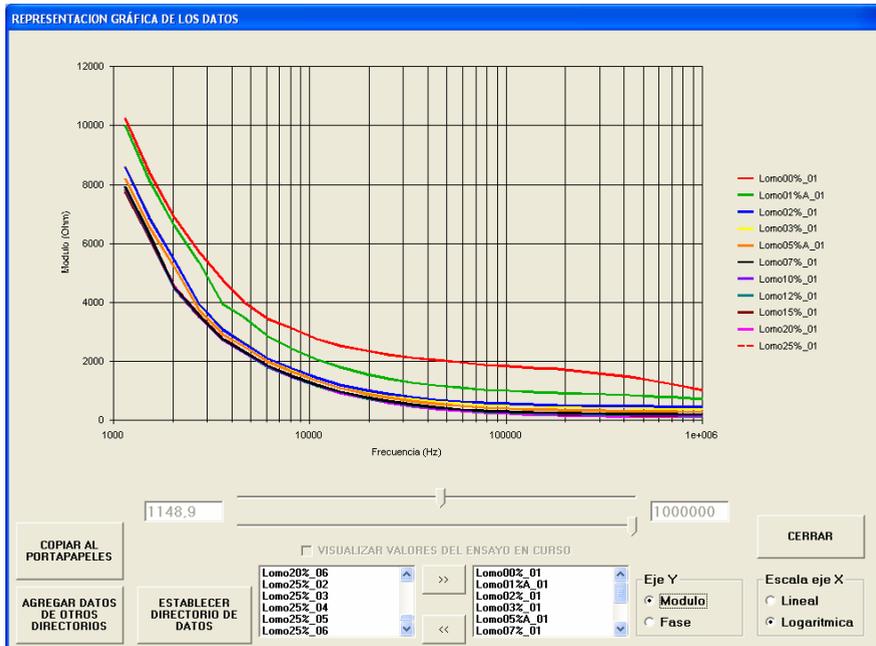


Figura 49. Formulario de representación gráfica del diagrama de Bode (módulo).

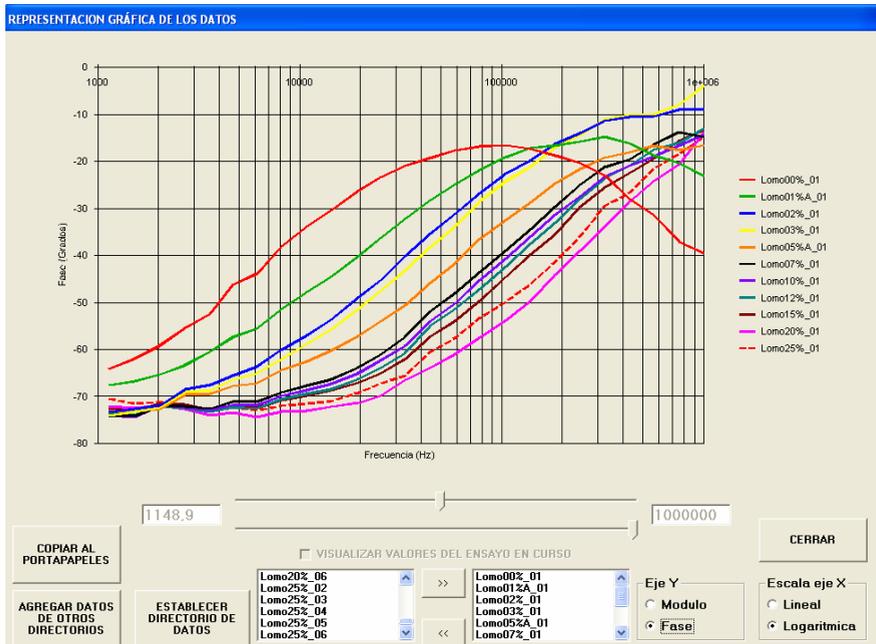


Figura 50. Formulario de representación gráfica del diagrama de Bode (fase).

4.3.3. Representación gráfica del diagrama de Nyquist

La aplicación también dispone de otro formulario para visualizar el diagrama de Nyquist de la impedancia (parte imaginaria frente a parte real). En este formulario aparece un objeto *MSChart* en el que se representa, para cada valor de frecuencia dentro del espectro configurado, el valor correspondiente a la parte imaginaria (con el signo cambiado) frente a la parte real.

Al igual que ocurre con los diagramas de Bode, es posible visualizar varios diagramas de Nyquist simultáneamente (diagramas de Nyquist correspondientes a ensayos automáticos almacenados en disco e incluso el diagrama de Nyquist correspondiente al ensayo automático en curso). Unos botones de opción permiten establecer el eje de las abscisas (parte real) en escala lineal o logarítmica (Figura 51).

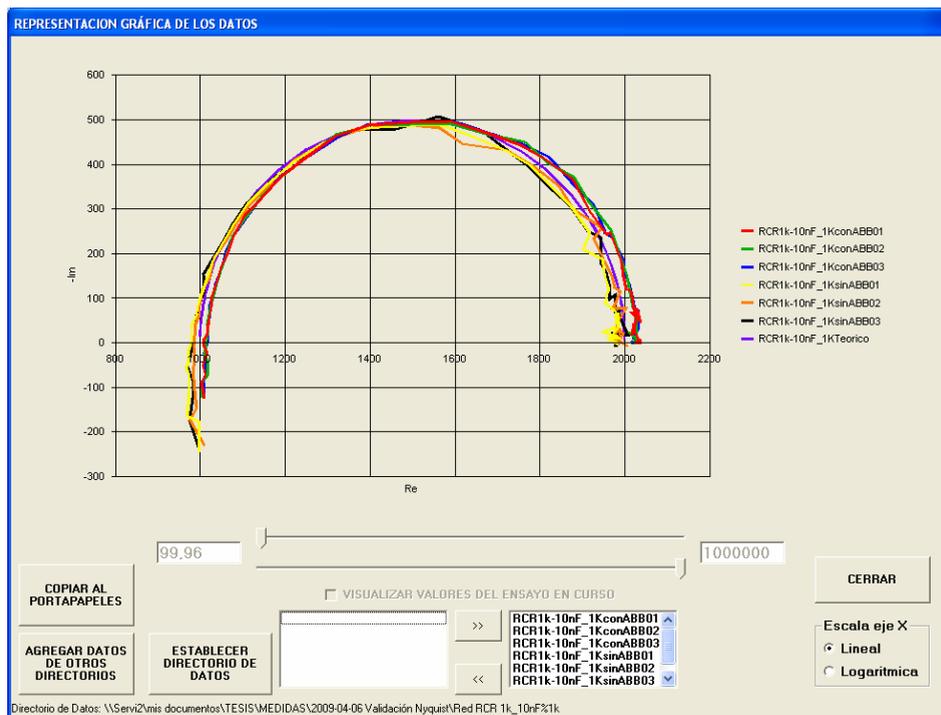


Figura 51. Formulario de representación gráfica del diagrama de Nyquist.

5. Electrodo

La elección del electrodo es uno de los puntos más críticos de un sistema de medida. Es la interfase entre el sistema electrónico y el sistema físico. El elemento que entra en contacto con las muestras, aplica y recoge las magnitudes físicas de tensión y corriente.

El método de medida debe captar el fenómeno que se desea analizar. Para ello hay que adecuar el tamaño del electrodo. Se han probado electrodos con diferentes arquitecturas, que se han denominado:

- *Electrodo de aguja*
- *Electrodo doble*
- *Electrodo de Punta de flecha*

Tanto el *electrodo doble* como el *electrodo de punta de flecha* han sido diseñados en el laboratorio de Microelectrónica Híbrida del Departamento de Ingeniería Electrónica del Instituto de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico. El *electrodo de aguja* es un electrodo comercial utilizado en las técnicas electromiográficas (EMG).

Los tres electrodos tienen reducidas dimensiones. Por ello la invasión de las muestras es mínima y las medidas realizadas con ellos poseen un carácter no destructivo.

5.1. *Electrodo de aguja*

Es una aguja concéntrica, de pequeñas dimensiones respecto a la de la muestra, con objeto de llevar a cabo medidas puntuales y no destructivas. La parte externa de la aguja, de acero inoxidable, actúa como electrodo exterior o de referencia y la parte interna, del mismo material, actúa como electrodo interno o de trabajo. Entre los dos electrodos hay un material dieléctrico, una resina epoxi.

La aguja utilizada, *TECA Disposable Concentric Needle Electrodes X53159** tiene un diámetro exterior de a 0,64mm, una longitud de 75mm y una área efectiva de 0,07 mm². Su estructura se muestra en la Figura 52.

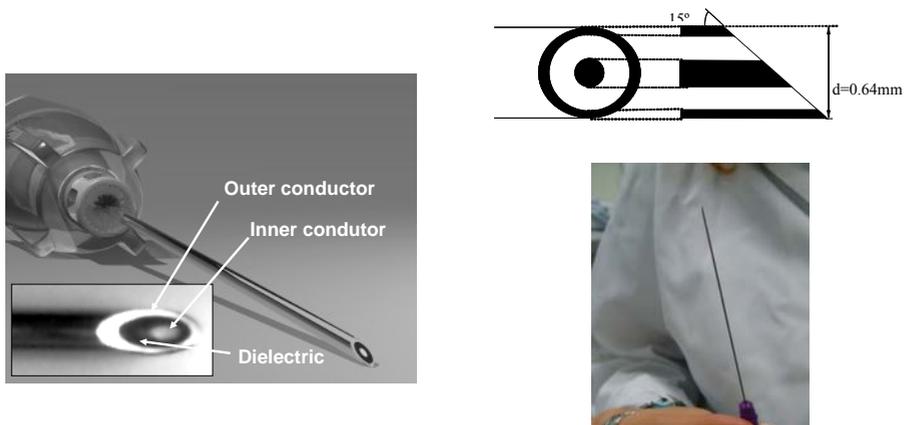


Figura 52. Electrodo de aguja.

5.1.1. Representación de la distribución del campo eléctrico

La gran ventaja de este tipo de electrodos con respecto a los electrodos plano-paralelos, por su geometría cilíndrica, es la facilidad de inserción en el seno de una muestra. Sin embargo, su caracterización no es sencilla, por la distribución tan heterogénea de su campo eléctrico. En la Figura 53 se comparan las distribuciones del campo eléctrico de un electrodo plano-paralelo (a) y un electrodo concéntrico (b).

La distribución no homogénea del campo eléctrico no permite un cálculo teórico sencillo de la constante de celda. Para su determinación hay que recurrir a software de modelización de sistemas físicos basados en técnicas de análisis y resolución por elementos finitos, cuyo estudio no es objeto de esta tesis. Para esta simulación se utilizó la herramienta Comsol Multiphysics de Addlink.

* http://www.viasyshc.com/prod_serv/downloads/VIASYS_healthcare_catalogue.pdf

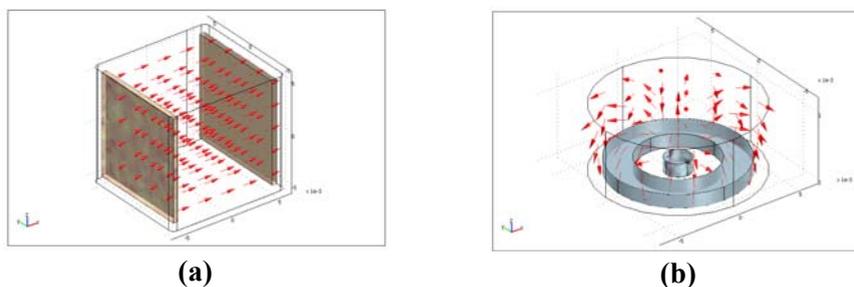


Figura 53. Distribución del campo eléctrico en un electrodo plano-paralelo y en uno concéntrico.

5.2. Electrodo doble

Los alimentos presentan texturas variables, lo que puede suponer un problema en medidas puntuales, como las realizadas con el *electrodo de aguja*, puesto que dependiendo del punto de inserción y del grado de porosidad o heterogeneidad de la muestra, pueden obtenerse resultados muy dispares que dificulten su análisis posterior y desvirtúen el ensayo. Con objeto de salvar este inconveniente y manteniendo el carácter no destructivo de la medida, se diseñó un electrodo capaz de medir características físicas abarcando una franja de muestra más amplia, pudiendo captar la impedancia correspondiente a una porción de alimento.

Se dispusieron de forma paralela dos agujas de acero inoxidable alojadas en un bastidor. Una de ellas constituyó el electrodo de trabajo y la otra el de referencia (Figura 54). El bastidor se fabricó con un kit de resina epoxi mezcla de dos componentes (endurecedor y resina, RS 199-1468) que se insertado en un prisma rectangular. Las agujas se alojaron en el seno de la epoxi y se dejó endurecer durante 48 horas.

Las dimensiones del *electrodo doble* son las siguientes:

- Diámetro de cada electrodo: 1mm.
- Longitud efectiva de cada electrodo: 15mm.
- Distancia entre electrodos: 10mm.

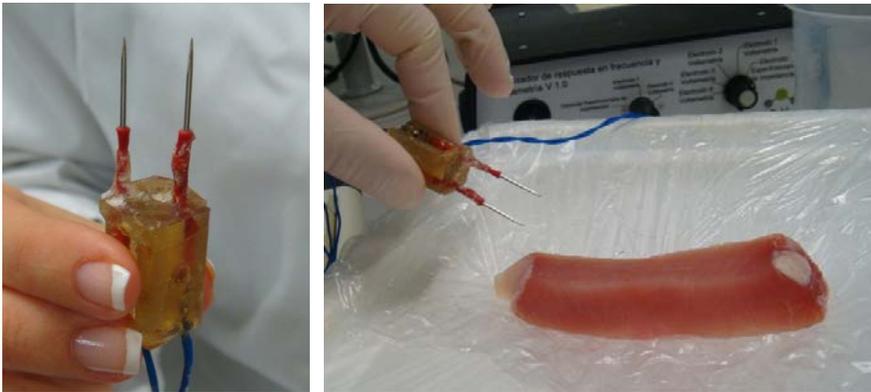


Figura 54. Electrodo doble.

Posteriormente se desarrolló un segundo electrodo doble, de características similares, que incorporaba la posibilidad de variar la distancia entre las agujas (Figura 55).

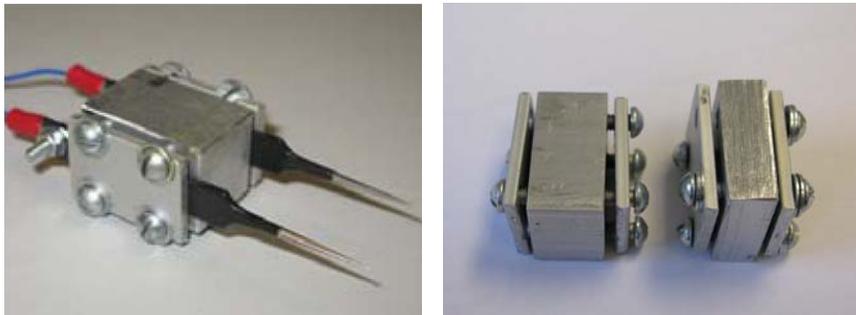


Figura 55. Versión mejorada del electrodo doble con diferentes tamaños de bastidor.

5.3. Electrodo punta de flecha

Para diseñar este electrodo se aplicó la tecnología híbrida de circuitos de *capa gruesa (Thick-Film technology)*, consistente en dispensar, mediante técnicas serigráficas de alta resolución, pastas o tintas de diferentes características eléctricas (conductoras, resistivas y dieléctricas) sobre substratos aislantes, para conformar un circuito electrónico [111][123].

El proceso (Figura 56) *Thick-Film* se compone de varias etapas, que pueden variar en función del tipo de circuito a implementar.

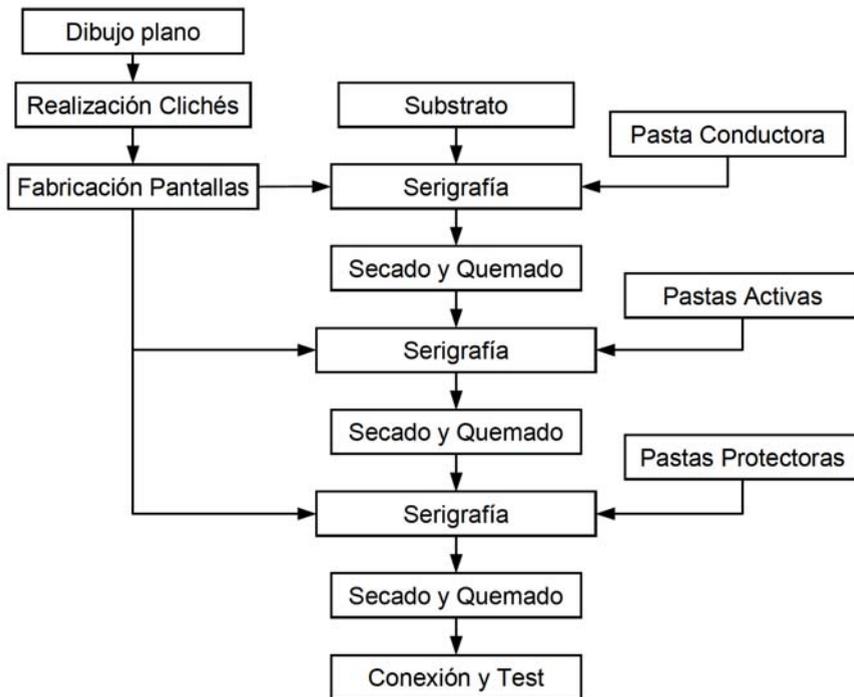


Figura 56. Proceso tecnológico de electrodo en capa gruesa.

Todo el proceso de tecnología de capa gruesa se basa en las técnicas serigráficas (Figura 57 y Figura 58). En una pantalla se adhiere una tela (de distintos número de *Mesh*^{*}) sobre la cual se ha fijado previamente un film fotosensible. Mediante métodos de revelado fotográfico y empleando un fotolito del diseño del electrodo (Figura 59), se fija el negativo a la pantalla delimitando las zonas por donde pasará la pasta a través de la tela.

* *Mesh*: Número de hilos por pulgada

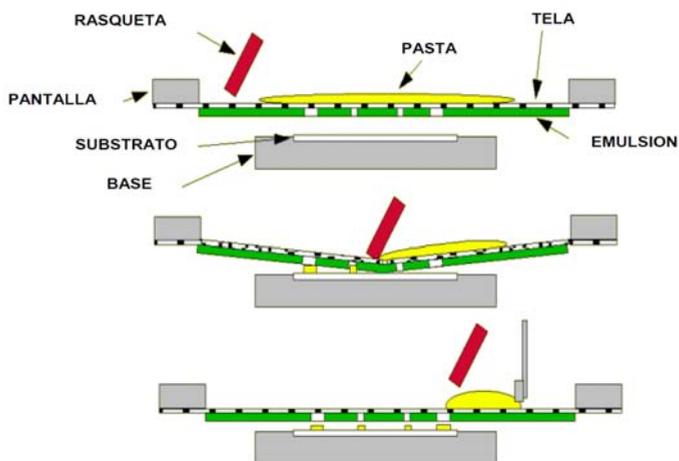


Figura 57. Técnicas serigráficas.

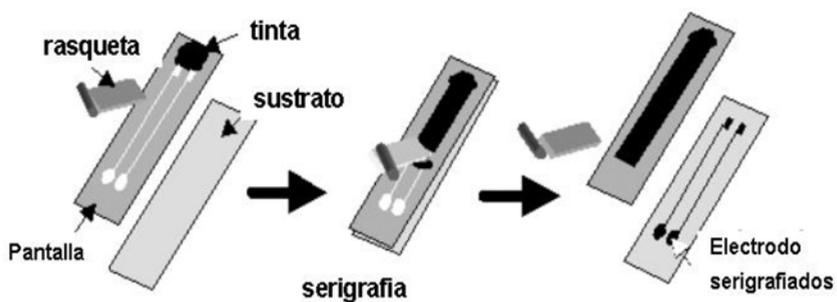


Figura 58. Obtención de un electrodo mediante técnicas serigráficas.

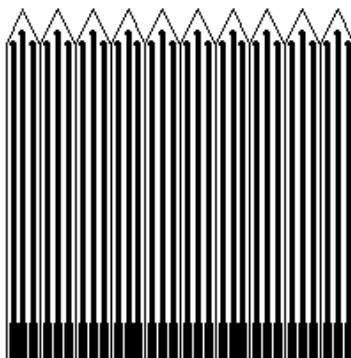


Figura 59. Fotolito del *Electrodo Punta de Flecha*.

Para la fabricación del electrodo se eligió como sustrato alúmina al 96% de 0.65mm de espesor y disipación $0.5\text{W}/\text{cm}^2$.

Mediante técnicas serigráficas se depositó el material del electrodo al sustrato. Para ello se utilizó una capa conductora de baja impedancia Heraeus SR 20-175-015 HVS* (Figura 60 (a)), compuesta por plata/paladio en una proporción 26:1 con una resistencia de $15\text{m}\Omega/\square^\dagger$. A continuación la pieza fue introducida en un horno de quemado *VULCAN 3-150* y sometida a un ciclo térmico de secado de 150°C durante 10 minutos y quemado en ciclos de 860°C a 8 minutos durante 60 minutos.



Figura 60. (a) Pasta conductora SR 20-175-015HVS. (b) Pasta dieléctrica SD1000HVS.

Posteriormente se recubrió toda la superficie con una pasta dieléctrica Heraeus SD1000 HVS‡ (Figura 60 (b)), dejando al aire la superficie activa de los electrodos y los terminales de conexión. Finalmente fue sometido al mismo ciclo de secado descrito en el párrafo anterior. El resultado final observa en la Figura 61.

* http://heraeus-thickfilm.com/media/webmedia_local/media/datasheets/pastesonmetal/SR_20_XX_Series_en.pdf.

† \square : superficie cuadrada de lado $12\mu\text{m}$.

‡ http://heraeus-thickfilm.com/media/webmedia_local/media/datasheets/pastesonmetal/SD_1000_en.pdf.

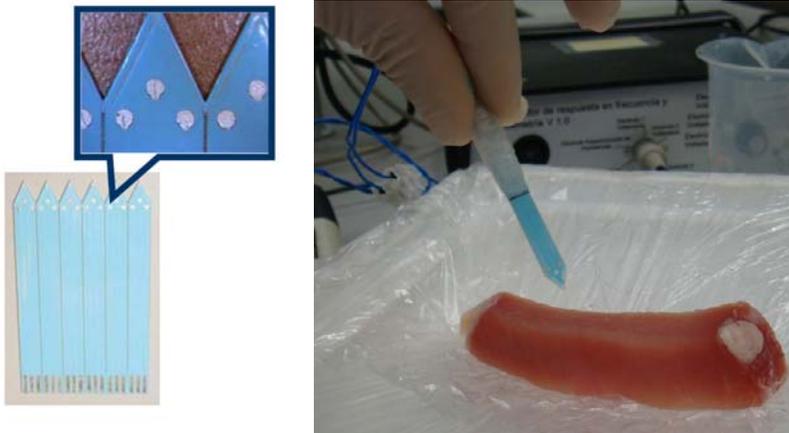


Figura 61. Electrodo *punta de flecha*.

6. Calibración del equipo electrónico de medida

Los ensayos de espectroscopía de impedancia sobre redes RC sirvieron para realizar la calibración y puesta a punto del sistema de medida. Conociendo a priori las respuestas de las redes RC a diferentes frecuencias se pudieron ajustar los diferentes parámetros internos del sistema y depurar la programación del software, tanto de las CPLD's como del PC.

Tres fueron las preguntas que se respondieron con estos ensayos. ¿Qué precisión, qué exactitud y qué resolución tiene el equipo electrónico de medida?

Precisión

Se realizaron ensayos sobre diferentes redes RC. Uno sobre una red RC con valores de $1k\Omega$ - $10nF$ - $1k\Omega$ (Figura 62).

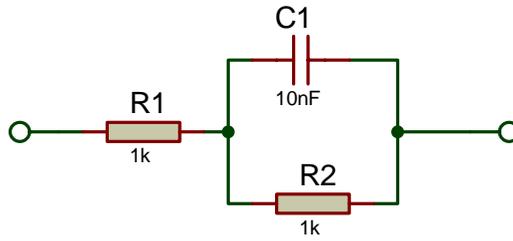


Figura 62. Red RC para la calibración del equipo electrónico de medida.

Se realizaron varias repeticiones con el fin de estudiar la precisión o reproducibilidad. Como se observa en la Figura 63, la superposición de las medidas indica que su excelencia.

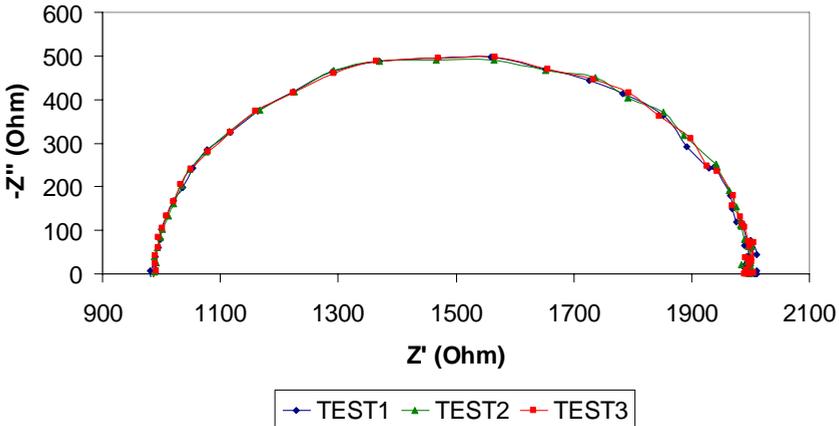


Figura 63. Valores experimentales de la red RC 1k Ω -10nF-1k Ω

Los resultados obtenidos para el resto de redes RC fueron igual de buenos.

La máxima desviación de los datos experimentales con respecto al promedio fue de un 4,5%.

Exactitud

Se compararon los datos experimentales con los valores teóricos de la red RC. Los resultados quedan recogidos en la Figura 64. Igualmente, la superposición

de las curvas denota una exactitud del equipo magnífica, advirtiéndose sólo a frecuencias altas un ligero desplazamiento sobre el valor teórico. El error máximo en este caso fue del 2,1%.

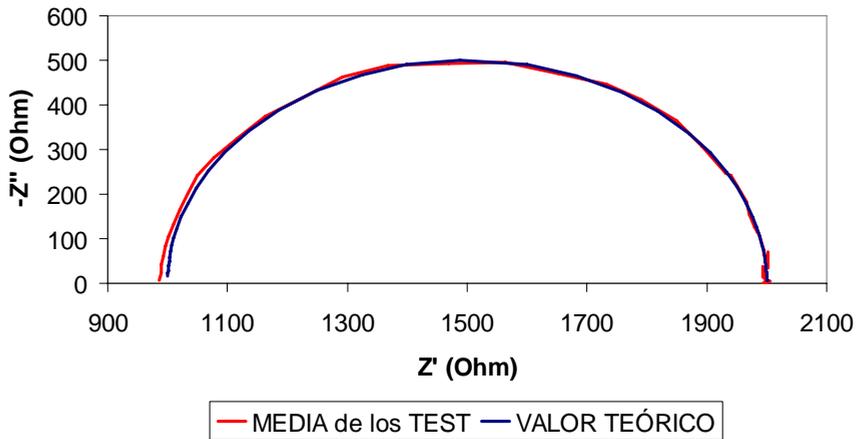


Figura 64. Comparativa entre la media de los valores experimentales y el valor teórico de la red RC (1kΩ-10nF-1kΩ).

Resolución

La resolución del equipo está asociada a los 8 bits de los convertidores A/D y D/A.

La resolución de la tensión es el cociente entre el fondo de escala (máxima tensión que se puede medir) y 256.

$$resolución_V = \frac{1V}{256} = 3,9mV$$

Por tanto, la resolución del equipo electrónico de medida para cada escala es:

$$\text{resolución}_{-Z_{10mA}} = \frac{3,9mV}{10mA} = 0,1\Omega$$

$$\text{resolución}_{-Z_{1mA}} = \frac{3,9mV}{1mA} = 1\Omega$$

$$\text{resolución}_{-Z_{100\mu A}} = \frac{3,9mV}{100\mu A} = 10\Omega$$

$$\text{resolución}_{-Z_{10\mu A}} = \frac{3,9mV}{10\mu A} = 100\Omega$$

Es decir, la resolución del equipo varía en función del valor de la resistencia de *shunt* (ver Tabla 3).

	Resistencia de <i>shunt</i>			
	100Ω	1kΩ	10kΩ	100kΩ
Resolución	0.1Ω	1Ω	10Ω	100Ω

Tabla 3. Resolución del equipo en función del rango de medida.

7. Validación experimental del sistema de medida

Una vez ajustados los parámetros de diseño del equipo electrónico de medida y depurado el software de la aplicación PC, se realizó un ensayo para validarlo y comprobar si era capaz de discriminar diferentes tipos de productos alimenticios.

Se midió la impedancia de piezas de queso, salmón, jamón, lomo y mojama a 50 frecuencias diferentes, desde 1Hz hasta 1MHz, utilizando para ello el *electrodo de aguja* (ver *Capítulo 1. Desarrollo del sistema de medida - 5.- Electrodo - 5.1.- Electrodo de aguja* página 109). Los valores de los espectros de los módulos y de las fases fueron sometidos a un análisis discriminante (ver *Antecedentes - 5.3 Análisis discriminante DA* página 44).

Se utilizaron 64 observaciones para desarrollar un modelo que discriminara entre los 5 productos diferentes (12 muestras de jamón, 16 de lomo, 14 de

mojama, 12 de queso y 10 de salmón). Se obtuvieron 4 funciones discriminantes (Tabla 4) con valores P menores que 0,05, siendo por tanto estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95%.

Función discriminante	Eigenvalor	% Varianza	Valor-P
1	260,166	47,06	0,0000
2	230,798	41,75	0,0000
3	47,3808	8,57	0,0000
4	14,5218	2,63	0,0000

Tabla 4. Cuadro resumen del análisis de la varianza.

Como puede observarse en la Figura 65 el sistema de medida clasificó correctamente el 100% de las 64 observaciones empleadas para ajustar el modelo.

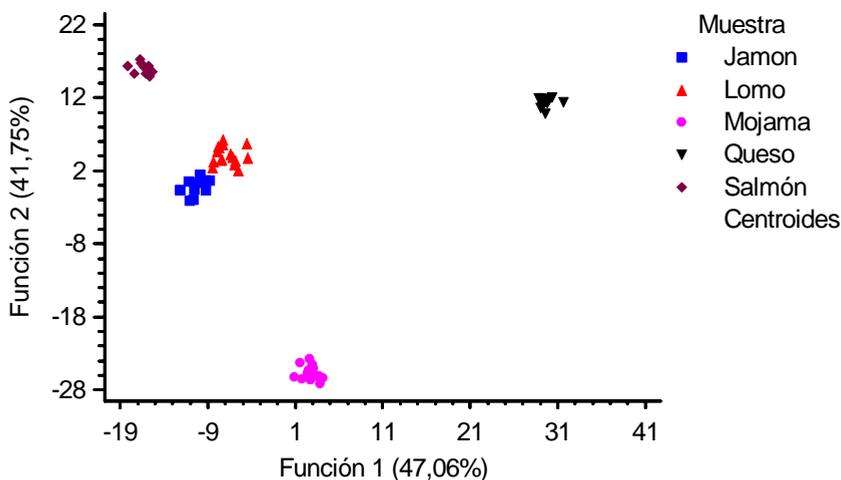


Figura 65. Análisis discriminante de varios tipos de alimentos.

Correlacionando los resultados con los análisis fisicoquímicos (Tabla 5) se observa cómo la humedad predomina en la Función 1 y la sal disuelta en la fase líquida (Z^{NaCl}) en la Función 2.

	Resistencia de <i>shunt</i>			
	Humedad ¹	NaCl ²	Z ^{NaCl3}	aw
Jamón	54,67	4,88	8,93	0,91
Lomo	55,33	3,05	5,52	0,94
Salmón	63,61	2,97	4,67	0,96
Mojama	45,84	8,53	18,61	0,84
Queso	34,55	1,79	5,18	0,95

¹humedad (g H₂O/100 g); ²g NaCl/100g producto; ³g NaCl/100g fase líquida

Tabla 5. Análisis fisicoquímicos.

8. Aspecto final

La electrónica diseñada junto con la alimentación se ensambló en una caja. El resultado se muestra en la Figura 66.

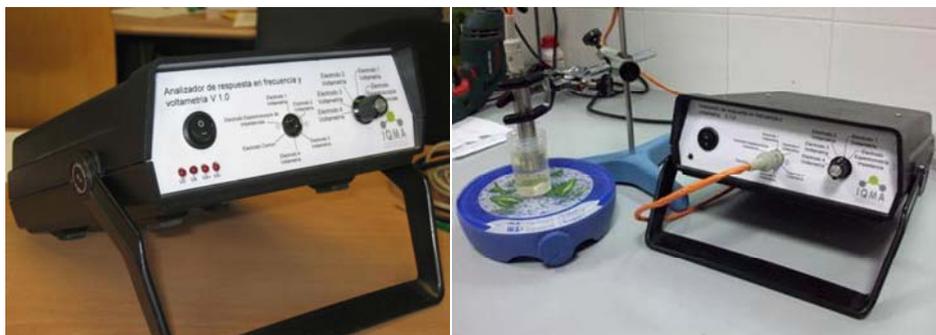


Figura 66. Aspecto exterior del equipo electrónico de medida.

9. Conclusiones

Se ha desarrollado un sistema de medida de bajo coste y de carácter no destructivo capaz de realizar medidas de impedancia que cumple con las especificaciones generales marcadas al principio de este capítulo. Para ello se ha

diseñado un equipo electrónico de medida, se ha programado una aplicación software en PC y se han construido electrodos con diferentes geometrías.

La electrónica del equipo se ha diseñado para satisfacer las especificaciones técnicas descritas anteriormente y con la capacidad de albergar en un futuro nuevas técnicas electroquímicas de medida, como la voltametría cíclica o de pulsos. Para ello se ha recurrido al uso de técnicas digitales de multiproceso basadas en lógica programable.

El equipo electrónico de medida ha resultado relativamente económico. Ciertamente que se trata de un prototipo y no de un sistema preparado para salir al mercado. El coste total supone una décima parte del precio de mercado de un equipo comercializado actualmente, como el espectrómetro de impedancia Autolab PGSTAT100 + módulo FRA2 de Echo Chemie, el analizador de respuesta en frecuencia 1255B de Solartron Analytical o el analizador de impedancia 4294A de Agilent-HP, entre otros.

Debido a las dimensiones reducidas de los electrodos con respecto a las muestras el sistema desarrollado tiene una capacidad de medida puntual y de carácter no destructivo.

El interfaz de usuario programado es de manejo muy sencillo y por tanto no requiere de personal especializado.

El equipo ha sido calibrado mediante redes RC, obteniendo una buena reproducibilidad (4,5% de desviación máxima de los datos experimentales con respecto al promedio) y una gran exactitud (2,1% de error máximo).

La validación del sistema se hizo sobre muestras reales de alimentos. Se midió la impedancia de queso, salmón, lomo, jamón y mojama para comprobar su capacidad de clasificación. Los datos obtenidos se procesaron con una técnica multivariante de análisis discriminante. Los resultados fueron inmejorables. Se obtuvo una excelente diferenciación de las muestras.

Capítulo 2. Aplicación del sistema de medida a productos cárnicos crudo-curados.

En este capítulo se describen dos aplicaciones del sistema de medida en productos cárnicos crudo curados. Por un lado salmueras y carne de cerdo picada y por otro muestras de lomo enteras. Se han realizado medidas de impedancia a 50 frecuencias diferentes (desde 1Hz hasta 1MHz) obteniendo el espectro de módulo y de fase para cada medida. Mediante la técnica multivariante PLS se han correlacionado los datos de impedancia con diferentes parámetros fisicoquímicos para obtener modelos de predicción.

El capítulo se ha dividido en dos partes:

- Estudio del contenido de sal en salmueras y carne picada.
- Determinación de parámetros fisicoquímicos en muestras de lomo de cerdo durante el proceso de curado.

1. Estudio del contenido de sal en salmueras y carne picada

La salazón es una de las técnicas de conservación de alimentos más primitivas. Consigue prolongar la vida útil de los productos reduciendo su actividad de agua mediante la absorción de sal y la deshidratación parcial.

Para llevar a cabo el método de salazón es habitual recurrir a la preparación de salmueras; soluciones con concentraciones de cloruro sódico conocidas. Es fundamental saber exactamente el contenido en sal para garantizar el control del proceso y la homogeneidad del producto final. Concentraciones heterogéneas provocarían diferencias en los parámetros físicos y en las propiedades organolépticas del alimento fácilmente perceptibles por el consumidor.

La determinación exacta de la concentración de sal puede ser de interés igualmente en otros campos de actividad, como por ejemplo en las plantas de desalinización.

La industria alimentaria exige dispositivos que permitan medir con facilidad el contenido en sal de un producto. Los equipos convencionales empleados hasta la fecha no se adaptan a las necesidades del mercado vigente. A la naturaleza destructiva de los métodos tradicionales hay que sumar otros inconvenientes: el procedimiento es lento, costoso y requiere de personal cualificado [19]. Esta es la razón del creciente interés en desarrollar métodos rápidos, no destructivos y aptos para ser empleados por cualquier empleado, independientemente de su grado de formación, que permitan determinar la concentración de sal y otros parámetros relevantes en la caracterización de productos de salazón, como actividad de agua y humedad. Si el diseño del equipo permite su incorporación como herramienta de monitorización durante la elaboración del producto, se satisface una de las exigencias más demandadas en el sector alimentario, asegurar el control total del proceso. De este modo, la comprobación de que todas las unidades producidas cumplen las especificaciones de calidad definidas inicialmente, no sólo garantiza la calidad del producto final, también incrementa la productividad industrial.

Son varios los métodos que se han investigado para la determinación del contenido de sal y humedad. Así, la técnica de propagación por microondas se está utilizando como sistema de monitorización en línea del contenido de sal de mantequilla [10] o para evaluar el contenido de agua en carne de cerdo [11]. Huang *et al.* [12] aplicaron la espectroscopía de infrarrojo cercano para cuantificar el cloruro sódico y humedad del salmón. También se ha recurrido a la tomografía computarizada para obtener el contenido de agua y sal en carne de cerdo [15][16].

El *setup* empleado en esta aplicación ha sido el sistema de medida diseñado en conjunto con el *electrodo de aguja*. La configuración del electrodo en forma de aguja favorece la penetración del mismo en la muestra y permite realizar varias medidas puntuales sobre la misma pieza. Además, el reducido diámetro de la aguja hace posible descartar daños posteriores en las muestras, y en consecuencia considerar que se trata de un ensayo no destructivo.

1.1. *Material y métodos.*

Preparación de las muestras de salmuera

Se prepararon disoluciones con diferentes concentraciones de NaCl, desde el 0% (agua destilada) hasta el 25% (saturación) de NaCl. Los contenidos evaluados fueron 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 12, 15, 20 y 25% NaCl (g NaCl/100 g agua destilada). El reactivo NaCl fue obtenido de Panreac Química S.A.U. (Barcelona, Spain).

Preparación de las muestras de lomo de cerdo

Se empleó un lomo de cerdo totalmente desgrasado. La carne se trituró con una máquina picadora estándar con las cuchillas de corte en posición horizontal. Una vez picada se dividió en nueve lotes, ocho de los cuales se mezclaron con cantidades diferentes de sal. Para homogeneizar la mezcla se realizó amasado manual durante cinco minutos. Las muestras se almacenaron a 4 °C durante 72 horas para asegurar una distribución uniforme de sal en los lotes. Tras el acondicionado se obtuvieron diez muestras con las siguientes concentraciones de sal: 1%, 2%, 3%, 5%, 7%, 10%, 12%, 15%, 20% y 25% (g NaCl/100 g muestra). En el último lote no se añadió cloruro sódico (lote 0%).

Para cada uno de los lotes se determinó el contenido en humedad, pH y actividad de agua (a_w). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6.

Para determinar la concentración de cloruro sódico en la fase líquida de las muestras de carne picada salada (z^{NaCl}) se ha asumido que tanto el cloruro sódico como el agua presentes en cada lote son partículas libres que forman parte de una salmuera absorbida por la matriz proteica de la muestra de carne [124].

Se determinó la impedancia tanto de las salmueras como de las muestras de carne picada salada preparadas. En ambos casos las medidas se realizaron a temperatura constante de 23 °C.

Disolución	Humedad	pH	a _w
0% NaCl	74.79 ± 0.18	5.74 ± 0.05	0.986 ± 0.001
1% NaCl	73.91 ± 0.08	5.76 ± 0.05	0.980 ± 0.002
2% NaCl	72.99 ± 0.08	5.76 ± 0.05	0.973 ± 0.002
3% NaCl	72.27 ± 0.15	5.67 ± 0.05	0.966 ± 0.001
5% NaCl	70.66 ± 1.61	5.67 ± 0.05	0.944 ± 0.009
7% NaCl	68.79 ± 1.17	5.61 ± 0.05	0.928 ± 0.002
10% NaCl	67.20 ± 1.25	5.61 ± 0.05	0.897 ± 0.001
12% NaCl	65.51 ± 1.25	5.61 ± 0.05	0.886 ± 0.001
15% NaCl	63.22 ± 0.23	5.51 ± 0.05	0.875 ± 0.001
20% NaCl	59.40 ± 0.23	5.51 ± 0.05	0.855 ± 0.001
25% NaCl	55.80 ± 0.29	5.51 ± 0.05	0.835 ± 0.002

Tabla 6. Determinación de humedad, pH y actividad de agua en lomo de cerdo.

Elección de las frecuencias y electrodo

Las medidas se realizaron en un rango de frecuencias situado entre 1Hz y 1MHz, empleando el electrodo coaxial de aguja.

Fisicoquímicos. Determinaciones analíticas

Para poder determinar la concentración de sal presente en cada uno de los lotes de carne picada fue necesario un acondicionamiento previo de los mismos. En primer lugar se llevó a cabo la dispersión de las muestras en agua destilada, empleando para ello un equipo dispersor de altas revoluciones, concretamente el Ultraturrax T25 (IKA, Labortechnik, Staufen, Alemania), trabajando a 9.000 rpm durante 5 min. Los volúmenes resultantes fueron envasados a 100 ml y posteriormente sometidos a centrifugación mediante centrifuga Medifriger BL (JP Selecta, S.A., Barcelona, Spain), aplicando 500 x g durante 5 min.

Tras dicha preparación, la cuantificación del contenido en cloruro sódico de las muestras se realizó con el equipo de análisis de cloruros Sherwood 926 (Cambridge, UK), mediante titulación a temperatura ambiente de una alícuota del sobrenadante obtenido tras el centrifugado. La concentración de sal

(Ecuación 41) existente en la fase líquida del lomo de cerdo (Z^{NaCl}) se estimó teniendo en cuenta las fracciones de peso de cloruro sódico (X^{NaCl}) y de agua (X^w), de acuerdo con la siguiente ecuación [125].

$$Z^{NaCl} = \frac{X^{NaCl}}{X^{NaCl} + X^w} \quad \text{Ecuación 41}$$

Análisis de datos

Todas las medidas de impedancia obtenidas en el ensayo fueron sometidas a un análisis de varianza (ANOVA) con el fin de valorar si existían diferencias significativas entre las disoluciones de cloruro sódico analizadas. Se empleó el método LSD (least significant difference) para discriminar medios con un nivel de significancia del 5%.

Posteriormente se realizó un análisis de componentes principales (PCA, Principal Component Analysis) con objeto de reducir el número de variables del estudio. El diagrama de dispersión reveló que las medidas correspondientes a la disolución no salada debían excluirse del estudio.

Por último, se empleó el modelo PLS como herramienta estadística para estimar y predecir la concentración de sal presente tanto en las disoluciones de cloruro sódico como en la fase líquida de la carne de cerdo picada. En el caso de las salmueras, la implementación del método requirió dividir el total de resultados experimentales obtenidos en dos grupos. El primero, compuesto por una serie de 46 datos, se empleó para establecer el modelo de regresión, utilizando la técnica “leave one out”. Los 18 datos que formaban el segundo grupo permitieron la validación del modelo PLS. Todas las variables incluidas en el primer grupo de datos se estandarizaron antes de someterse al análisis estadístico. Sin embargo, para realizar la validación del modelo se recurrió a coeficientes no normalizados. En consecuencia las 18 variables que constituían el conjunto de validación tampoco se estandarizaron.

Para las muestras de carne picada se siguió un procedimiento similar. En este caso se recurrió a un total de 48 datos para determinar el modelo y 21 datos constituyeron el grupo de validación.

Para el tratamiento estadístico de los datos se utilizó el programa Statgraphics Centurion XV (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA).

1.2. Resultados de las salmueras

El objetivo prioritario de la investigación fue hacer posible la predicción de las concentraciones de cloruro sódico presentes en muestras de carne salada, empleando para ello un equipo sencillo capaz de realizar medidas de impedancia. Para conseguirlo se utilizó el electrodo de aguja.

La determinación del contenido de sal se realizó en primer lugar sobre salmueras con diferentes proporciones de cloruro sódico, concretamente con el 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 12, 15, 20 y 25% de NaCl (g NaCl/100 g agua destilada).

Gran parte de los datos experimentales se destinaron a establecer el modelo de regresión y el resto de los valores se emplearon para comprobar la fiabilidad del sistema predictivo, constituyendo por tanto los elementos de validación. Las medidas de impedancia se realizaron para 50 valores de frecuencia incluidos dentro del rango existente entre 1Hz y 1MHz.

En la Figura 67 y Figura 68 se representan los valores medios de los módulos de la impedancia obtenidos para cada una de las disoluciones de cloruro sódico. Como se aprecia, las diferencias más significativas corresponden a las disoluciones de menor concentración de NaCl. Los resultados son muy similares si se consideran los valores de las fases de la impedancia (Figura 69 y Figura 70).

Cabe destacar que los valores de impedancia obtenidos para la disolución no salada (0% NaCl) fueron muy superiores a los alcanzados por el resto de las disoluciones, lo que se aprecia muy claramente al representar el diagrama de dispersión (Figura 74). Así pues, la interpretación del Análisis de Componentes Principales permitió reducir la dimensión de la investigación, al poner en evidencia que los valores obtenidos con el agua destilada no aportaban información relevante para la realización del estudio predictivo. Por tanto se prescindió de los datos correspondientes a la disolución no salada. Se aplicó la

misma restricción en el análisis de los datos obtenidos en las muestras de carne picada.

Ya se ha estudiado previamente por diferentes autores [72][73] la estrecha relación existente entre el contenido de cloruro sódico y los datos de impedancia. De hecho, la conductancia de una disolución depende directamente del contenido en iones presentes en ella, y concretamente las medidas de impedancia expresan la capacidad de movimiento de dichos iones cuando son sometidos a un campo eléctrico.

El análisis de varianza realizado para cada medida reflejó la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las disoluciones de NaCl para frecuencias superiores a 100 Hz. Por tanto, de acuerdo con los resultados estadísticos obtenidos, el estudio se centró en el rango de frecuencias existente entre 100 Hz y 1 MHz.

En la Figura 67 y Figura 68 se observa la variación del módulo de la impedancia en función de la concentración de sal en el rango de frecuencia de 10kHz a 1MHz.

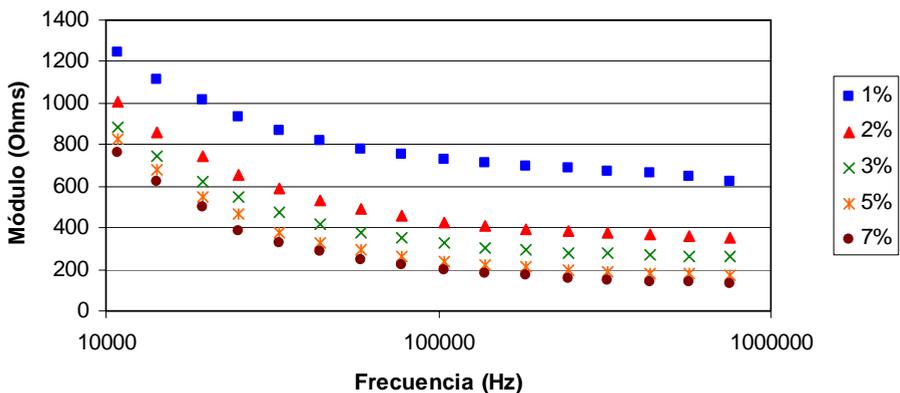


Figura 67. Módulo de la impedancia de las disoluciones en función de la concentración de NaCl (1-7%).

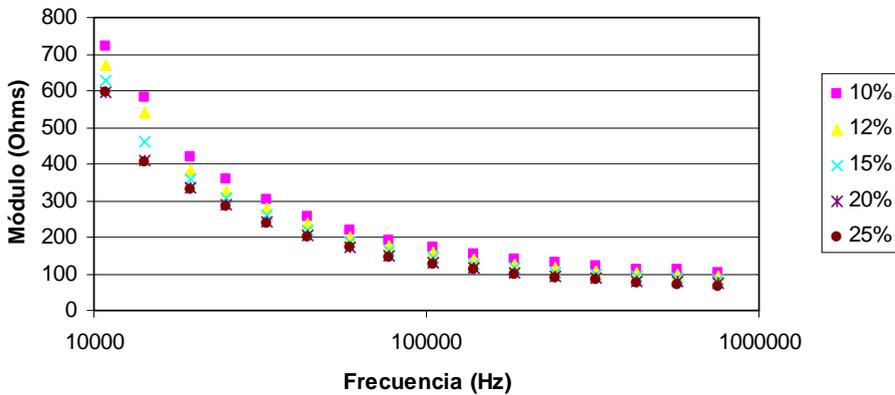


Figura 68. Módulo de la impedancia de las disoluciones en función de la concentración de NaCl (10-25%).

En la Figura 69 y Figura 70 se observa la variación de la fase de la impedancia en función de la concentración de sal en el rango de frecuencia de 10kHz a 1MHz.

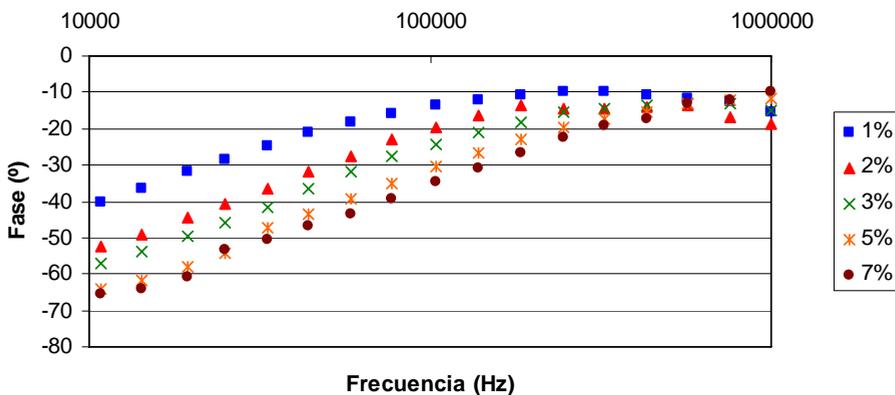


Figura 69. Fase de la impedancia de las disoluciones en función de la concentración de NaCl (1-7%).

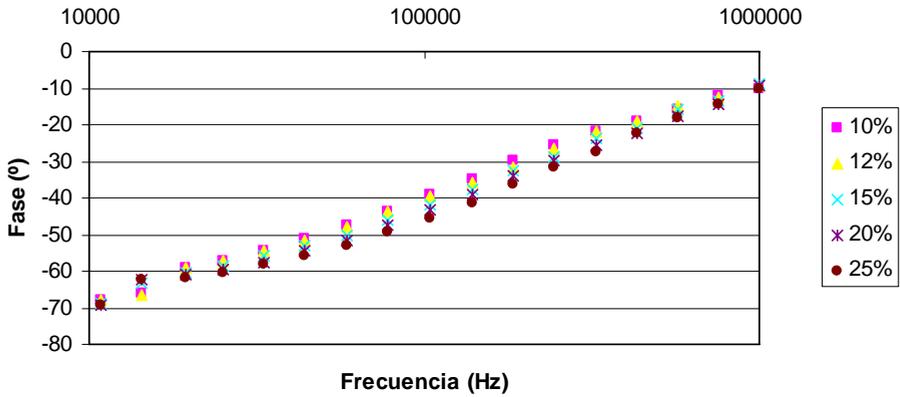


Figura 70. Fase de la impedancia de las disoluciones en función de la concentración de NaCl (10-25%).

En la Figura 71 se observa los diferentes diagramas de Nyquist (parte imaginaria frente a parte real) de la impedancia de las disoluciones en función de la concentración de sal en el rango de frecuencia de 10kHz a 1MHz.

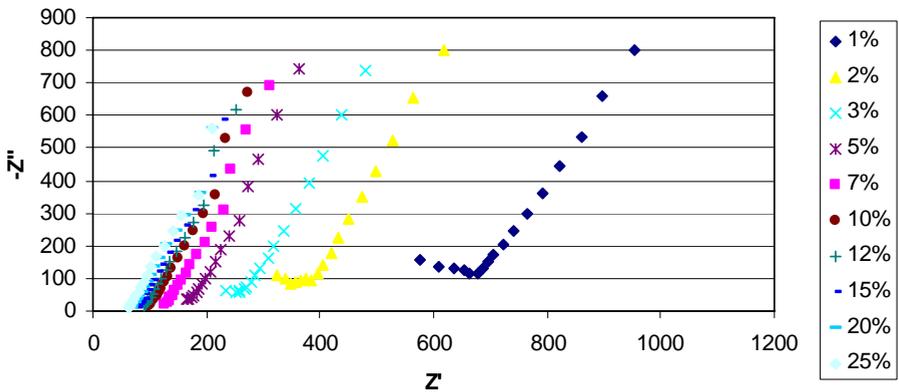


Figura 71. Diagramas de Nyquist de la impedancia de las disoluciones en función de la concentración de sal en el rango de frecuencia de 10kHz a 1MHz.

Para discernir y poder visualizar los diagramas de Nyquist a altas concentraciones en la Figura 72 se representa el Nyquist para concentraciones de 1% a 7% y en la Figura 73 para concentraciones de 10% a 25%.

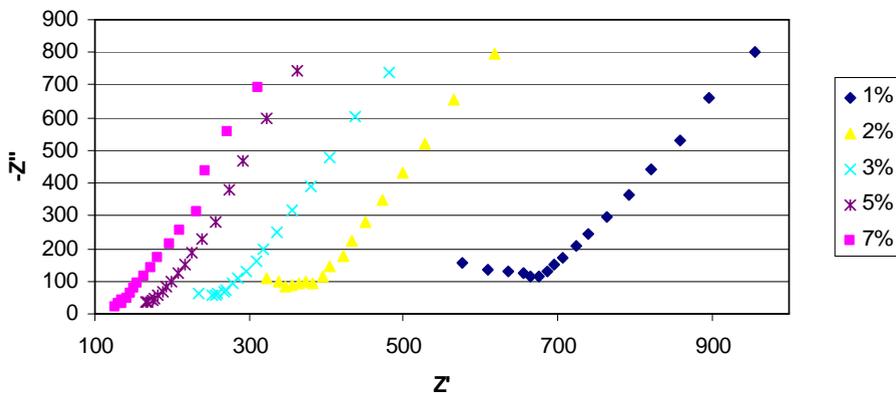


Figura 72. Diagramas de Nyquist de la impedancia de las disoluciones en función de la concentración de sal (1% - 7%) en el rango de frecuencia de 10kHz a 1MHz.

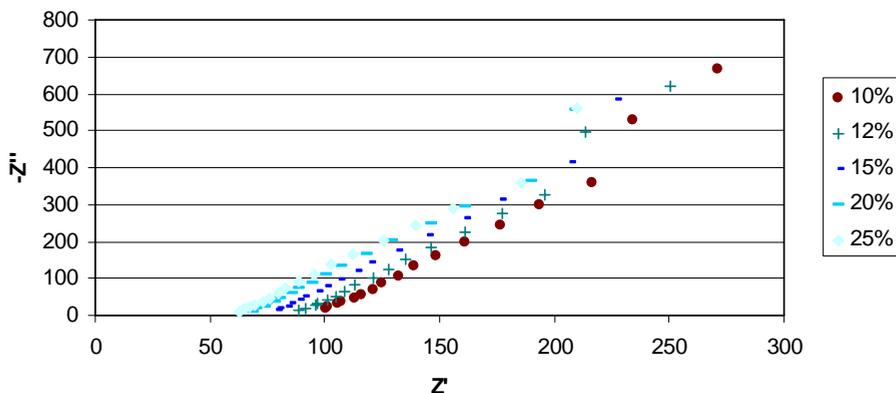


Figura 73. Diagramas de Nyquist de la impedancia de las disoluciones en función de la concentración de sal (10% - 25%) en el rango de frecuencia de 10kHz a 1MHz.

1.2.1. Análisis de Componentes Principales

Todos los datos experimentales obtenidos fueron sometidos en primer lugar a un Análisis de Componentes Principales (PCA, Principal Component Analysis), técnica estadística de síntesis de la información, cuyo propósito es reducir el número de variables del estudio. Las componentes principales se obtienen al realizar combinaciones lineales de las variables originales. Son factores

independientes entre sí, capaces de explicar gran parte de la variabilidad total de los datos.

En este caso se han seleccionado dos componentes principales, puesto que poseen valores propios (“eigenvalue”) muy superiores a 1 y con ambos se alcanza una varianza acumulada del 99,2% (Tabla 7).

Componente Principal	Eigenvalue	% Varianza	% Varianza acumulada
1	56,8987	86,210	86,210
2	8,5762	12,994	99,204
3	0,1851	0,280	99,485
4	0,1515	0,230	99,715
5	0,0565	0,086	99,800

Tabla 7. Análisis de Componentes Principales en salmueras.

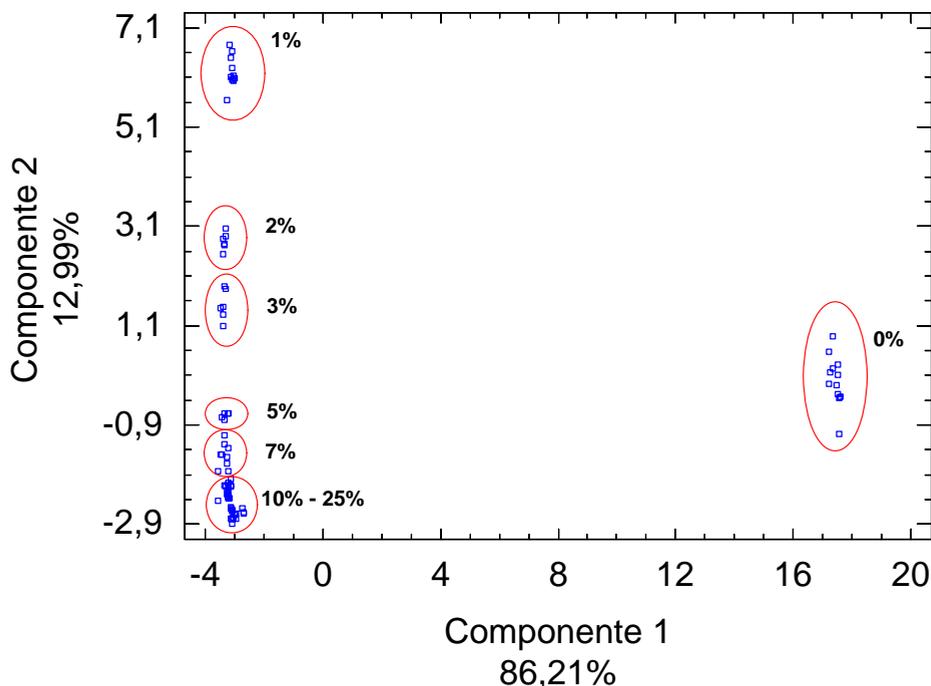


Figura 74. Diagrama de dispersión de las salmueras.

Aunque a priori el resultado parecía muy satisfactorio, el diagrama de dispersión posterior (Figura 74) evidenció que la primera componente principal únicamente discriminaba la presencia o ausencia de sal. En un estudio predictivo de la concentración de sal de salmueras no tiene sentido considerar este criterio. Como consecuencia de este razonamiento se volvió a realizar un Análisis de Componentes Principales, sin incluir los datos experimentales obtenidos con la disolución de 0% NaCl.

Como puede apreciarse en la Tabla 8 adjunta, en esta ocasión se identificaron cuatro componentes principales. Todos ellos tenían un eigenvalue mayor a 1 y su varianza acumulada llega al 97,3%.

Componente Principal	Eigenvalue	% Varianza	% Varianza acumulada
1	53,7026	81,368	81,368
2	4,6827	7,095	88,463
3	4,4412	6,729	95,192
4	1,4023	2,125	97,317
5	0,8939	1,354	98,671
6	0,2772	0,420	99,091
7	0,1655	0,251	99,342

Tabla 8. Análisis de Componentes Principales en salmueras excluyendo disolución 0% NaCl.

La Figura 75 muestra la representación gráfica de las dos primeras componentes. Pueden identificarse claramente los patrones de reconocimiento de todas las concentraciones estudiadas. Se observa una alta correlación entre el eje de la primera componente y el nivel de sal de las disoluciones.

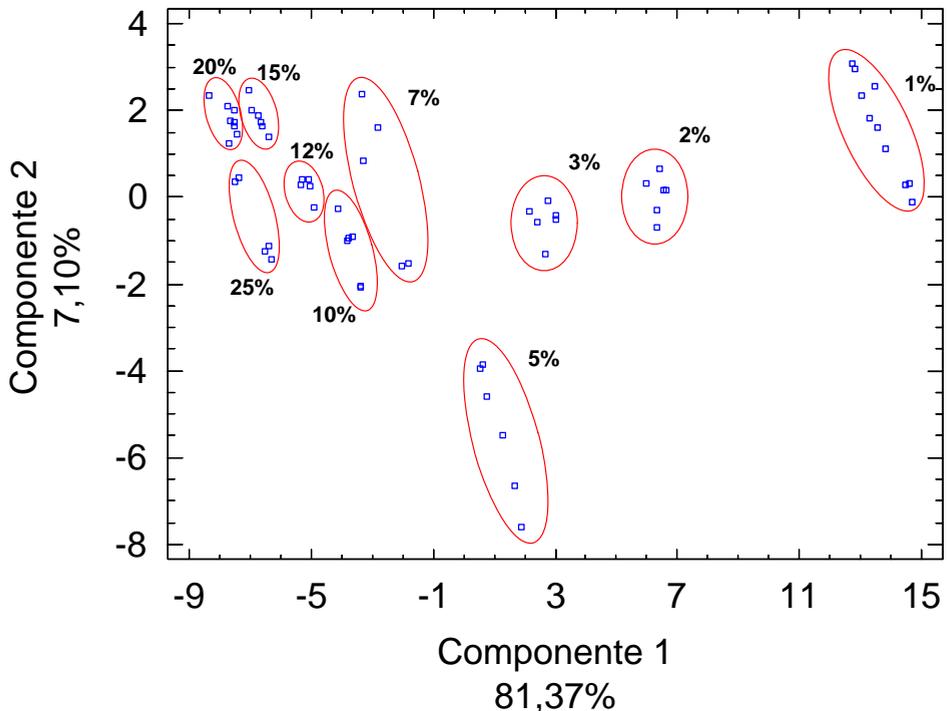


Figura 75. Diagrama de dispersión de las salmueras excluyendo disolución 0% NaCl.

La conclusión del Análisis de Componentes Principales de los datos es la necesidad de excluir del estudio los datos referentes a la disolución 0% NaCl. Por tanto en el estudio se consideraron los datos experimentales obtenidos con las diez salmueras con diferentes concentraciones de cloruro sódico.

Esta restricción no supone ninguna limitación para el desarrollo del modelo predictivo. El objetivo es diseñar un equipo capaz de determinar el contenido de sal en alimentos y todos los alimentos contienen sal en mayor o menor medida.

1.2.2. Caracterización del contenido en sal y modelo estadístico mediante PLS

Se ha recurrido a la regresión PLS para establecer una relación cuantitativa entre el módulo y la fase de la impedancia y el contenido de sal. Esta

herramienta estadística permite implementar un modelo predictivo, al establecer una correspondencia matemática entre la impedancia y la concentración de sal de una disolución. Así, partiendo de un valor de impedancia conocido se puede estimar la concentración de cloruro sódico presente en la salmuera.

Para construir el modelo PLS se utilizó como conjunto de calibración una matriz de datos compuesta por las 46 medidas realizadas en las salmueras y los valores de módulo y fase de la impedancia en un barrido de 32 frecuencias contenidas dentro del rango entre 100 Hz y 1 MHz.

Para desarrollar la técnica se ha seguido el siguiente algoritmo de calibración PLS:

- Normalización: escalado y centrado de las variables.
- Transformación logarítmica de la variable dependiente (recomendable cuando su variabilidad es superior a un orden de magnitud).
- Obtención del número de componentes (variables latentes) que minimizan el error cuadrático medio (PRESS) en la validación cruzada, empleando el procedimiento “leave one out”.
- Eliminación de las muestras con un residual estandarizado en valor absoluto mayor que 2.
- Repetición de los dos últimos pasos hasta que no haya *outliers*, es decir valores que son significativamente diferentes a los otros datos.

El análisis de la varianza (ANOVA) concedió un nivel de confianza del 95% al modelo ajustado.

Por último, el modelo fue validado antes de emplearse como elemento de predicción de nuevos eventos. Para cubrir esta última etapa del proceso se reservaron un total de 18 datos experimentales.

El modelo PLS resultante está compuesto por diez variables latentes o factores. La Tabla 9 recoge los datos estadísticos resultantes de los procedimientos de calibración y validación. En la fase de calibración se logró obtener un buen coeficiente de determinación ($R^2 = 0.981$) y un buen factor de suma cuadrática de residuos (PRESS = 19.96). Cuando se usó el modelo de calibración para predecir los valores de las medidas incluidas en el conjunto de validación, los coeficientes alcanzados fueron también muy buenos ($R^2 = 0.975$ y PRESS =

60.36). Los resultados obtenidos permiten calificar de excelente el modelo predictivo [13].

NaCl	Calibración		Validación	
	R ²	PRESS	R ²	PRESS
	0,981	19,6	0,975	60,36

Tabla 9. Resultados de calibración y predicción del contenido de NaCl en salmueras (R²: coeficiente de determinación; PRESS: Suma cuadrática de los residuos).

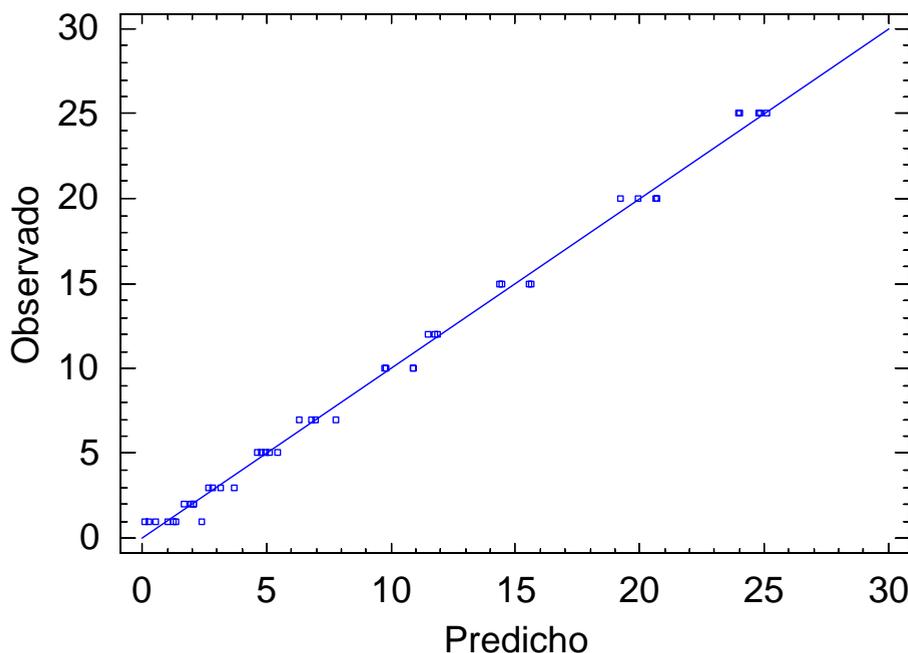


Figura 76. Contenido de %NaCl del grupo de calibración (valores determinados vs. valores modelo predictivo) respecto a la línea de referencia.

La Figura 76 recoge los porcentajes de cloruro sódico presentes en las muestras que componen el grupo de calibración. Se ha representando en el eje de abscisas los valores predichos por el modelo y en el eje de ordenadas los valores determinados analíticamente. Se exhibe también como línea de referencia la recta ideal de ajuste de los datos (con pendiente 1 y ordenada en el origen 0), aquella en que los valores predichos son idénticos a los determinados. A simple

vista ya se observa un alto grado de precisión, por la escasa dispersión de los datos respecto a la línea de referencia. Esta percepción queda confirmada matemáticamente, puesto que la ecuación de la recta de ajuste (Figura 77) posee unos valores de pendiente (0,94) y ordenada en el origen (0,68) que indican la bondad del modelo predictivo.

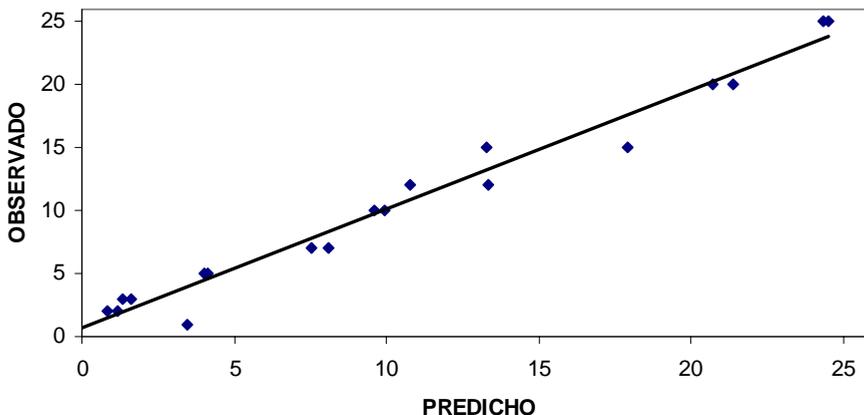


Figura 77. Contenido de NaCl del grupo de validación (valores determinados vs. valores modelo predictivo) respecto a la recta resultante del ajuste lineal de los mismos.

Transformación logarítmica de la variable dependiente

Según S. Wold *et al.* [116] datos con una variabilidad superior a un orden de magnitud pueden someterse a una transformación logarítmica. En este caso, la conversión de la variable dependiente (respuesta) ha permitido alcanzar un grado de ajuste del modelo predictivo aún más elevado.

Se repitió el análisis estadístico de los datos, incluyendo en el conjunto de calibración los valores transformados. El modelo PLS en esta ocasión lo formaron nueve variables latentes. Los parámetros indicadores de la bonanza del modelo predictivo fueron excelentes, con un coeficiente de determinación R^2 de 0,9984 frente al 0,981 anterior, y una suma cuadrática de los residuos (PRESS) de 1,087, frente al 19,96. Además, el análisis de varianza previo

otorgó un nivel de confianza elevadísimo al modelo ajustado, ya que el P-valor obtenido con ANOVA fue extremadamente pequeño.

La validación del modelo predictivo concedió un coeficiente de determinación R^2 de 0,9965 y una suma cuadrática de residuos PRESS de 4,94.

La Figura 78 representa las concentraciones de NaCl estimadas por el modelo predictivo frente a las determinadas analíticamente de todos los elementos que constituyen el conjunto de calibración. En esta ocasión la dispersión de los datos respecto a la recta ideal de referencia es prácticamente nula.

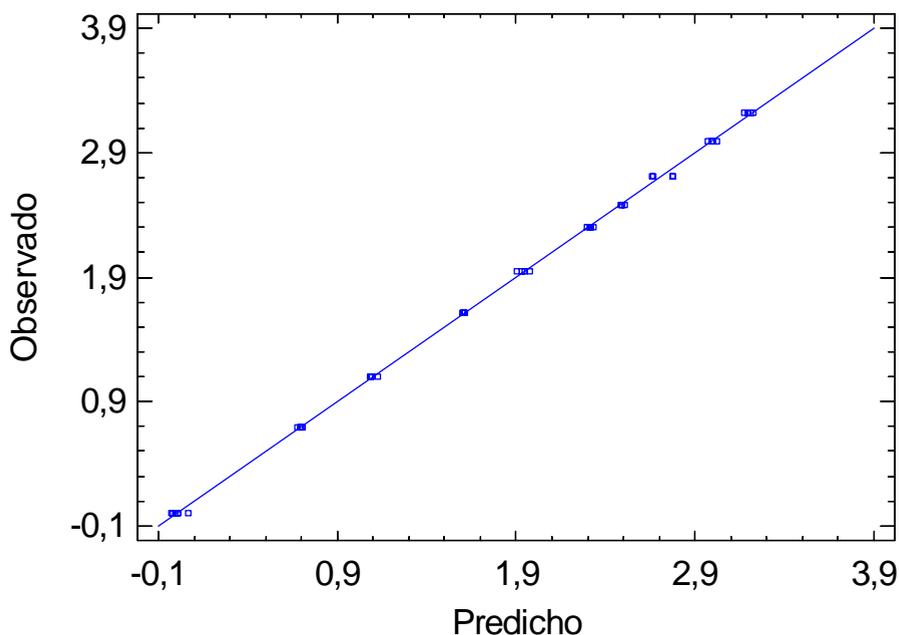


Figura 78. Contenido de NaCl del grupo de calibración transformado logaritmicamente (valores determinados vs. valores modelo predictivo) respecto a la línea de referencia.

Tras aplicar el modelo obtenido a los datos de validación se obtiene una recta más próxima a la ideal (línea de referencia), con una pendiente de 0,9794 y ordenada en el origen 0,0782 (Figura 79).

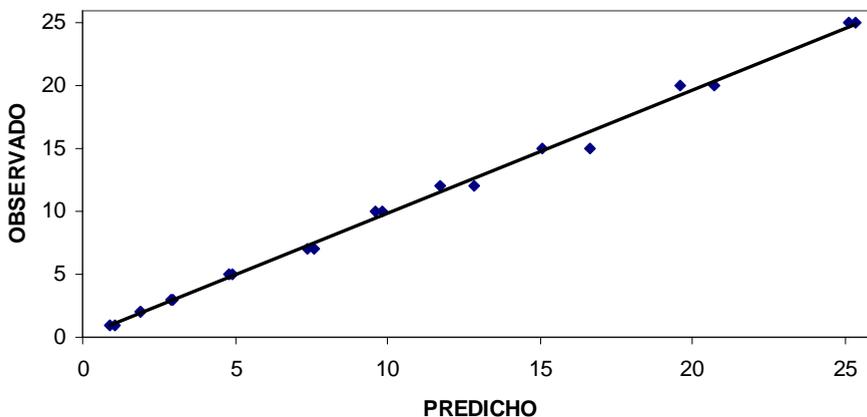


Figura 79. Contenido de NaCl del grupo de validación transformado logarítmicamente (valores determinados vs. valores modelo predictivo) con $R^2 = 0,9965$.

Por tanto, la transformación logarítmica de la variable dependiente mejora el ajuste del modelo predictivo. La Tabla 10 muestra los resultados alcanzados.

NaCl	Calibración		Validación	
	R^2	PRESS	R^2	PRESS
	0,9984	1,087	0,9965	4,94

Tabla 10. Resultados con datos transformados de calibración y validación del contenido de NaCl en salmueras a partir de valores de espectroscopía de impedancia. R^2 : coeficiente de determinación; PRESS: Suma cuadrática de los residuos.

1.3. Resultados en lomo de cerdo

1.3.1. Análisis de Componentes Principales

Tras el Análisis de Componentes Principales (PCA, Principal Component Analysis) de los datos correspondientes a la carne picada se localizan tres componentes principales, con valores propios (“eigenvalue”) superiores a 1.

Con ellos se explica el 96,739% de la variabilidad total de los datos experimentales (Tabla 11).

Componente Principal	Eigenvalue	% Varianza	% Varianza acumulada
1	53,5735	81,172	81,172
2	8,4537	12,809	93,981
3	1,8205	2,758	96,739
4	0,9964	1,510	98,249
5	0,5323	0,806	99,055
6	0,2952	0,447	99,502

Tabla 11. Análisis de Componentes Principales para lomo de cerdo.

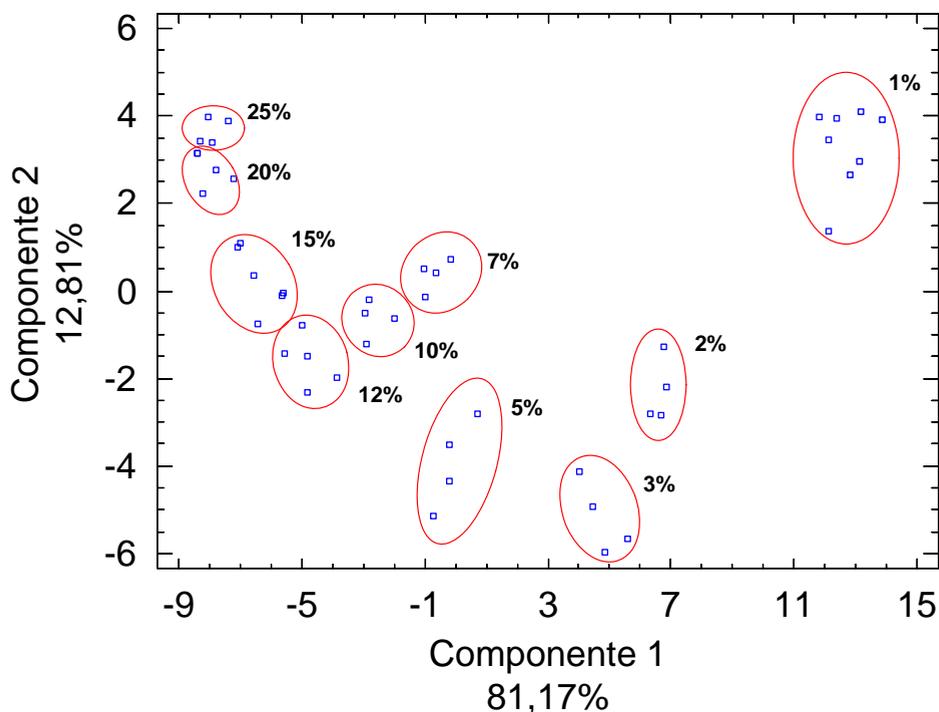


Figura 80. Diagrama de dispersión de lomo de cerdo excluyendo muestra del 0% NaCl.

El diagrama de dispersión (Figura 80) muestra la representación de las dos primeras componentes. Al igual que sucedió con las salmueras una vez excluida la disolución de 0% NaCl, pueden identificarse claramente los patrones de reconocimiento de la mayoría de los lotes objeto de estudio. La proximidad entre las muestras correspondientes al lote del 20% de NaCl y al 25% de NaCl en la gráfica hace que su discriminación no sea tan evidente a simple vista. Sin embargo, la observación más detallada del diagrama permite establecer delimitaciones en las áreas de localización de cada lote.

Las conclusiones extraídas del análisis del gráfico son idénticas a las consideradas en las muestras de salmueras. Existe una correlación directa entre el eje del primer componente y el nivel de sal de los lotes de carne picada.

1.3.2. Caracterización del contenido en sal y modelo estadístico mediante PLS

Para construir el modelo PLS se utilizó como conjunto de calibración una matriz de datos compuesta por las 48 medidas realizadas en los lotes de carne picada y los valores de módulo y fase de la impedancia en un barrido de 32 frecuencias contenidas dentro del rango entre 100 Hz y 1 MHz.

Para la validación del modelo se empleó un total de 21 muestras (conjunto de validación). Los resultados estadísticos obtenidos se exponen en la Tabla 12. Se alcanzaron unos buenos coeficientes de determinación, tanto en la fase de calibración ($R^2 = 0,955$ y $PRESS = 30,63$) como en la de validación ($R^2 = 0,934$ y $PRESS = 75,60$).

NaCl	Calibración		Validación	
	R^2	PRESS	R^2	PRESS
	0,955	30,63	0,934	75,60

Tabla 12. Resultados de calibración y validación del contenido de NaCl en lomo de cerdo a partir de valores de espectroscopía de impedancia. R^2 : coeficiente de determinación; PRESS: Suma cuadrática de los residuos.

Una vez construido el modelo PLS, la Figura 81 representa los contenidos de cloruro sódico de las muestras incluidas en el conjunto de validación, situando en abscisas los valores predichos por el modelo y en ordenadas los valores determinados analíticamente. Aunque en el caso del lomo de cerdo los datos alcanzados en la calibración y validación no son tan espectaculares como los logrados en las salmueras, sigue siendo muy pequeña la dispersión respecto a la línea de referencia (recta ideal). La elevada precisión alcanzada legitima el modelo para la predicción del contenido de cloruro sódico en matrices complejas (como son las muestras de carne picada).

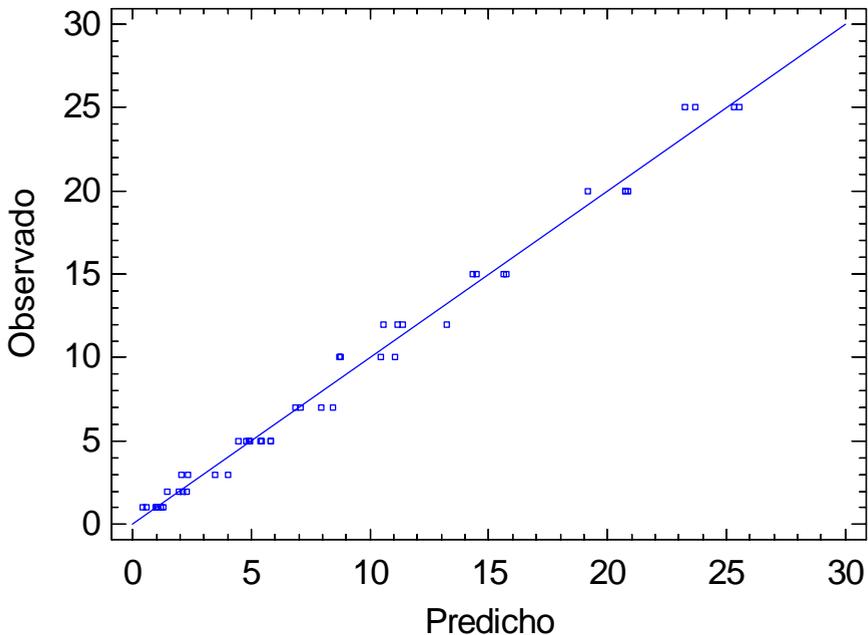


Figura 81. Representación gráfica del contenido de %NaCl del grupo de validación (valores determinados vs. valores modelo predictivo) de lomo de cerdo respecto a la línea de referencia.

La comprobación matemática posterior lo confirma. La ecuación de la recta resultante de realizar el ajuste lineal de los datos (con pendiente de 1,10 y ordenada en el origen -0,56) otorga máxima fiabilidad al modelo predictivo (Figura 82).

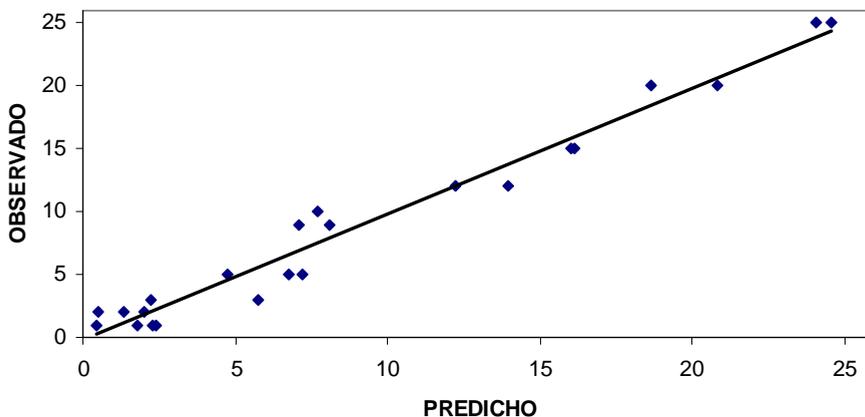


Figura 82. Representación gráfica del contenido de NaCl del grupo de validación (valores determinados vs. valores modelo predictivo) respecto a la recta resultante del ajuste lineal de los mismos en lomo de cerdo.

La determinación del contenido de cloruro sódico presente en una matriz compleja no es sencilla. En la heterogénea composición de una muestra de carne hay multitud de factores que pueden interferir en su evaluación. El denso entramado proteico que constituye la estructura muscular del tejido supone una dificultad, que se ve incrementada por la coexistencia en la fase acuosa de la carne de diversos electrolitos que pueden modificar sus propiedades eléctricas.

Pese a las complicaciones expuestas anteriormente, la experiencia demuestra que es posible establecer un modelo predictivo del contenido de sal presente en muestras de carne.

Es importante destacar que el sistema desarrollado posee una capacidad de discriminación elevada incluso a altas concentraciones de cloruro sódico (20-25% NaCl expresado como g de NaCl/100 g carne picada salada). Esta facultad selectiva no se ha conseguido en los métodos de evaluación diseñados por otros autores [20]. Las investigaciones previas no pudieron discernir niveles de cloruro sódico superiores al 7% debido a que la medida de la impedancia se realizó a una sola frecuencia.

En resumen, existe una correlación entre las medidas de impedancia y la concentración de cloruro sódico presente en las muestras de carne picada. El modelo predictivo implementado alcanza unos coeficientes de ajuste buenos,

por lo que puede considerarse una herramienta potencial para la determinación de contenido de NaCl en muestras saladas.

Transformación logarítmica de la variable dependiente

Siguiendo la misma secuencia de trabajo realizada en el estudio de las salmueras, se ha procedido a la transformación logarítmica de la variable dependiente de las muestras de carne picada.

El modelo PLS resultante estuvo formado por diez componentes. Tanto el coeficiente de determinación ($R^2 = 0,9898$) como la suma cuadrática de los residuos (PRESS = 1,7124) obtenidos tras la conversión mejoraron ostensiblemente con respecto a las representaciones no logarítmicas.

En la fase de validación también se optimizaron los valores, consiguiendo un coeficiente de determinación de 0,9896 y una suma cuadrática de los residuos de 16,77.

NaCl	Calibración		Validación	
	R ²	PRESS	R ²	PRESS
	0,9898	1,7124	0,9896	16,77

Tabla 13. Resultados con datos transformados de calibración y validación del contenido de NaCl en lomo de cerdo a partir de valores de espectroscopía de impedancia. R²: coeficiente de determinación; PRESS: Suma cuadrática de los residuos.

El siguiente gráfico (Figura 83) recoge los valores de cloruro sódico predichos frente a los determinados analíticamente de las muestras integrantes del conjunto de validación. Tras la transformación logarítmica de la variable dependiente se pone de manifiesto que la dispersión de los datos con respecto a la recta de referencia es menor.

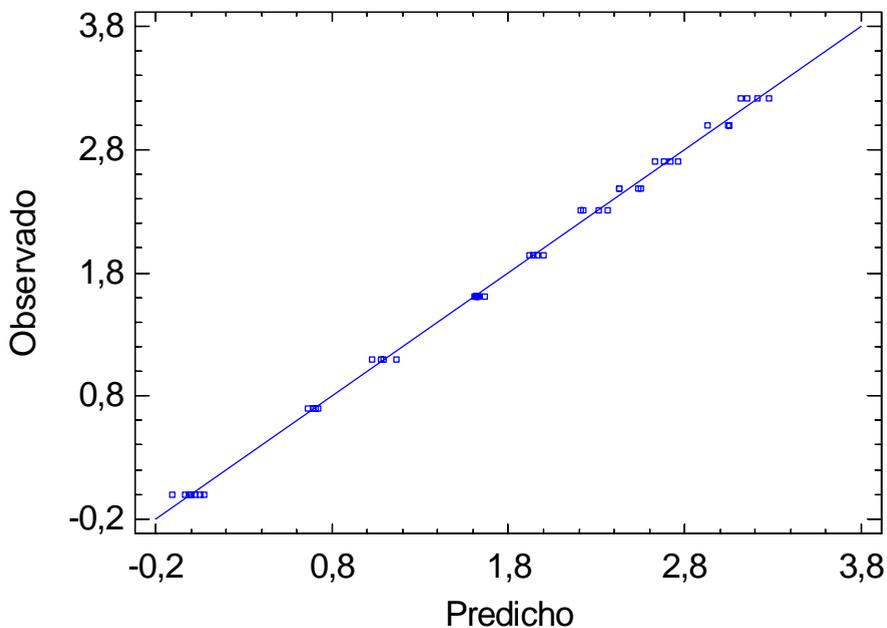


Figura 83. Representación gráfica del contenido de NaCl del grupo de calibración transformado logarítmicamente (valores determinados vs. valores modelo predictivo) de lomo de cerdo respecto a la línea de referencia.

Como se observa en Figura 84 la pendiente de la recta derivada del ajuste lineal de los datos se aproxima más a la unidad (0,9749) y la ordenada en el origen es prácticamente nula (-0,0432).

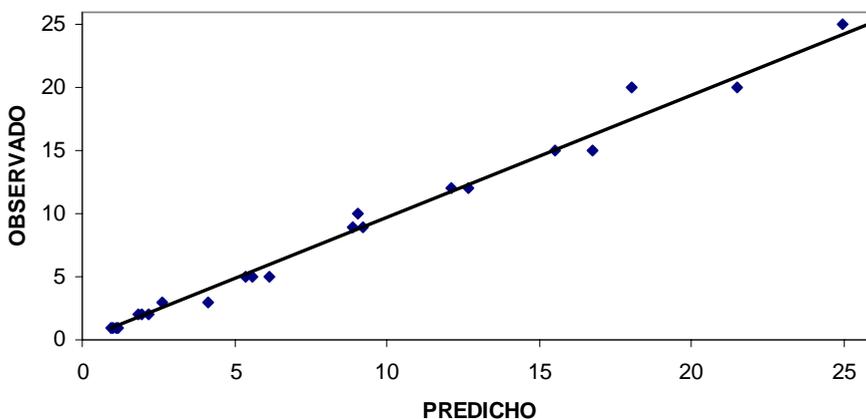


Figura 84. Representación gráfica del contenido de NaCl del grupo de validación transformado logarítmicamente (valores determinados vs. valores modelo predictivo) con $R^2 = 0,9896$.

Caracterización de la humedad

También se determinó el contenido en humedad de cada muestra de carne picada. Tras el análisis de la varianza con ANOVA el P-valor indicado fue inferior a 0,05. Por tanto puede afirmarse con un nivel de confianza del 95% que existe una relación estadísticamente significativa entre el porcentaje de cloruro sódico y el porcentaje de humedad de una misma muestra.

Se ha practicado un ajuste lineal de los datos obtenidos del porcentaje de humedad y el contenido de sal de las muestras de lomo de cerdo, con objeto de estimar la estrecha relación existente entre ambos parámetros. La ecuación de la recta ajustada y su representación gráfica (Figura 85) pueden apreciarse a continuación.

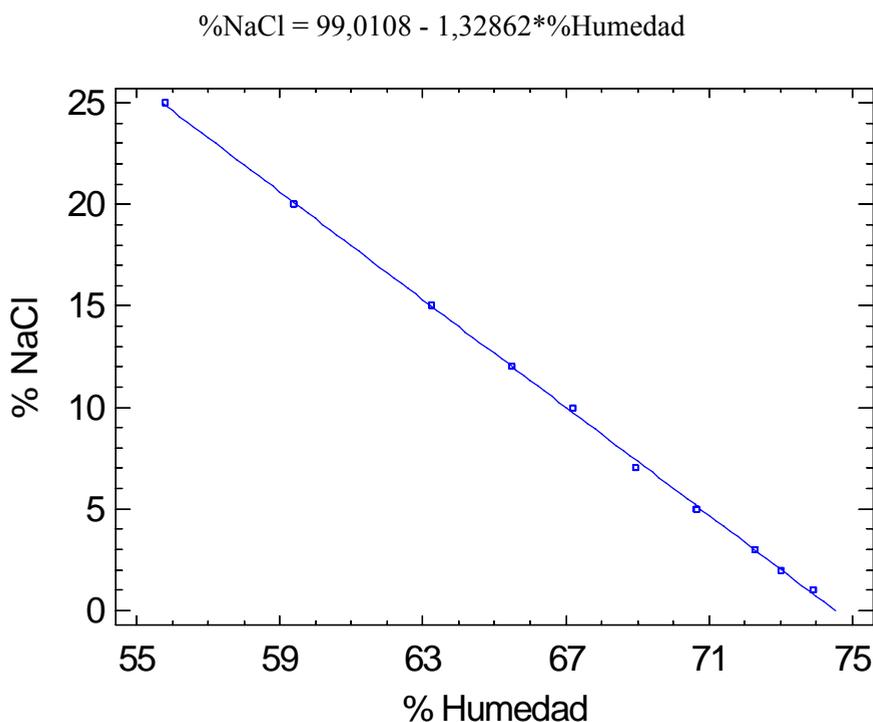


Figura 85. Ajuste lineal de los datos de NaCl y humedad.

Para el ajuste lineal se ha empleado el método de mínimos cuadrados. Las propiedades de la regresión lineal miden su calidad. El coeficiente de correlación obtenido ($r = -0.99976$) demuestra la existencia de una fuerte

asociación lineal entre la concentración de sal y el contenido de humedad. Así mismo, el coeficiente de determinación alcanzado indica que el modelo ajustado es capaz de explicar el 99,94% de la variabilidad de los datos de concentración de cloruro sódico ($R^2 = 99,943\%$). Por último, el error estándar de estimación ($S = 0,1822$) demuestra la escasa dispersión alrededor de la línea de regresión.

Dada la elevada correlación lineal existente entre la concentración de cloruro sódico y el contenido de humedad no se ha considerado necesario realizar el análisis estadístico de los datos mediante PLS. Asumimos por tanto que hubiera mantenido el mismo nivel de excelencia exhibido en el estudio de la predicción del contenido de sal.

1.4. Conclusiones

Las medidas de contenido de sal en productos procesados continúa siendo un problema a resolver en la industria alimentaria debido a la naturaleza destructiva de los métodos convencionales de medida. En esta tesis se desarrolla un método para evaluar el contenido de sal de ciertos productos alimenticios (salmueras y carne de cerdo picada) utilizando espectroscopía de impedancia. El Equipo Electrónico de Medida diseñado permite llevar a cabo medidas puntuales de espectroscopía de impedancia en las diferentes muestras de forma no destructiva, empleando para ello el *electrodo de aguja*.

Con el objetivo de comprobar la capacidad del prototipo implementado para cuantificar el porcentaje de sal de las muestras se realizó un estudio previo con disoluciones de varias concentraciones de cloruro sódico. Los valores de módulo y fase de la impedancia para cada frecuencia se trataron estadísticamente empleando el procedimiento de regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS). Se ha alcanzado una magnífica correlación entre los datos estimados con el modelo predictivo y los determinados analíticamente. Se siguió un procedimiento similar para determinar la concentración de cloruro sódico presente en muestras de carne picada. También se logró una excelente correlación. La herramienta PLS generó un modelo que permitió predecir niveles de de sal en nuevas muestras de carne.

Una consideración importante a tener en cuenta en futuros estudios es la evidente mejoría experimentada por el modelo predictivo al llevar a cabo la transformación logarítmica de la variable dependiente.

Así mismo, el sistema de medida desarrollado posee una capacidad de discriminación elevada incluso a altas concentraciones de cloruro sódico (20-25% NaCl). Dado que las investigaciones previas no pudieron discernir niveles de cloruro sódico superiores al 7%, esta facultad selectiva supone una aportación importante en este campo.

Por último, se ha demostrado la existencia de una fuerte asociación lineal entre el porcentaje de cloruro sódico y el porcentaje de humedad de una misma muestra.

Los buenos resultados obtenidos permiten consolidar la idea de desarrollar instrumentación portátil, de bajo coste y fácil de manejar para determinar el contenido de sal. En la actualidad, continuando con esta línea de trabajo, nuestro equipo de investigación está aplicando este mismo procedimiento de medida de sal en una amplia gama de productos alimenticios.

2. Determinación de parámetros fisicoquímicos en muestras de lomo de cerdo durante el proceso de curado

El curado es un método de preservación de productos alimenticios que combina las técnicas de salado y secado. El proceso de salado tiene como objetivo disminuir la actividad de agua a niveles que garanticen la estabilidad del alimento perecedero empleando la sal como agente reductor. Ello permite ralentizar e incluso interrumpir la actividad de ciertos microorganismos. No obstante por sí solo no garantiza un adecuado nivel de protección en productos de consumo directo. El secado es la técnica de conservación complementaria necesaria para inhibir totalmente el crecimiento microbiano [126].

El salado es una etapa crucial en el proceso de curado. Aunque es fundamental su acción bacteriostática inicial, también es un factor determinante tanto en el desarrollo posterior del proceso, condicionando especialmente la fase de secado,

como en la consecución de las propiedades organolépticas características del producto final. Su importante repercusión en el control del proceso y en la calidad final justifica un examen detallado.

Para garantizar una correcta salazón hay que poder contestar a dos cuestiones clave. La primera es saber cuál es la cantidad de sal que se debe aportar para que pueda penetrar en todos los puntos del producto en un tiempo conocido. La segunda es determinar cuál es ese tiempo [127].

El estudio pretende, mediante el análisis de la evolución de ciertas magnitudes físicas que intervienen en el proceso tradicional de curado, establecer los parámetros de control necesarios para su optimización y estandarización.

Profundizando en los fenómenos de difusión de sal y agua se sugiere una modelización, capaz de estimar el “grado de curado” de la materia prima en función de una variable de medida rápida, sencilla, automática y no destructiva: la concentración de cloruro sódico disuelta en agua.

Para que este modelo pueda considerarse una herramienta útil para la predicción del estado de maduración de la materia prima es necesario justificar que existe una correlación significativa entre la evolución experimentada por la concentración de sal a lo largo del proceso y su curado.

El mecanismo de transferencia de materia desencadenado durante el proceso de salado provoca la pérdida de agua del alimento por efecto del fenómeno osmótico y el posterior flujo de agua desde el interior del alimento (zona de baja concentración de sal) al exterior (zona de alta concentración de sal). Paralelamente se produce un flujo de entrada del soluto en el alimento, para compensar la baja concentración existente en su interior.

La velocidad de penetración de la sal disminuye conforme se alcanza el equilibrio en las concentraciones salinas exterior e interior. Esta difusión pasiva puede verse afectada por factores externos (humedad y temperatura del secadero, granulometría de la sal) e internos (pH, humedad, contenido de grasa interna, etc.) [126].

Un parámetro crítico en el curado, especialmente en las primeras etapas del proceso es la actividad de agua. Es el factor que determina la capacidad de

crecimiento de los microorganismos responsables de la alteración y el que más contribuye a la estabilidad del producto final.

La relación entre la actividad de agua y la concentración de solutos viene dada por la ley de Raoult. Si bien esta correspondencia se formuló para disoluciones ideales, es también válida para disoluciones reales siempre y cuando se controlen ciertos parámetros [128].

En los procesos de salado y post-salado de productos cárnicos los valores de actividad de agua van ligados a la concentración de sal. En estas etapas la concentración de solutos de la fase líquida está formada en gran parte por la sal que contiene el lomo al final de la fase de salado, es decir, la concentración de sal alcanzada, guardando una correlación inversamente proporcional [129].

Si bien existe una relación directa entre la concentración de sal en la fase líquida (Z_{NaCl}) y los valores de actividad de agua (a_w), a medida que avanza el proceso de curado se altera esta proporcionalidad. Al aumentar la deshidratación se potencia la interacción del agua con la matriz proteica, actuando como un factor reductor. Esto explica la desviación de los valores de actividad de agua observada en las últimas etapas del curado (secado y maduración) con respecto a la disolución ideal (Figura 86) [124].

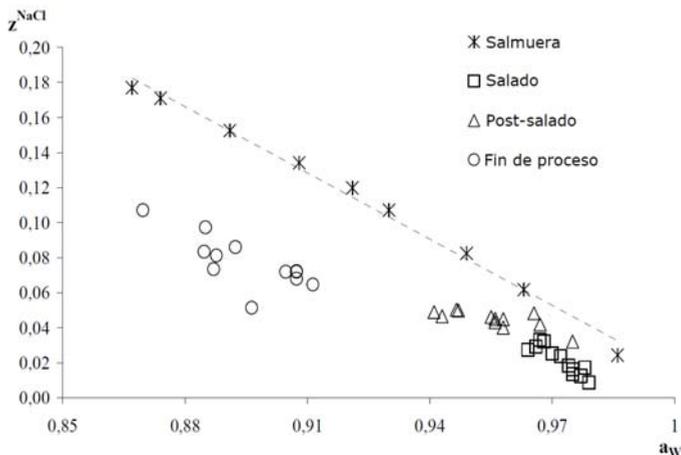


Figura 86. Relación lineal entre los valores de actividad de agua (a_w) y la concentración de NaCl en la fase líquida (Z_{NaCl}), en jamón curado durante el proceso de elaboración [126].

2.1. *Material y métodos*

Preparación de las muestras

En el estudio se emplearon doce piezas de lomo de cerdo fresco con un peso promedio de 1.307 ± 118 g. Para la caracterización de la materia prima se reservaron tres unidades, determinando en todas ellas los siguientes parámetros fisicoquímicos por triplicado: contenido en humedad, proteína y grasa, actividad de agua (a_w) y pH. Las otras nueve piezas de lomo se dividieron en tres lotes y se sometieron a un proceso de salado y posterior curado.

Cada lote fue salado añadiendo una cantidad de sal calculada previamente, de manera que al finalizar el proceso de curado se obtuviera una concentración de cloruro sódico concreta. Los valores objetivo, que se establecieron a partir de los resultados extraídos en estudios precedentes [130], fueron 1,8; 2,8 y 3,7 g NaCl / 100 g de lomo (0,002; 0,003 y 0,004 g NaCl / g de lomo).

Se llevó a cabo un salado en seco por frotación con una mezcla de cloruro sódico (NaCl) y un 3% de agentes de curado, concretamente 150 ppm de nitrato potásico (KNO_3) y 150 ppm nitrito sódico ($NaNO_2$) [131]. Se acordó esta proporcionalidad para garantizar que el nivel de nitritos en producto terminado fuera inferior al máximo legal, fijado en 250 ppm.

Tras la frotación de los lomos de cerdo con la mezcla de sales, se dejaron reposar con la salazón durante dos horas a 3 °C y una humedad relativa del 73%. Transcurrido este tiempo las cuatro piezas se envasaron al vacío y se mantuvieron en refrigeración a 4 °C durante siete días. Posteriormente se embutieron en tripa de colágeno y permanecieron tres días más conservados a 4 °C. Con ello concluyó el proceso de post-salado. Los lomos de cerdo pasaron a una cámara de secado a una temperatura de 4 °C y humedad relativa del 73%, manteniéndose en estas condiciones de conservación durante treinta y dos días.

Durante la etapa de secado se realizó un muestreo periódico a los 0, 4, 8, 18, 23 y 32 días, con el objetivo de monitorizar la evolución del contenido en sal, humedad, a_w y pH de las piezas, así como estudiar los cambios en los valores de impedancia de cada una.

Para la toma de muestras se realizó un corte transversal en cada lote de aproximadamente 2 cm de espesor. Cada sección se dividió a su vez en dos muestras de dimensiones 20 x 20 x 60 mm cada una. La codificación de las muestras obtenidas en cada sección se realizó según su proximidad a la capa de grasa subcutánea presente en el lomo. Así, como puede apreciarse en la Figura 87, se denominó zona “g” a aquella porción de la sección transversal de carne más próxima a la capa de grasa y zona “m” a la más alejada.

Autores como Fuentes *et al.* [132] han descrito que la grasa ejerce de barrera a la penetración de sal y la pérdida de humedad durante los procesos de salado. La diferenciación en los cortes transversales, basada exclusivamente en la ubicación de la muestra respecto a la capa grasa del lomo, pretendía detectar si existían variaciones en el comportamiento de dichas zonas durante el proceso de salado y curado.

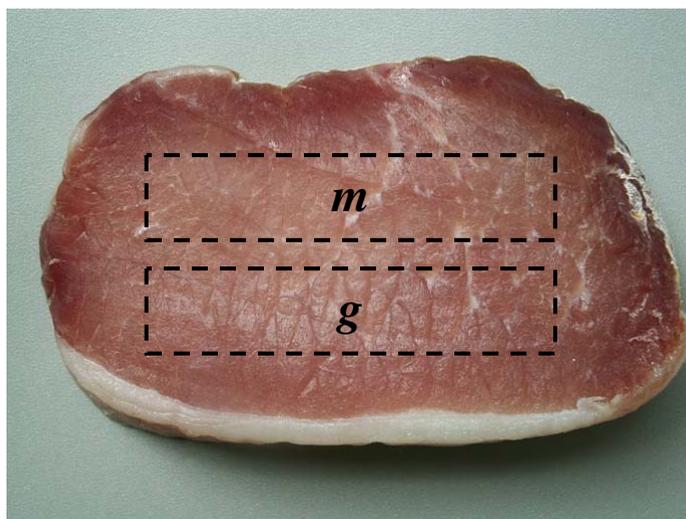


Figura 87. Zonas de medida de las lonchas.

Determinaciones analíticas

Para determinar el contenido en humedad se recurrió al procedimiento de secado en estufa a 102 ± 2 °C hasta alcanzar peso constante (Norma ISO R-1442, 1979).

El contenido en grasa se obtuvo mediante extracción con disolvente (éter de petróleo) según el método ISO R-1443 (1973), utilizando un analizador semiautomático SoxtecTM 2055 (FOSS Ltd., Warrington, UK).

Para la determinación del contenido en cloruro sódico de las muestras de lomo se homogeneizaron 2 g de la muestra triturada en agua destilada, empleando un homogeneizador Ultra-turrax T-25 (IKA-Labortechnik, Staufen, Alemania). La disolución obtenida se enrasó hasta un volumen de 100 ml y se centrifugó a 2.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido se filtró y se tomó una alícuota de 500 μ l de este filtrado para su valoración en el analizador automático de cloruros Sherwood mod. 926 (Sherwood Scientific Ltd., Cambridge, UK).

La actividad de agua (a_w) se valoró con un higrómetro de punto de rocío (GBX scientific FA-st/lab, Cédex, Francia).

Para determinar el pH de las disoluciones saturadas de sal formadas durante el salado se empleó un multímetro MM40 (CRISON, Barcelona, España).

El pH de los lomos de cerdo se estimó mediante un pH-metro digital Basic 20+ (CRISON, Barcelona, España) con un electrodo de punción (52 31) con cuerpo de acero inoxidable recomendado para las medidas realizadas en muestras semi-sólidas. La medida de pH se realizó directamente en 6 puntos diferentes de cada muestra.

Medidas de impedancia

Para determinar la concentración de sal alcanzada en cada punto de muestreo se empleó el sistema de medida de espectroscopía de impedancia implementado en esta tesis. Se tomaron seis lecturas de impedancia por cada zona de ensayo.

En los plazos definidos los lomos se retiraron del refrigerador y se colocaron sobre una base helada, lo que permitió realizar las mediciones de la impedancia a una temperatura constante. Los registros de temperatura tomados en el centro de las muestras con una sonda de temperatura no muestran variaciones superiores a $\pm 1,5$ °C.

En la Figura 88 se puede ver la configuración o setup del instrumental para la medida y registro de los valores de la impedancia de muestras de lomo.

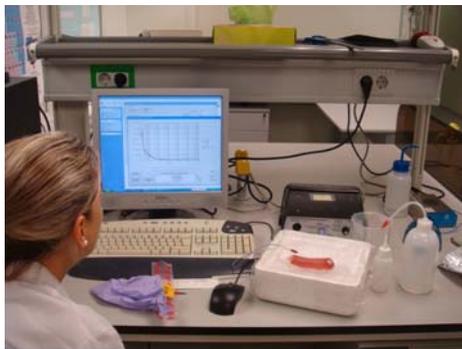


Figura 88. Setup de la medición de la impedancia de lomo.

Electrodos

Con el fin de probar la efectividad y sensibilidad se decidió realizar el estudio con los tres electrodos: aguja, punta de flecha y electrodo doble (Figura 89).

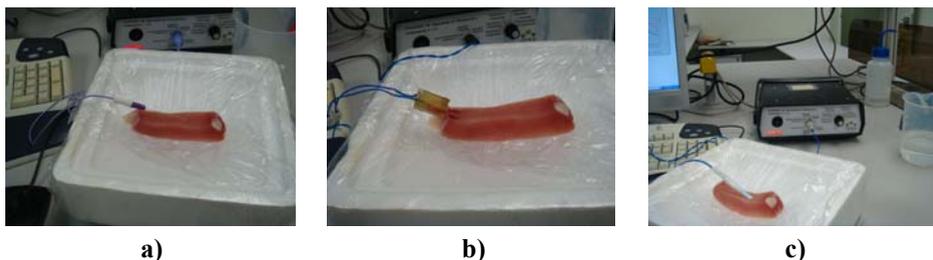


Figura 89. Los tres electrodos insertados en muestras de lomo. *Aguja a), Electrodo doble b), Punta de flecha c).*

2.2. Resultados y discusión

Las determinaciones analíticas demostraron que se produce un incremento en el contenido de sal de las muestras a medida que avanza el estudio. Sin embargo las determinaciones analíticas constataron que no existieron variaciones

significativas en los parámetros fisicoquímicos considerados al comparar la zona “g” y “m”.

Al igual que en el trabajo previo, se recurrió a una técnica de modelos de ecuaciones estructurales basada en la varianza, la PLS. Con esta herramienta estadística se interpretaron los datos de impedancia y se propuso un modelo predictivo capaz de estimar los parámetros fisicoquímicos analizados en función de la correlación existente entre ambas medidas. El algoritmo de calibración-validación que se aplicó fue el que se describe en el apartado 5.- Técnicas de análisis multivariante 5.4.1.- Aplicación de la técnica PLS página 46.

Para cada parámetro medido se obtuvieron tres modelos diferentes, uno por cada tipo de electrodo.

2.2.1. Modelos para el electrodo de aguja

En la Tabla 14 se muestran el coeficiente de determinación de la calibración y de la validación de los modelos generados para cada fisicoquímico. También se muestra el número de variables latentes necesarios para alcanzar dicho parámetro.

	Set de calibración		Set de validación	Número de factores
	Modelo	Leave-one-out		
Z^{NaCl}	93,6	81,5	88,0	6
a_w	96,9	90,8	87,8	6
%NaCl	94,9	87,3	87,3	6
X_w	99,3	87,4	80,4	9
pH	98,4	67,1	65,8	10

Tabla 14. Coeficientes de determinación (R^2) de los fisicoquímicos para el *electrodo de aguja*.

En la Figura 90 y Figura 91 se visualizan el resultado de la validación de la concentración de agua y la actividad de agua cuando se aplica el modelo generado sobre nuevas muestras.

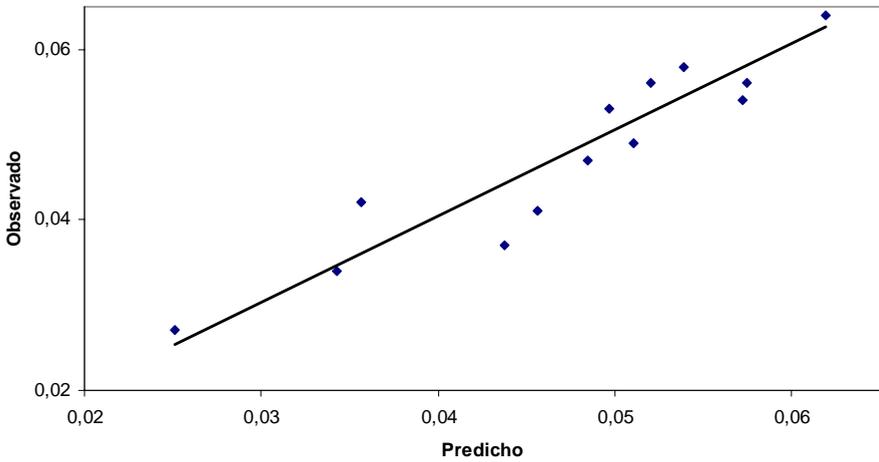


Figura 90. Validación del modelo de la concentración de sal disuelta en agua z^{NaCl} con coeficiente de determinación $R^2 = 88,0$.

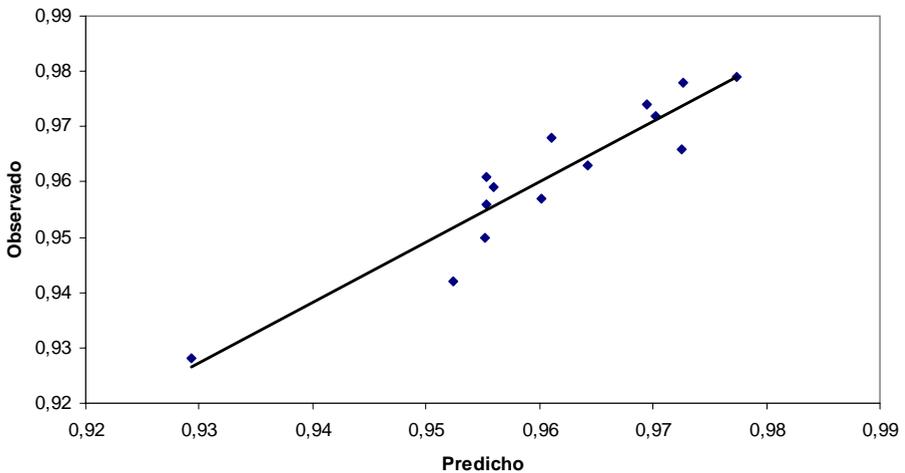


Figura 91. Validación del modelo de la actividad de agua a_w con coeficiente de determinación $R^2 = 87,8$.

Se escogieron cuatro muestras cuyos valores de concentración de sal en la fase líquida del alimento (Z^{NaCl}) representaban la variabilidad obtenida en su determinación. Se seleccionaron por tanto el máximo, el mínimo y dos valores intermedios, para poder abarcar todo el rango de datos.

Se ha representado gráficamente el espectro de la fase de la impedancia de estas cuatro muestras con objeto de estudiar su comportamiento al someterse a un barrido de frecuencias.

La Figura 92 muestra la curva de evolución de la fase de la impedancia de las cuatro muestras de lomo de cerdo sometidas a examen.

Como puede observarse, para frecuencias situadas por debajo de 1kHz el valor de la fase es constante y por tanto independiente de éstas. A partir de 1 kHz los valores de la fase de la impedancia se reducen conforme se incrementa la frecuencia.

Así mismo se aprecia un cambio de tendencia en la muestra de valor Z^{NaCl} 0,016 entorno a la frecuencia de 100 kHz y se intuye una disposición similar en el resto de las muestras para frecuencias superiores a 1 MHz.

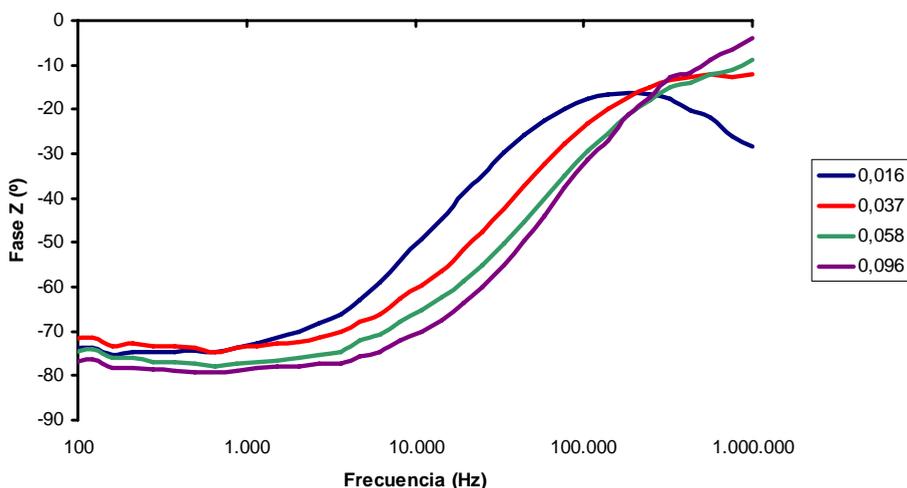


Figura 92. Espectro de la fase de la impedancia de las muestras con distintos valores de Z^{NaCl} para valores de frecuencia entre 100Hz y 1MHz.

La Figura 93 muestra la curva de evolución del módulo de la impedancia de las cuatro muestras con distintos valores de Z^{NaCl} en función de la frecuencia.

No se ha representado el intervalo de frecuencia situado entre 1Hz y 10kHz, puesto que en este rango todas las curvas estaban superpuestas y no era posible

diferenciar unas de otras. Por tanto no podía extraerse información relevante de ellas.

A frecuencias superiores a los 10kHz el módulo de la impedancia discrimina los diferentes valores de Z^{NaCl} . En la gráfica puede observarse cómo el módulo de la impedancia decrece con el aumento de la frecuencia.

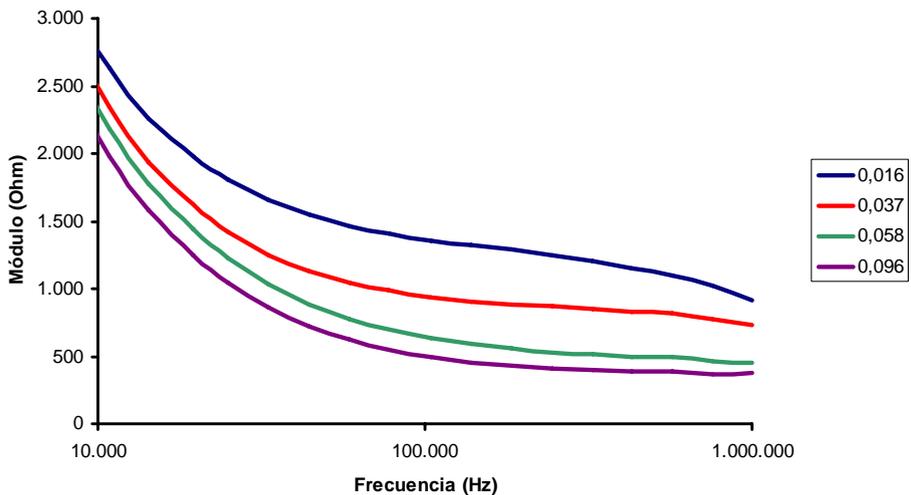


Figura 93. Espectro del módulo de la impedancia de las muestras con distintos valores de Z^{NaCl} para valores de frecuencia entre 10kHz y 1MHz.

Se llevó a cabo un análisis idéntico al anterior, estudiando en este caso el comportamiento experimentado por la fase y el módulo de la impedancia de cuatro muestras representativas de la variabilidad de la actividad de agua al someterlas a un barrido de frecuencias (Figura 94 y Figura 95).

Hay una gran similitud tanto en las representaciones gráficas obtenidas como la interpretación derivada de las mismas.

Ello corrobora la relación directa existente entre los valores de actividad de agua (a_w) y de concentración de sal en la fase líquida del alimento (Z^{NaCl}) mencionada anteriormente en este capítulo.

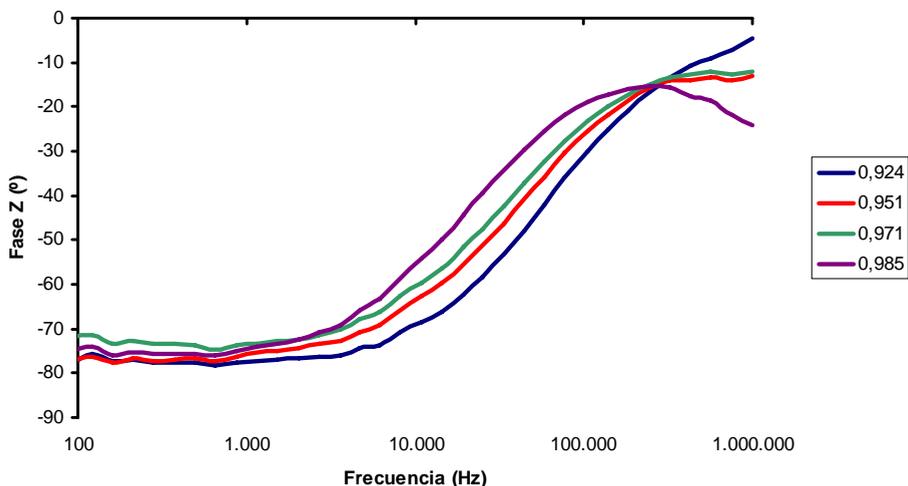


Figura 94. Espectro de la fase de la impedancia de las muestras con distintos valores de a_w para valores de frecuencia entre 100Hz y 1MHz.

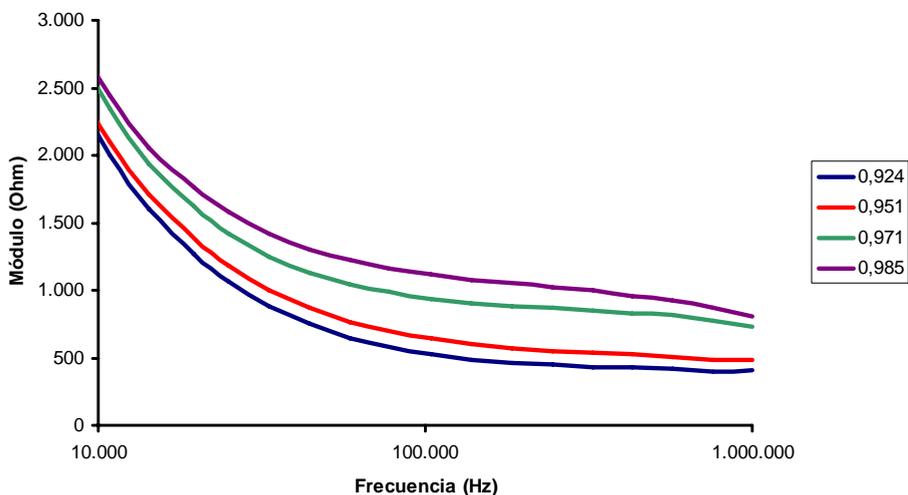


Figura 95. Espectro del módulo de la impedancia de las muestras con distintos valores de Z^{NaCl} para valores de frecuencia entre 10kHz y 1MHz.

Se han representado los valores obtenidos para la fracción másica de sal en la fase líquida del producto (Z^{NaCl}) frente a sus correspondientes valores de a_w (Figura 96).

La relación existente entre ambos parámetros (cuyo ajuste lineal arroja un coeficiente de determinación de 0,94) explica las similitudes observadas anteriormente en los valores de fase y módulo de la impedancia (Figura 96).

Se han superpuesto en esta misma gráfica, que enfrenta los valores de a_w y Z^{NaCl} , los datos experimentales correspondientes al lomo de cerdo y los relativos a una solución ideal (valores de actividad de agua de una salmuera a 25 °C), apreciándose un notable ajuste entre ambos, lo que confirma la estrecha vinculación de estos parámetros físico-químicos y la equivalencia de sus valores en los procesos de secado y salado.

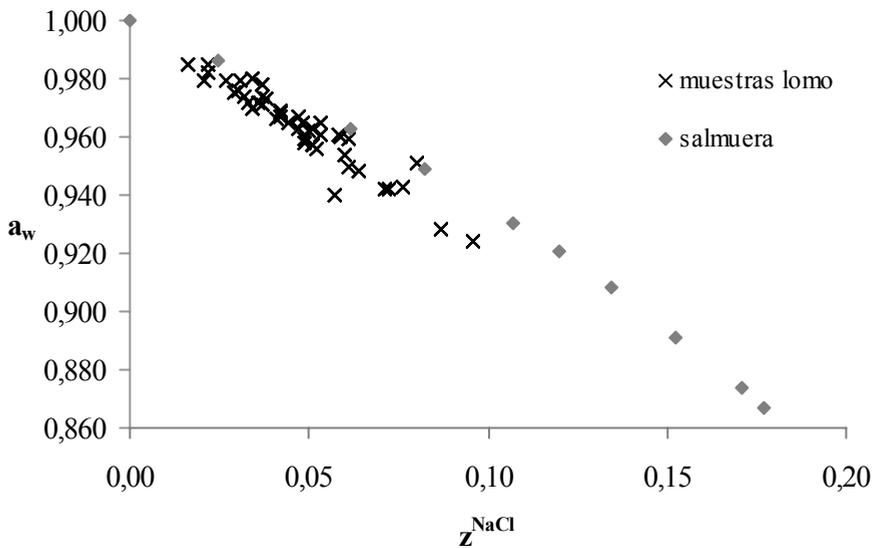


Figura 96. Valores de concentración de sal en la fase líquida del alimento (Z^{NaCl}) frente a los valores de a_w

2.2.2. Modelos para el electrodo doble

En la Tabla 15 se muestran el coeficiente de determinación de la calibración y de la validación de los modelos generados para cada fisicoquímico. También se muestra el número de variables latentes necesarios para alcanzar dicho parámetro.

	Set de calibración		Set de validación	Número de factores
	Modelo	Leave-one-out		
Z^{NaCl}	94,4	87,8	84,3	5
a_w	99,3	91,9	81,9	10
%NaCl	91,0	82,6	83,9	5
X_w	60,7	53,6	32,4	1
pH	85,3	52,3	52,6	6

Tabla 15. Coeficientes de determinación (R^2) de los fisicoquímicos para el *electrodo doble*.

2.2.3. Modelos para el electrodo punta de flecha

En la Tabla 16 se muestran el coeficiente de determinación de la calibración y de la validación de los modelos generados para cada fisicoquímico. También se muestra el número de variables latentes necesarios para alcanzar dicho parámetro.

	Set de calibración		Set de validación	Número de factores
	Modelo	Leave-one-out		
Z^{NaCl}	84,8	72,5	86,0	4
a_w	99,8	87,1	90,7	10
%NaCl	96,4	71,9	83,7	8
X_w	79,3	68,5	68,6	4
pH	98,2	59,2	58,1	10

Tabla 16. Coeficientes de determinación (R^2) de los fisicoquímicos para el *electrodo punta de flecha*.

2.2.4. *Discusión de los resultados*

Se aprecia una buena correlación en todos modelos generados para predecir la actividad de agua (a_w), la concentración de sal en la fase líquida (Z^{NaCl}) y la concentración de sal (%NaCl). El hecho de que los tres parámetros considerados tengan un efecto directo sobre la conductividad y por tanto sobre la impedancia de las muestras, favorece la obtención de estimaciones correctas.

También se observa claramente que ninguno de los modelos generados es útil para predecir el pH. Aunque los coeficientes de determinación de la calibración (R^2 del modelo predictivo) son elevados, éstos decrecen considerablemente en la validación (aplicación del modelo a las muestras restantes). Esta variación es debida al fenómeno de *sobreajuste*, un problema intrínseco a la técnica PLS que tiene lugar si el número de variables latentes o factores es elevado. El modelo generado tiende a ajustarse a las muestras que sirvieron para construir dicho modelo, pero falla en la predicción de nuevas muestras.

Otra consideración a tener en cuenta es que aparentemente el modelo de predicción de concentración de agua o humedad (X_w) del electrodo de aguja obtiene un valor de R^2 aceptable mientras que para los otros dos electrodos el valor de R^2 es considerablemente más bajo. Esto es debido a la desvirtuación de la lectura de la impedancia que provoca tanto el *electrodo de punta de flecha* como con el *electrodo doble* como consecuencia de su sistema de determinación.

En el *electrodo de aguja* se realiza una medida puntual. Si la punción tiene lugar en una zona inadecuada, donde no existe un contacto total entre el perímetro de la aguja y la muestra (estructuras porosas o discontinuas) o donde el tejido muscular esté deteriorado (grasa, cartílago, etc.), la lectura de impedancia será extremadamente diferente a la tomada en una zona adecuada. Esta enorme dispersión garantiza su descarte en la fase de depuración de datos (outliers). Sin embargo las medidas no puntuales realizadas con los otros electrodos dificultan esta selección, al poder verse involucradas en la trayectoria de medida tanto zonas aptas como deterioradas. Las lecturas de impedancia en este caso no muestran una clara franja de discriminación y sí una elevada dispersión, obteniendo como consecuencia ajustes menos precisos.

De forma global los resultados obtenidos con el electrodo de aguja son positivos, superando ligeramente a los otros dos y ofreciendo un buen

comportamiento. En la Figura 97 puede verse una comparativa de los coeficientes de determinación de los tres electrodos.

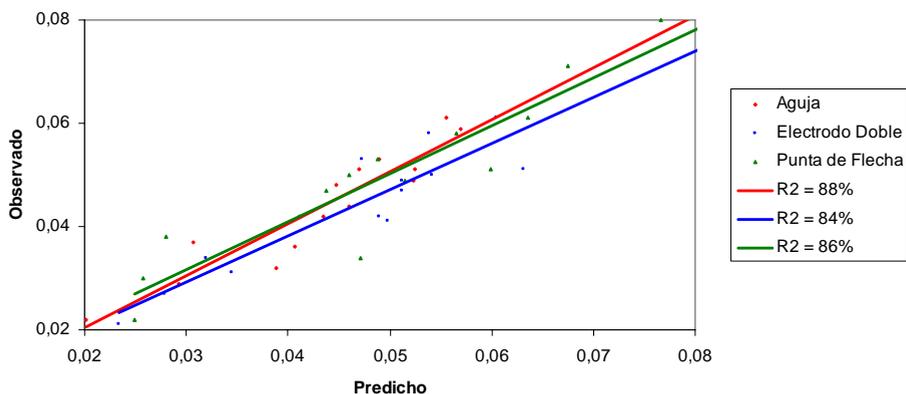


Figura 97. Comparativa de los R^2 de los tres electrodos en la validación del fisicoquímico Z^{NaCl} .

2.3. Conclusiones

Se sometieron a un proceso de curado nueve piezas de lomo llevándose a cabo técnicas de salado, post-salado y secado. Durante la etapa de secado se realizó un muestreo periódico con el objetivo de monitorizar la evolución del contenido en sal y humedad de las piezas, así como estudiar los cambios en los valores de impedancia de cada una.

Con el objetivo de crear modelos predictivos se aplicó la técnica multivariante PLS para correlacionar los datos de impedancia con los valores de los parámetros fisicoquímicos.

En el estudio se utilizaron tres electrodos de tipología diferente para comparar la efectividad y sensibilidad de cada uno de ellos. Por tanto para cada parámetro fisicoquímico se obtuvieron tres modelos, uno por cada tipo de electrodo.

Como resultado del estudio estadístico se concluye que el sistema de medida propuesto en esta tesis es capaz de crear modelos que permiten la predicción de

la actividad de agua (a_w), la concentración de sal en la fase líquida (Z^{NaCl}) y la concentración de sal (%NaCl).

Los valores de los coeficientes de determinación obtenidos en el lomo curado son inferiores a los conseguidos con la carne picada y salmueras. Las diferencias en los niveles de ajuste de los modelos predictivos se deben a:

- Esta experiencia se ha realizado sobre muestras reales y no sobre muestras homogeneizadas. Dado que la sal ha ido penetrando de forma no uniforme, las muestras presentan una mayor dispersión en las medidas de impedancia.
- El rango de variabilidad del contenido en sal no ha sido tan amplio como en la carne picada o salmueras, lo que puede aumentar el error relativo de las medidas.

Los mejores resultados se obtuvieron con el electrodo de aguja, que ofreció un buen comportamiento y superó ligeramente los valores de los otros dos, en especial en la determinación de la humedad.

Capítulo 3. Aplicación a otros productos de la industria alimentaria

1. Estudio del contenido en humedad y sal en queso

El queso es un alimento universal. Está considerado como uno de los principales productos alimentarios. Según la FAO, en 2004 la producción total superó los 18 millones de toneladas. A nivel mundial la Unión Europea, Estados Unidos, Brasil, Australia y Canadá concentran casi el 90% del mercado [133]. Por países, Estados Unidos lidera la producción mundial (con un 30% del volumen total), seguido de Alemania y Francia [134].

El mayor exportador en valor monetario es Francia, seguido de Alemania, que es líder en volumen exportado. A pesar de ser Francia el mayor exportador, tan solo un 30% sale de sus fronteras, el resto se dedica al mercado interno. El nivel de exportación de Estados Unidos, el máximo productor mundial, es despreciable.

Grecia ocupa el primer puesto del ranking mundial de consumo, con una media de 27,3 kg por habitante y año, seguido por Francia (24 kg/persona) e Italia, (22,9 kg/persona). En Estados Unidos el consumo se está incrementando rápidamente. Aunque en España también se ha producido un crecimiento considerable, hasta llegar a los 9 kilos por persona y año en la actualidad, es todavía muy inferior al nivel medio de la Unión Europea, situado en 17 kg/persona.

El sector quesero español se caracteriza por una gran variedad productiva. A pesar de situarse muy por debajo de otros países europeos en volumen productivo (4% del total europeo), ocupa el segundo lugar, después de Francia, en diversidad de producto [133].

La producción nacional de quesos ha experimentado desde el año 2000 un pequeño pero continuo crecimiento. Una evolución significativa en comparación con la tendencia estacionaria del resto de países de la Unión Europea [135].

El queso es el producto que resulta de la coagulación (ácida, enzimática o mixta) de la leche cruda o pasteurizada, y que posteriormente suele someterse a maduración [136].

Su riqueza nutricional radica, no sólo en el elevado contenido en proteína y grasa, sino también en la alta aportación de elementos minerales, principalmente calcio y fósforo [137].

De acuerdo con la FAO/OMS: y la Norma de Calidad para Quesos elaborados en España “es el producto fresco o madurado obtenido por la coagulación y separación del suero de la leche, nata, leche parcialmente desnatada, mazada o por una mezcla de estos productos” [138].

Las características nutricionales y tecnológicas del queso vienen determinadas por la composición de la leche de origen y el proceso de elaboración [139][140].

El aspecto mas importante que define el queso es el tipo de leche utilizada en su producción. En España, dependiendo de la zona, la época del año, el clima, o la tradición, se fabrican quesos con leche de vaca, cabra, oveja o mezclas diversas de dos o de los tres tipos de leche.

Más del 50% del queso producido y consumido en España proviene de la mezcla de las tres. Dependiendo del porcentaje de cada tipo de leche incorporado en la mezcla se obtienen quesos con diferente sabor, textura, cuerpo y cremosidad.

La transformación de la leche en queso consta de fundamentalmente de dos procesos: la obtención de la cuajada y su maduración [140].

En la etapa de maduración se producen importantes modificaciones en el producto de carácter microbiológico, bioquímico y físico-químico, que permiten desarrollar las cualidades organolépticas características del queso [139].

La textura clásica del queso es consecuencia de las reacciones primarias de hidrólisis (glicólisis, lipólisis y proteólisis) de los principales componentes de la leche: lactosa, triglicéridos y proteínas [141]. Las transformaciones posteriores de los productos finales de estas reacciones primarias generan los compuestos responsables de su aroma y sabor típicos [141].

A lo largo de la maduración, el queso va perdiendo progresivamente humedad, disminuyendo su peso e incrementándose su extracto seco. Las variables que más influencia tienen en esta etapa, denominada también “afinado”, son la temperatura, la aireación, la humedad, el contenido en sal y el pH [140].

El periodo de maduración puede comprender desde una o dos semanas (quesos blandos con un alto contenido en agua) hasta más de un año (quesos duros) [140].

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la correlación de las lecturas de impedancia con los valores de humedad, sal y actividad de agua de diferentes quesos de mezcla, y por tanto, con su grado de maduración.

1.1. *Materiales y métodos*

Materia prima

Para la realización de este estudio se emplearon quesos de mezcla con diferentes grados de curado elaborados por Queserías Entrepinares S.A. (Valladolid, España) a partir de leche pasteurizada de vaca (mínimo 50%), oveja (mínimo 20%) y cabra (mínimo 15%). Los tiempos de maduración fueron de 7 días para el queso tierno, 35 días para el semicurado, 105 días para el curado y 180 días para el viejo.

Determinaciones físico-químicas

Para conocer la composición centesimal y valor nutricional de las muestras de queso se determinó el contenido en grasas, proteínas, hidratos de carbono y, calcio, empleando los procedimientos de ensayo descritos por la AOAC (1997) [142]. El valor energético de los productos analizados se estimó a partir de los factores de conversión de 4,27 kcal/g para proteína e hidratos de carbono y de 9,02 kcal/g para grasa [143].

Se analizó también el contenido en humedad [142], contenido en cloruro sódico, empleando un analizador automático de cloruros Sherwood mod. 926 (Sherwood Scientific Ltd., Cambridge, U.K) y la actividad de agua (a_w) mediante un medidor automático de a_w (GBX scientific FA-st/1, Cédex, Francia).

Todas las determinaciones físico-químicas se realizaron por triplicado.

Rango de frecuencia y electrodo utilizado

Se realizaron lecturas de impedancia de las muestras en el rango de frecuencias comprendido entre 1Hz y 1MHz, empleando un electrodo de medida con la siguiente configuración: aguja concéntrica de acero inoxidable seccionada con un ángulo de 15°, longitud de 75 mm, diámetro interno 0.64 mm y área de penetración 0,07 mm² (Viasys healthcare Ltd., Wisconsin, USA.). La Figura 98 muestra la configuración del sistema de medida de impedancia y un detalle del electrodo de aguja insertado en una muestra de queso.

Se realizaron seis medidas de impedancia en cada muestra.



Figura 98. Setup del sistema y detalle del electrodo.

Análisis estadístico de los datos

Para cada uno de los quesos estudiados se consideraron tres lotes.

Los resultados obtenidos a partir de las determinaciones analíticas se analizaron estadísticamente mediante el programa Statgraphics Plus versión Centurion XV.

1.2. Resultados y discusión

1.2.1. Caracterización de las muestras

La composición centesimal y valor nutricional de los quesos analizados se muestra en la Tabla 17. Confirmando las expectativas, el contenido en proteínas y grasas y el valor energético fue más elevado cuanto mayor fue el tiempo de maduración de las muestras. Ello es consecuencia de la pérdida de humedad progresiva que experimenta el producto durante la maduración, que se traduce a su vez en un incremento de la proporción de cada macronutriente en el extracto seco.

Un comportamiento coherente con el expuesto previamente se deriva del análisis de los datos obtenidos del contenido en humedad de las muestras. Como cabía esperar el queso tierno fue la muestra con mayor contenido en humedad (39,2%) mientras que el queso viejo presentó los valores de humedad más bajos (26,3%) (Ver Tabla 18).

	Tierno	Semicurado	Curado	Viejo
Valor energético¹	393±6	404±12	419±4	433±13
Grasas²	33±1	34±2	35±3	37±8
Proteínas²	22±2	22±5	23±3	24±1
Hidratos carbono²	1,0±0,2	1,0±0,3	1,0±0,4	1,1±0,5
Calcio³	640±20	680±13	700±23	700±43

¹ Valor Energético (Kcal/100 g); ² g/100 g; ³ mg/100g

Tabla 17. Composición centesimal y valor nutricional de las muestras de queso

	Tierno	Semicurado	Curado	Viejo
Humedad¹	39,2±0,4	35,5±0,9	31,0±0,5	26,3±0,2
Sal²	1,83±0,04	1,70±0,06	1,79±0,09	2,51±0,03
Z^{NaCl}3	4,7±0,9	4,8±0,3	5,8±0,2	9,6±0,2
Actividad agua	0,956±0,005	0,945±0,001	0,933±0,001	0,905±0,001

¹humedad (g H₂O/100 g); ²g NaCl/100g producto; ³g NaCl/100g fase líquida

Tabla 18. Valores promedio de humedad, contenido Sal (NaCl), contenido de cloruro en la fase líquida (Z^{NaCl}) y actividad de agua (a_w) de las muestras de queso

Es razonable pensar que exista una evolución inversa respecto al contenido de sal de las muestras, alcanzando concentraciones de cloruro sódico más elevadas los quesos más curados. Aunque efectivamente esta fue la tendencia, tan sólo fueron significativamente diferentes ($p < 0,001$) los porcentajes de sal obtenidos en el queso viejo respecto a las tres muestras restantes.

Puede hacerse una interpretación similar a la anterior al analizar el contenido de sal presente en la fase líquida del queso, ya que crece considerablemente al aumentar el tiempo de maduración. En este caso no se apreciaron diferencias significativas entre el queso tierno y el semicurado. Sin embargo si fueron representativas las variaciones detectadas en los valores alcanzados por aquellas muestras y los correspondientes al queso curado y viejo. También fue reveladora la gran disparidad existente entre los valores de Z^{NaCl} de los dos quesos con mayores tiempos de curado.

La evolución que muestra la actividad de agua es coherente con la observada en el contenido de humedad y, dada la estrecha vinculación de ambos parámetros, sigue una pauta de comportamiento idéntica. Así, los valores de a_w van reduciéndose a medida que aumenta el tiempo de maduración de los quesos.

1.2.2. Medidas de impedancia

El estudio de impedancia mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) tanto en los valores de módulo como de fase para frecuencias superiores a 1000 Hz.

Las diferencias permitieron discriminar el grado de maduración de los quesos. En la Figura 99 y Figura 100 se muestran los valores de módulo y fase para el rango de frecuencias citado.

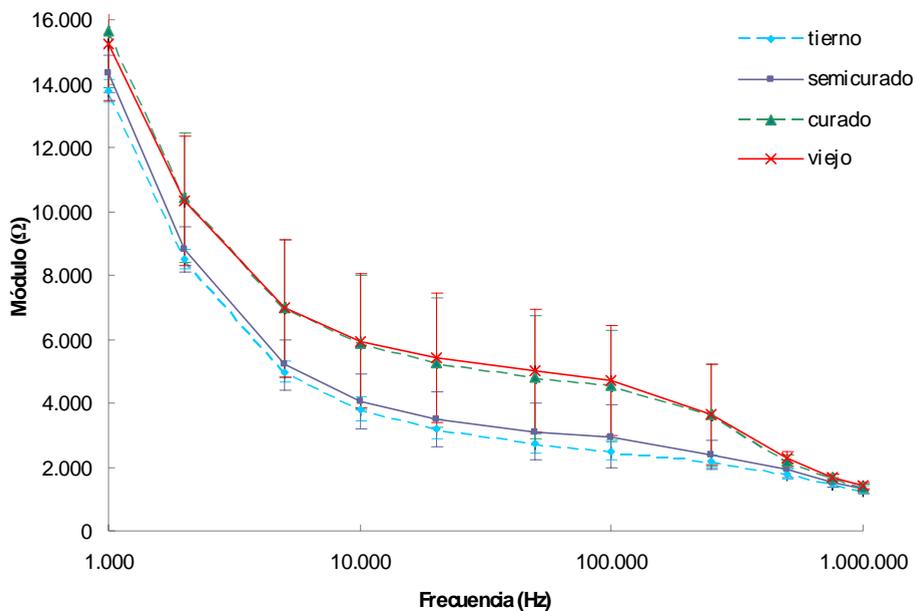


Figura 99. Valores del módulo de las muestras de queso

Con el objeto de evaluar si los valores de impedancia (módulo y fase) permiten diferenciar los diferentes tipos de queso, se realizó un análisis discriminante considerando como factor el tipo de queso (tierno, semicurado, curado y viejo) y tomando como variables los módulos y fases de las frecuencias comprendidas entre 1 kHz y 1 MHz. No se incluyeron en el análisis discriminante las lecturas de módulo y fase realizadas a frecuencias inferiores a 1 kHz, al haber mostrado los ANOVAs anteriores que éstos no tenían un efecto significativo sobre el tiempo de maduración.

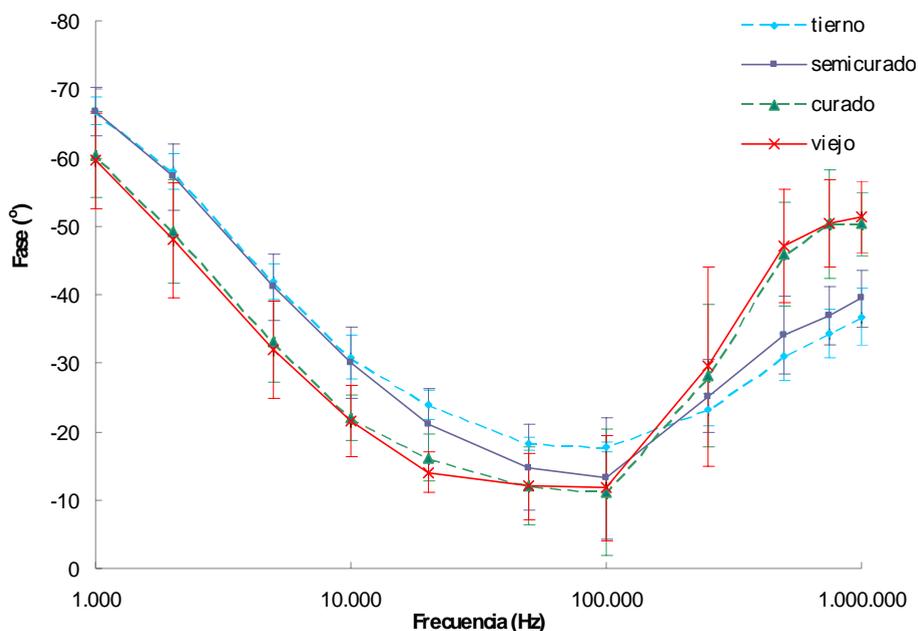


Figura 100. Valores de fase de las muestras de queso

El análisis realizado permitió obtener 3 funciones discriminantes. Con las dos primeras pudo explicarse el 90% de la variabilidad de los datos (F1 el 69% y F2 el 21%). Mediante esta técnica fue posible clasificar correctamente el 97,44% de los casos evaluados.

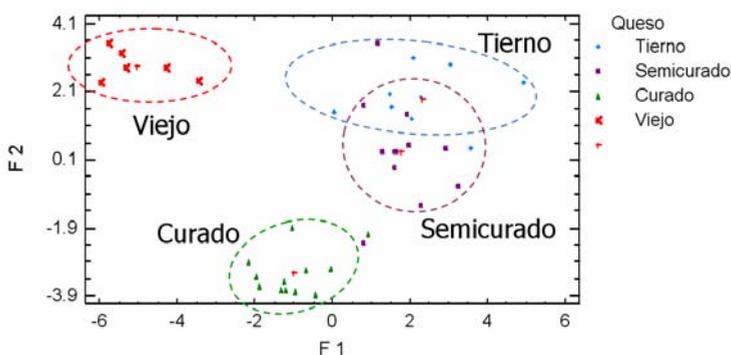


Figura 101. Funciones discriminantes de las muestras de queso.

La Figura 101 muestra la representación de las dos primeras funciones discriminantes. Considerando la función F1 se observa que las muestras de queso con menor tiempo de maduración se agrupan en la parte positiva del eje

de abscisas, y que los dos tipos de queso restantes se separan progresivamente a lo largo de este eje conforme aumenta su tiempo de curado.

La representación de las dos funciones discriminantes pone de manifiesto una clara diferenciación entre las muestras evaluadas en función de sus valores de impedancia (módulo y fase). Estas variaciones se corresponden con las detectadas en las determinaciones analíticas, donde los valores de humedad, contenido en sal y actividad de agua son significativamente diferentes en función del grado de maduración del queso.

Se realizó por último una análisis estadístico mediante una técnica de regresión múltiple, considerando como variables dependientes el contenido en humedad, contenido de sal, contenido de sal en la fase líquida y actividad de agua de las muestras de queso, y como variables independientes los módulos y fases obtenidos para el rango de frecuencias donde se observaron diferencias entre los distintos tipos de muestra. El análisis estadístico mostró una aceptable correlación con los parámetros fisicoquímicos, con valores de R^2 que oscilaron desde el 0,856 para el caso del contenido en sal hasta el 0,884 para los valores de humedad.

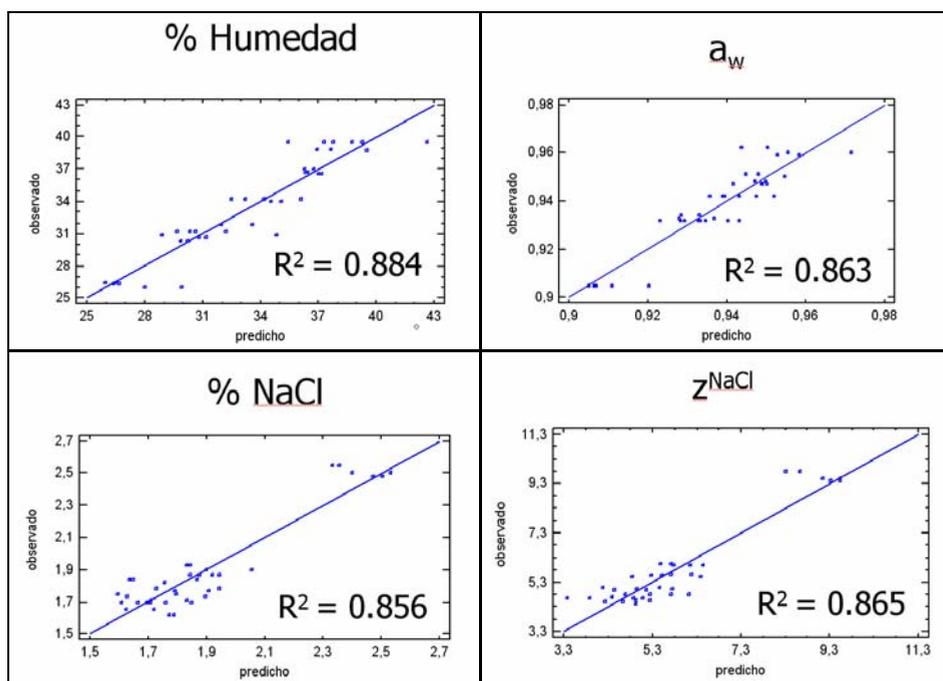


Figura 102. Modelos para los diferentes parámetros fisicoquímicos.

1.3. Conclusiones

La Espectroscopía de Impedancias (EI) es una técnica rápida y no destructiva que permite la caracterización del nivel de curado del queso.

Con el sistema de medida desarrollado se ha podido discriminar el grado de maduración de diversos quesos de mezcla. El análisis estadístico mostró una buena correlación con el contenido de sal (%NaCl), la actividad de agua (a_w) y la humedad (X_w), con valores de R^2 que oscilaron desde 0,856 para la concentración de cloruro sódico hasta el 0,884 para la concentración de agua.

Los resultados obtenidos en este estudio dejan de manifiesto las múltiples posibilidades de esta novedosa técnica, que podría ser aplicada en un futuro tanto al control de los procesos de elaboración como del producto final.

2. Estudio de la evolución de la frescura de pescado

La calidad del pescado es un concepto complejo que incluye factores relacionados con la nutrición, la microbiología, la bioquímica y la fisicoquímica. Este término, asociado a la apariencia estética y el grado de deterioro que ha sufrido el pescado, involucra aspectos de seguridad alimentaria como la ausencia de bacterias peligrosas, parásitos o compuestos químicos [144].

La frescura es sin lugar a dudas el atributo más considerado para valorar la excelencia del pescado. Su determinación es una práctica habitual e imprescindible en el sector pesquero hoy en día. Esta propiedad está definida por una combinación de parámetros sensoriales, físicos, bioquímicos y microbiológicos [145].

Los productos pesqueros son considerados alimentos muy perecederos debido a su composición química y al pH poco ácido de su carne. Los primeros cambios asociados a la pérdida de frescura del pescado son consecuencia de la acción de enzimas endógenas presentes en las vísceras y en los músculos (autólisis) y/o por el desarrollo de microorganismos deteriorantes. La flora contaminante se

asienta básicamente en la piel, las branquias y el intestino, y se extiende a otros tejidos donde existen sustancias nutritivas adecuadas (sustratos de bajo peso molecular: aminoácidos, aminor volátiles) y un pH relativamente elevado. Como resultado, aparecen compuestos volátiles (trimetilamina, amoníaco, mercaptanos, etc.) que confieren mal olor al pescado, se reblandece el músculo, las hemoproteínas modifican el color de la carne y se oxidan los lípidos [32] [146] [147].

Se han propuesto numerosas técnicas basadas en valoraciones sensoriales, físicas, químicas y microbiológicas. A continuación se mencionan brevemente sus ventajas e inconvenientes.

Los métodos sensoriales utilizan los órganos de los sentidos para valorar características del pescado como su aspecto, textura, olor, color, sabor. No requieren equipos ni materiales especiales. Son rápidos y permiten la valoración simultánea de más de un parámetro en diferentes muestras. Sin embargo, el resultado está sometido a impresiones subjetivas del panel de catadores [148], siendo necesario contar con jueces expertos.

Los métodos físicos son generalmente no destructivos, sencillos y de fácil aplicación. Su principal contrariedad radica en que aportan información limitada y presentan restricciones en el uso en función del procesado o composición del producto pesquero [148] [149].

Con los métodos químicos pueden establecerse estándares cuantitativos, ya que aportan resultados objetivos, fiables y seguros y pueden ser utilizados tanto en pescados sin procesar como en productos derivados, pero requieren en muchos casos personal experimentado e instrumental de coste elevado [146] y exige la destrucción de la muestra.

La finalidad de los métodos microbiológicos es ofrecer información sobre la calidad higiénica del producto, así como de la posible presencia de microorganismos de importancia para la salud pública [146] [150]. El inconveniente que reduce su utilización es que normalmente se requieren entre veinticuatro horas y tres días para obtener los resultados.

El procedimiento de determinación de la frescura ideal debe ser rápido, fiable, coincidente con la apreciación sensorial y aplicable a todos los productos pesqueros. Debido a la gran variedad de especies, composiciones y procesados

existentes, esto es difícil de lograr. Ninguna de las técnicas tradicionales por sí sola ha tenido aún una aceptación general, por lo que frecuentemente se recomienda realizar al menos dos pruebas: una para valorar la pérdida de frescura y otra para detectar el deterioro microbiano [150].

Es interesante desarrollar nuevos métodos que sean más rápidos, sencillos y económicos y que puedan aplicarse tanto a la materia prima intacta como durante el procesado del pescado. Se han realizado múltiples trabajos dirigidos a lograr sistemas de ensayo basados generalmente en medidas indirectas de tipo fisicoquímico, como son la impedimetría, microcalorimetría, turbidimetría, radiometría, epifluorescencia directa sobre filtro, bioluminiscencia, el ensayo de la actividad aminopeptidásica ligada a la pared celular y diversos métodos inmunológicos y genéticos [92] [151] [152].

Ahondando en este sentido, con el objetivo de desarrollar equipos de control de calidad que se puedan implantar tanto en la industria como en laboratorios, se está investigando la posible utilización de sensores no destructivos. Equipos de bajo coste, buena fiabilidad, fácil manejo, alta portabilidad, idóneos tanto para mediciones *on-line* como *in-situ*. [153].

Concretamente, métodos instrumentales de medida de textura y color, análisis de imagen, espectroscopía de UV, potenciometría, y otras técnicas como narices electrónicas y la espectroscopía de impedancia, se están estudiando como una alternativa a los métodos tradicionales. No obstante, pese a sus ventajas, todavía no se ha encontrado ningún método que por sí solo pueda ser propuesto para definir y medir la frescura del pescado [92].

2.1. Material y métodos

Materia prima

El pescado escogido para realizar el estudio de frescura fue dorada (*Sparus aurata*) de calibre 400-600 g procedente de dos piscifactorías. Se denominó población *G* a las muestras procedentes de Interfish Aquaculture S. A., Larimna, (Lokrida, Grecia) y población *E* a las adquiridas en Acuícola Marina

S. A., Burriana (Castellón, España). Se emplearon un total de seis lotes de pescado, tres lotes de cada población.

Acondicionamiento de la materia prima

A su llegada al laboratorio, las doradas fueron descabezadas, evisceradas y fileteadas obteniendo dos filetes de cada pescado. Los filetes se colocaron de manera individual en bolsas estériles de poliamida-polietileno 20-60 (Verpackungen GmbH, Sulzberg, Germany). Una vez envasadas se termosellaron y mantuvieron en refrigeración (4°C) a lo largo de todo el estudio. Las muestras fueron analizadas los días 0, 1, 2, 5, 7, 9, 12 y 15 de almacenamiento.

Determinaciones fisicoquímicas

Se realizaron las determinaciones de las siguientes propiedades físico-químicas en las muestras de pescado: humedad, grasa, Nitrógeno Básico Volátil Total (N-BVT) y pH. Todas las medidas se realizaron por triplicado.

Los análisis de humedad y grasa se llevaron a cabo según los procedimientos 650.46 y 991.36, descritos por la AOAC (1997).

Para cuantificar el contenido en Nitrógeno Básico Volátil Total (N-BVT) se siguió el procedimiento descrito por Malle y Tao [154].

El pH se midió con un pH-metro (Crison Basic 20+, Crison Instruments S.A, Barcelona, España) con electrodo de punción. Las medidas de pH se tomaron directamente en cuatro zonas concretas del filete (ver Figura 103).

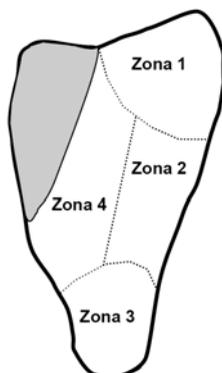


Figura 103. Esquema de un filete de dorada detallándose las diferentes zonas de punción para las determinaciones de pH y de espectroscopía de impedancia.

Determinación de la impedancia

Para el estudio se utilizó el *electrodo doble* (ver *Capítulo 1. Desarrollo del sistema de medida - 5.- Electroodos - 5.2.- Electrodo doble* página 111), compuesto por dos agujas de acero inoxidable de 1mm de diámetro y 1,5cm de longitud, colocadas a una distancia entre sí de 1cm.

El rango de frecuencia empleado para la determinación de la impedancia fue el comprendido entre 1Hz y 1MHz. Se realizaron lecturas de impedancia en cada una de las zonas reflejadas en el esquema anterior (ver Figura 103) insertando completamente el electrodo con un ángulo aproximado de 45°.

Durante la medida de la impedancia las muestras permanecieron en el interior de una caja de poliespam sobre una capa de hielo aislada por film plástico, con el objetivo de mantener la temperatura estable en un valor próximo a 7-8 °C, no registrándose en ningún caso oscilaciones superiores a 1,5 °C.

Análisis estadístico de los datos

El estudio estadístico se llevó a cabo utilizando el programa Statgraphics Centurion XV (Manugistics Inc., Rockville, MD, USA).

En primer lugar se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) para cotejar las medidas físico-químicas obtenidas durante el periodo de almacenamiento y valorar la existencia de diferencias significativas entre los diferentes lotes, considerando un nivel de significancia $p=0,05$.

Posteriormente se aplicó una técnica de análisis discriminante. Esta herramienta estadística busca la combinación lineal de las variables independientes que mejor permite discriminar entre grupos previamente definidos (variables categóricas). Con ella, partiendo de las lecturas de impedancia recogidas, se examinó la capacidad de la espectroscopía de impedancia para diferenciar entre poblaciones, lotes y tiempo de almacenamiento.

Por último, mediante la técnica de Mínimos Cuadrados Parciales, también conocida como Partial Least Squares (PLS), se creó un modelo matemático para predecir el valor de las diferentes variables físico-químicas en función de los datos de módulo y fase de impedancia. Tras la estimación del modelo de predicción, se evaluó su rendimiento mediante una sistema de validación denominado “*cross-validation*”, consistente en aplicar el modelo predictivo generado a una serie de valores apartados de antemano y analizar las desviaciones entre los valores predichos y observados.

Para optimizar el modelo se utilizaron varios métodos de estandarización, como son la centralización, el autoescalado y la transformación logarítmica [155].

2.2. Resultados y discusión

2.2.1. Caracterización de las muestras

En la Tabla 19 se muestran los valores promedio de humedad, grasa, N-BVT y pH de las muestras frescas.

La caracterización físico-química de las muestras es coherente con la indicada por otros autores para esta misma especie y sistema de cría [156][157][158].

Población	Lote	Humedad	Grasa	N-BTV	pH ¹
G	1	72,78±1,34 ^a	5,97±1,15 ^a	16,08±1,04 ^a	6,20±0,05 ^a
G	2	73,21±2,00 ^a	5,39±0,09 ^a	16,93±1,94 ^{ab}	6,31±0,09 ^b
G	3	73,32±0,60 ^a	7,07±0,54 ^a	19,47±1,06 ^c	6,10±0,06 ^c
E	1	68,94±3,37 ^b	10,43±1,50 ^{bc}	18,96±0,08 ^c	6,02±0,07 ^d
E	2	69,93±0,96 ^b	11,30±1,03 ^b	18,80±0,09 ^{bc}	6,20±0,05 ^a
E	3	69,84±0,43 ^b	9,58±0,21 ^c	18,89±0,16 ^c	6,08±0,06 ^c

**

**

*

**

Letras iguales en una misma columna indican la pertenencia a grupos homogéneos.

* 0,05>p>0,001; ** p<0,001

¹ Valor promedio de pH para las cuatro zonas de estudio

Tabla 19. Caracterización de las muestras.

Para comprobar la existencia de diferencias significativas en función del lote de pescado, se realizó un análisis de la varianza simple (ANOVA), considerando como variable cada uno de los parámetros físicoquímicos y como factor el lote analizado. El análisis estadístico mostró la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) en los valores de grasa y humedad de las dos poblaciones. Las muestras procedentes de la población G presentaron valores significativamente superiores en humedad y menores en grasa que la población E. Las variaciones en el contenido lipídico podrían atribuirse a aspectos relacionados con la edad del individuo, la climatología, la alimentación, etc., y a su vez podrían ser las causantes de las diferencias en el contenido de humedad, ya que en el pescado, los contenidos de humedad y grasa están relacionados, aglutinando la suma de ambas fracciones aproximadamente el 80% del su composición total. Así, un aumento en el contenido graso se produciría a expensas de una reducción del contenido en agua, por lo que existe una correlación inversa entre el contenido en humedad y grasa.

En el caso del contenido en N-BVT, se encontraron diferencias significativas entre los diferentes lotes, aunque estas diferencias no se asocian a la existencia de dos poblaciones. Por otra parte, considerando que la concentración de N-BVT en pescado recién capturado oscila entre los 5 y los 20 mg/100 g, que niveles de 30-35 mg/100 g son generalmente considerados como el límite de aceptación para pescado almacenado en hielo [159][160], y que todas las

muestras analizadas se encontraban por debajo de este límite, se pudo afirmar que, atendiendo a este parámetro, todas las muestras presentaban un rango de frescura aceptable en el momento del análisis.

Respecto al pH promedio de cada uno de los filetes, el análisis estadístico mostró la existencia de diferencias significativas entre los diferentes lotes ($p < 0.001$). Se observó que el pH en los lotes frescos depende de la zona de punción. En la zona 1 (próxima a la cabeza) los valores son más elevados que en las zonas restantes. No se encontraron diferencias significativas de pH en el resto de zonas (Figura 104).

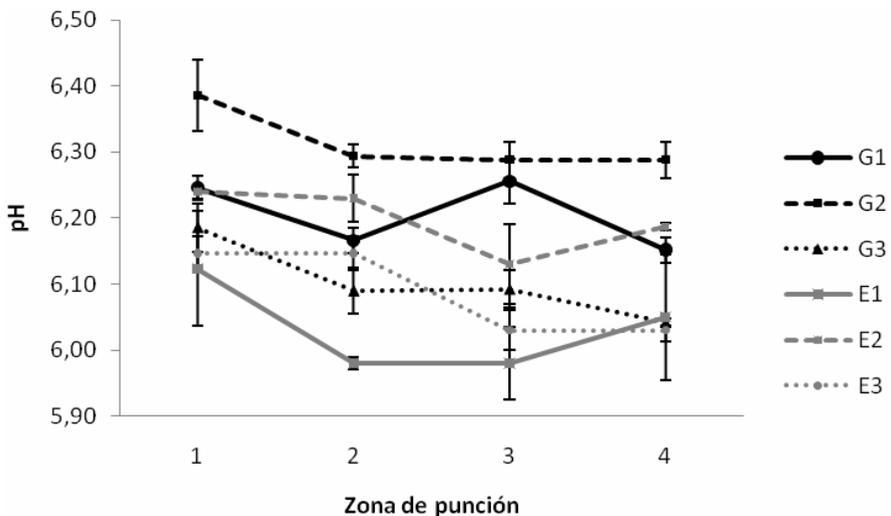


Figura 104. Valores de pH (media + SD) de los lotes en cada zona de punción.

2.2.2. Evolución de los parámetros fisicoquímicos a lo largo del estudio de almacenamiento

Durante el periodo de refrigeración se analizaron igualmente humedad, grasa, pH y N-BVT de cada lote en los intervalos de tiempo prefijados. En el periodo de conservación en frío no se detectaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en los parámetros de humedad y grasa.

El pH se estabilizó durante todo el periodo de refrigeración, oscilando entre 6,0 y 6,2 en los filetes de la población E y entre 6,2 y 6,4 en los filetes de la población G (Figura 105). Estos valores se consideran normales para la etapa postmortem, ya que, aunque en general el pH típico del pescado vivo está alrededor de 7,0, después de su captura disminuye, situándose entre 6,2 y 6,5 por el acumulo de ácido láctico en el músculo [147][160]. Posteriormente, vuelve a aumentar de forma gradual debido a la producción de metabolitos alcalinos de origen bacteriano. Por ello, tal y como han señalado diferentes autores, existiría una relación directa entre los valores de pH y los recuentos de microorganismos totales [161]. No obstante se observa cierta variabilidad respecto a los valores de pH de dorada fresca consultados en la bibliografía [156][161][162], lo que confirmaría que el pH del músculo de pescado se ve afectado por múltiples factores y justificaría las diferencias significativas ($p < 0.05$) detectadas entre los valores de pH de las diferentes poblaciones.

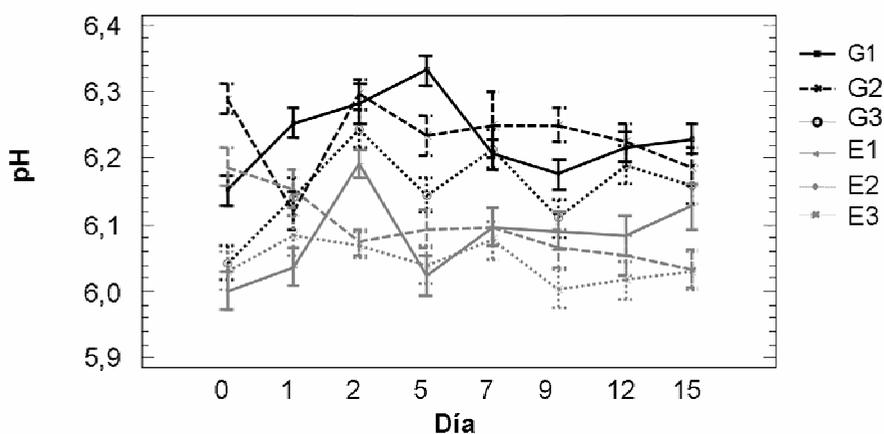


Figura 105. Interacción de las variables día y lote en el pH (promedio e intervalos LSD de Fisher).

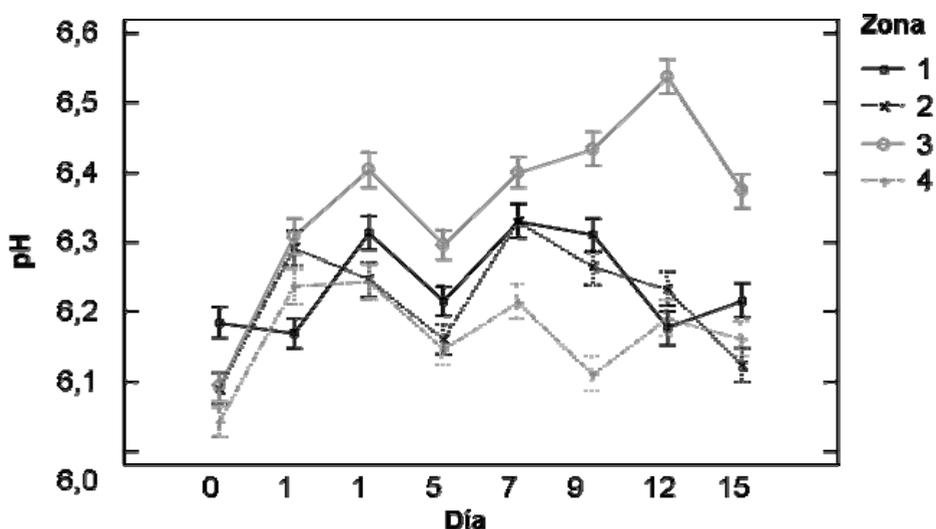


Figura 106. Interacción de las variables zona y día en el pH durante la refrigeración (promedio e intervalos LSD de Fisher).

Es importante mencionar la interacción existente entre el valor de pH y la zona de medida de la misma. En la Figura 106 se muestra cómo a partir del día 0 de almacenamiento, en el que los mayores niveles de pH se localizaban en la zona 1 en todos los lotes (Figura 104), los pH más elevados pasan a recogerse en la zona más próxima a la cola (zona 3), seguidos por las zonas musculares del centro de la pieza y la zona próxima al vientre. Se concluye en consecuencia que es la zona de la cola la que se degrada más rápidamente, pues es la que antes empieza a acumular metabolitos alcalinos.

El valor de N-BVT no se modificó durante los primeros días de estudio (ver Figura 107). Sin embargo, a partir del quinto día de refrigeración se incrementó progresivamente, siendo este aumento más acusado para las muestras procedentes de Grecia (población G).

Considerando que el límite legal de aceptación para el N-BVT establecido por la Unión Europea (CEE, 2005) para pescado fresco es de 30 mg N/100 g pescado (línea horizontal en la figura), se concluye que la totalidad de las muestras de la población E serían aptas para el consumo durante todo el periodo de refrigeración que abarcó el estudio, mientras que algunas muestras de la población G serían no aptas antes de la primera semana de almacenamiento. Las diferencias en el comportamiento de la población G respecto a la E, podrían

atribuirse a posibles daños o contaminación cruzada durante la manipulación o transporte, una rotura de la cadena de frío o a llevar varios días en almacenamiento antes de la venta.

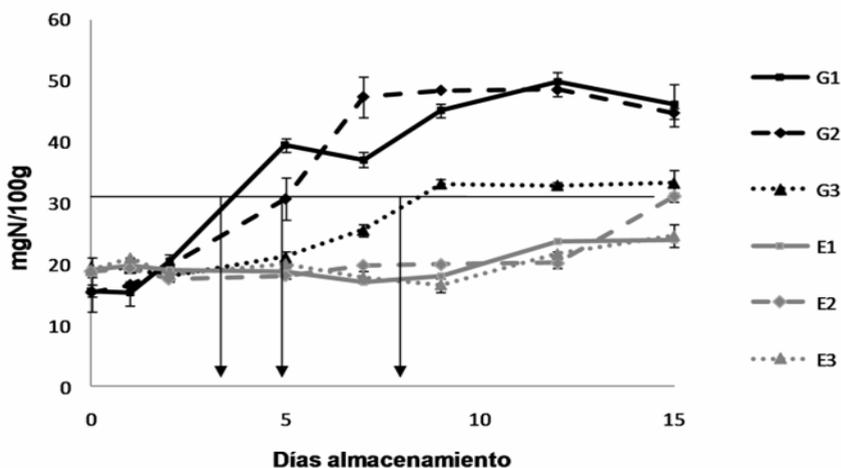


Figura 107. Evolución del contenido en N-BVT (media y SD) durante el almacenamiento.

2.2.3. Caracterización de la materia prima mediante la medida de su impedancia

Mediante un análisis discriminante se evaluó la capacidad de la técnica de espectroscopía de impedancia para diferenciar los filetes de pescado de las poblaciones utilizadas en el estudio. Se consideró como factor de clasificación el lote y como datos los cincuenta valores de módulo y fase del pescado fresco (los correspondientes al día 0). Como puede verse en la Figura 108 la Función 1 discriminó dos grupos diferenciados, coincidentes con las poblaciones G y E. La Función 2 permitió diferenciar los lotes incluidos en cada población.

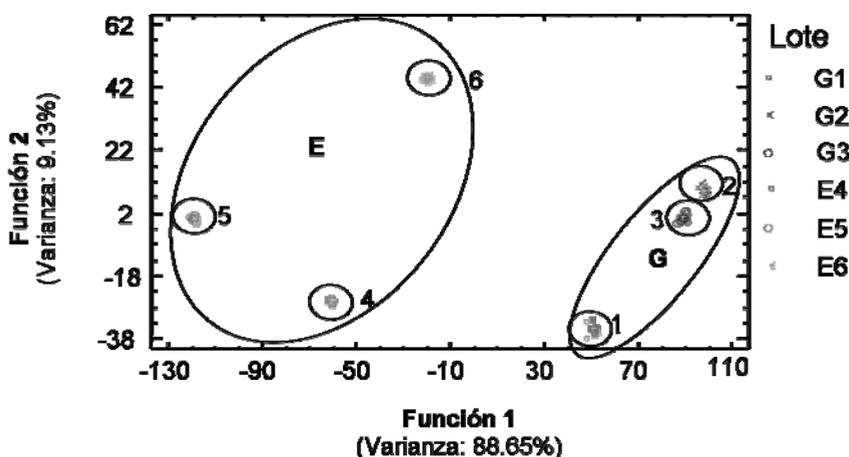


Figura 108. Funciones discriminantes de dorada en función del lote.

Se examinó la influencia de la zona de lectura de la impedancia en los valores de módulo y fase obtenidos mediante análisis discriminante. Se caracterizó cada lote por separado, empleando las medidas de impedancia del pescado fresco (día 0). La Figura 109 muestra los resultados del análisis discriminante para el lote E1. Las lecturas realizadas en las zonas 2 y 4 se presentan próximas entre sí. Las de la zona 1 y 3 están aisladas y distanciadas del resto. Sin embargo las medidas realizadas en la zona 1 pueden relacionarse con las de la zona 3 atendiendo a la función discriminante 2. Se obtuvieron resultados similares en todos los lotes.

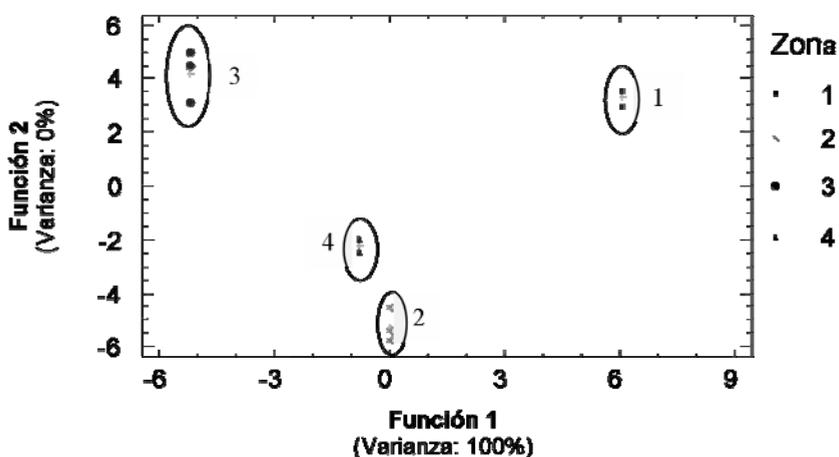


Figura 109. Análisis discriminante de los valores de impedancia en función de la zona de medida.

2.2.4. Evolución de las medidas de impedancia durante el almacenamiento

En la Figura 110 se presenta un análisis discriminante para cada una de las poblaciones consideradas en el estudio. Se han considerado los datos de impedancia de todos los lotes incluidos en cada población acumulados durante el periodo de ensayo. Tanto para la población G como para la E se distinguen tres grupos. Esta diferenciación es más evidente en la población E, donde incluso pueden apreciarse bandas discriminantes asociadas a los días de conservación en frío, independientemente del lote evaluado.

Este diferente comportamiento podría entenderse si las muestras pertenecientes a la población G hubieran sufrido algún daño o presentaran un mayor tiempo postmortem en el momento de la compra o se hubiera producido una rotura de la cadena de frío durante el transporte. Cualquiera de estas circunstancias también explicaría los valores elevados de N-BVT y la velocidad con la que se superaron los 30 mg de N/100g de producto.

Atendiendo a los resultados mostrados en la Figura 110 para la población E, puede establecerse una relación entre los tres grupos diferenciados y los cambios estructurales que sufren las muestras de pescado descritos por otros autores. Caballero *et al.* [163] comprobaron que durante los dos primeros días postmortem la estructura muscular se mantiene intacta. A partir del segundo día la adhesión entre fibras disminuye y se produce un desprendimiento de las miocomiatis. Superado el cuarto día tiene lugar una desintegración del músculo provocada por la ruptura de las membranas celulares y la pérdida de las fibras. Más allá del décimo día, particularmente una vez cumplidos los catorce días de almacenamiento, las modificaciones son más evidentes. En definitiva, todas estas variaciones son consecuencia de las alteraciones bioquímicas y estructurales que sufre el pescado por parte de dos principales agentes de alteración: enzimas y bacterias endógenas tan pronto como es capturado y muere. Pueden distinguirse dos fases de degradación. La primera es la autólisis, que puede ser considerada, en un sentido pasivo, como una pérdida de frescura, esto es, como una alteración consecuente con la rotura del equilibrio de las funciones metabólicas del pez. La segunda se deriva de la actividad bacteriana, desencadenando efectos más pronunciados de alteración. Finalmente el pescado se vuelve incomedible [164].

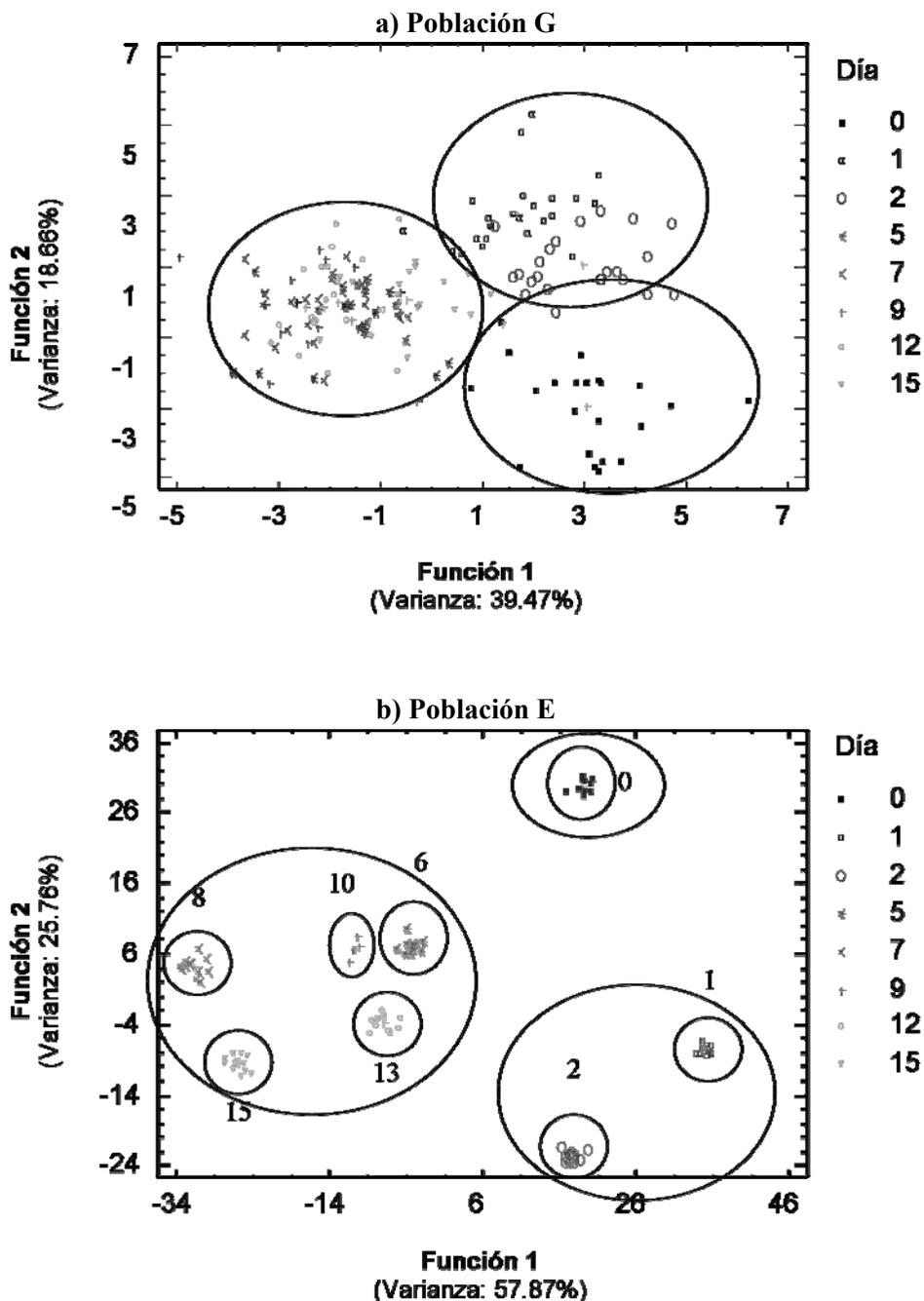


Figura 110. Funciones discriminantes de los valores de impedancia en función del día de almacenamiento para la población G (a) y E (b)

A medida que los microorganismos y enzimas van deteriorando el pescado se incrementa la concentración de productos metabólicos iónicos disueltos en él. Ello provoca un aumento de la conductividad y por tanto una disminución de la impedancia del sistema [165]. Esta es la razón por la que la espectroscopía de impedancia puede considerarse una técnica adecuada para evaluar e identificar los cambios asociados a la degradación del músculo de pescado durante su almacenamiento.

2.2.5. Modelización PLS entre impedancia, pH, días de almacenamiento y N-BVT

El método de regresión por reducción multivariante PLS está diseñado para construir modelos estadísticos que relacionan variables independientes con variables dependientes. Actualmente este es uno de los procedimientos más útiles para predecir una respuesta a partir de muchos factores. Es capaz de establecer modelos empíricos basados en la correlación de datos de referencia con otros de dimensión superior, mostrando una fuerte correlación entre ellos y permitiendo predecir así una propiedad de interés (física, química o sensorial) [166][167].

Aplicando esta técnica estadística a cada parámetro de estudio se obtuvieron diferentes modelos de predicción PLS. Para construirlos se realizó una amplia selección de las variables, abarcando la totalidad de módulos y fases, sólo los módulos, sólo las fases, sólo algunos rangos de frecuencia, y aplicando o no tanto el autoescalado así como la transformación logarítmica de las variables. De todos ellos, se seleccionó el modelo de predicción que mayor variabilidad recoge, atendiendo a los valores de R^2 y Press de cada uno de los análisis.

El valor de R^2 indica el porcentaje de la varianza que es explicado por el modelo, mientras que el valor Press hace referencia a la suma de cuadrados de los errores de la predicción para la variable, y se corresponde con la desviación al cuadrado entre el valor observado y estimado. Se considera un buen modelo aquel que minimiza el valor de Press. Por el principio de parsimonia, el cual concluye que si existen dos modelos que solucionan el problema planteado de forma no significativamente diferente es preferible elegir aquel que sea más sencillo por ser más fácilmente interpretable y reducir los riesgos de sobreajuste

a la muestra; debe elegirse el que contenga el menor número posible de componentes y que no difiera demasiado del valor mínimo Press [168].

Parámetro	Factores PLS	R ² Calibración	R ² Validación
Días	10	0,54	0,33
Humedad	8	0,62	0,53
Grasa	8	0,66	0,59
pH	7	0,45	0,38
N-BVT	8	0,79	0,72

Tabla 20. Resultados de las regresiones PLS.

En la Tabla 20 se muestran los valores de R², tanto de calibración como de validación, de los modelos seleccionados para cada parámetro de medida. En la construcción del modelo se incluyeron los valores de módulo y fase de todas las frecuencias ensayadas una vez autoescalados. En algunos casos, la utilización exclusiva de valores de módulo o valores fase, supusieron una mejora del R² de predicción hasta en un 4%. No obstante, con el objetivo de estandarizar los procedimientos, se ha preferido operar de modo semejante con todos los parámetros.

El parámetro para el cual se ha encontrado una mejor correlación con las medidas de impedancia fue el porcentaje de N-BVT, (R² de predicción = 0.72) (Figura 111). En menor medida se ajustaron los porcentajes de humedad, grasa, días de almacenamiento y pH. De esta manera podemos decir que la evolución de la impedancia se correlaciona, sobre todo, con la degradación del músculo del pescado durante el almacenamiento.

Los valores de grasa y humedad propios de cada muestra parecen no afectar a los modelos de predicción del deterioro, atendiendo al escaso porcentaje de variabilidad que se puede explicar mediante un modelo PLS y a que la introducción de estos datos en la construcción de los modelos de predicción de N-BVT no modifica el ajuste del modelo obtenido.

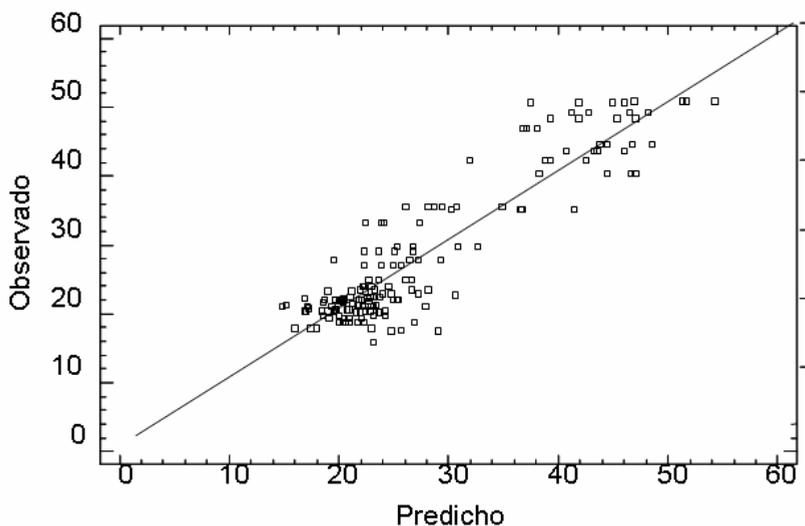


Figura 111. Comparación de los porcentajes de N-BVT observados frente a predichos por PLS.

Al repetir los análisis estadísticos de las lecturas de impedancia considerando las cuatro zonas diferentes de punción se observó en todos los parámetros analizados una disminución de el coeficiente de determinación, tanto en la fase de calibración como en la de validación, mientras que los valores de Press aumentaron, y el número de componentes extraídos disminuyó, llegando en algunos casos hasta 1. Por tanto, el tratamiento de los datos diferenciando entre las cuatro zonas de medida simplifica los modelos obtenidos, aunque hace que se pierda parte de la varianza explicada. Puede que la reducción del número de valores con los que se construye el modelo merme su potencia de ajuste y de predicción.

2.3. Conclusiones

Se ha estudiado la aplicación de la espectroscopía de impedancia para evaluar la frescura de pescado mediante uno de los sensores diseñados en la tesis.

La experiencia se realizó a partir de 6 lotes de dorada (*Sparus aurata*) procedentes de dos piscifactorías diferentes. Se estudió la evolución de diferentes parámetros fisicoquímicos (humedad, grasa, pH y N-BVT) y las

medidas de impedancia (módulo y fase a diferentes frecuencias), durante 15 días de almacenamiento en refrigeración. La interpretación de los resultados obtenidos mediante el análisis multivariante (análisis discriminante y PLS) concluyó que es posible utilizar esta técnica para predecir el contenido de N-BVT en las muestras, considerado un indicador del deterioro del pescado.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran la capacidad de utilización de la espectroscopía de impedancia como herramienta de predicción de la frescura de pescado. No obstante, antes de proponer este equipo como una alternativa ante los métodos de evaluación tradicionales, cabría optimizar el protocolo de medida de la espectroscopía de impedancia mediante la optimización de los rangos de frecuencia utilizados y el desarrollo de nuevos electrodos, lo que podría mejorar el ajuste de los modelos PLS.

Por otra parte, se ha comprobado la necesidad de distinguir diferentes zonas de punción del electrodo en el filete de pescado, al detectarse variaciones considerables entre las diferentes regiones ensayadas.

Se considera interesante profundizar en esta línea de investigación. En próximos trabajos debe ampliarse el ámbito de estudio a otros índices de deterioro del pescado. Sería adecuado tener en cuenta la evolución del contenido en aminos biógenos, la medida de las propiedades mecánicas, el análisis sensorial o los recuentos microbiológicos, y establecer su relación con la impedancia.

También debería examinarse la eficacia del equipo de impedancia para evaluar los cambios en la calidad de la dorada tras el tratamiento de congelación, ya que ha sido demostrado que los principales daños en los tejidos durante la congelación se relacionan muy bien con las características de impedancia de los tejidos. [169].

Conclusiones finales

Se ha desarrollado un sistema de medida de bajo coste, flexible, ligero y de fácil manejo, basado en la técnica electroquímica de Espectroscopía de Impedancia, capaz de llevar a cabo la caracterización de propiedades fisicoquímicas y otros parámetros de calidad (grado de frescura, calidad post-mortem) de diversas matrices complejas.

Se han diseñado dos electrodos de reducidas dimensiones y geometrías diferentes que permiten realizar ensayos sin provocar el deterioro o rechazo de las muestras. Las piezas analizadas se preservan intactas y continúan formando parte del proceso de fabricación. Esta facultad no destructiva constituye una importante ventaja diferencial respecto a los métodos tradicionales, que convierte el sistema de medida implementado en una herramienta muy útil tanto en el control de procesos como de productos terminados. La posibilidad de realizar determinaciones *in situ* facilita el seguimiento constante de la evolución de los parámetros críticos en cada etapa de fabricación y abre las puertas a su aplicación como técnica de monitorización on line de la producción.

El sistema de medida es capaz de efectuar lecturas de impedancia en el intervalo de frecuencias comprendido entre 1Hz y 1MHz, utilizando un PC como interfaz y plataforma para el procesamiento de los espectros.

Se ha demostrado la fiabilidad del sistema de medida mediante su validación. Los materiales de referencia empleados han sido en primer lugar una serie de disoluciones ideales de cloruro sódico (salmueras de concentraciones de sal prefijadas) y posteriormente muestras homogeneizadas de carne picada de cerdo saladas a concentraciones conocidas. En ambos casos se han comparado los resultados obtenidos con el método propuesto y los procedimientos de ensayo oficiales, alcanzándose magníficas correlaciones. Por tanto, la técnica sugerida posee unas propiedades analíticas adecuadas, tanto en términos de exactitud como de precisión (repetitividad y reproducibilidad) y sensibilidad.

Las aplicaciones del sistema de medida presentadas en esta tesis sobre diversos alimentos, bien productos frescos (carne de cerdo fileteada), semielaborados (pescado desespinado y fileteado) o productos intermedios (productos cárnico-

curados y quesos), incluyen validaciones. Los datos resultantes se han sometido a diferentes tratamientos estadísticos, obteniendo en algunos casos excelentes predicciones y en otros un alto nivel de clasificación.

En la determinación del contenido en sal de salmueras y carne picada, las medidas de impedancia se realizaron con el *electrodo de aguja*. En ambos casos la transformación logarítmica de la variable dependiente (respuesta) ha permitido alcanzar un espectacular grado de precisión del modelo predictivo. Además, el sistema desarrollado posee una capacidad de discriminación elevada incluso a altas concentraciones de cloruro sódico, lo que supone una aportación importante en este campo.

La recta de ajuste de las salmueras posee una pendiente de 0,9794 y ordenada en el origen 0,0782. La recta de ajuste de las muestras de carne de cerdo picada presenta una dispersión muy pequeña respecto a la línea de referencia (con pendiente de 0,9749 y ordenada en el origen -0,0432).

En la determinación de la actividad de agua (a_w), la concentración de sal en la fase líquida (Z^{NaCl}) y la concentración de sal (%NaCl) en muestras de lomo de cerdo durante el proceso de curado se utilizaron tres electrodos de tipología diferente. Los mejores resultados se obtuvieron con el *electrodo de aguja*. Con el sistema de medida se han generado modelos predictivos de las tres propiedades fisicoquímicas y por tanto de la evolución del proceso de curado.

Además se ha demostrado la estrecha vinculación existente entre los valores de actividad de agua (a_w) y de concentración de sal en la fase líquida del alimento (Z^{NaCl}) y su equivalencia en las etapas de salado y secado. La recta de ajuste de ambos parámetros arrojó un coeficiente de determinación de 0,94.

Con el sistema de medida diseñado se ha podido discriminar el grado de maduración de diversos quesos de mezcla. El análisis estadístico mostró una buena correlación con el contenido de sal (%NaCl), la actividad de agua (a_w) y la humedad (X_w), con valores de R^2 que oscilaron desde 0,856 para la concentración de cloruro sódico hasta el 0,884 para la concentración de agua.

Por último se analizó la evolución de la frescura de pescado. El análisis multivariante concluyó que es posible utilizar esta técnica para predecir el contenido de N-BVT, considerado un indicador del deterioro del pescado.

Se ha comprobado la necesidad de distinguir diferentes zonas de punción del electrodo en el filete de pescado, al detectarse variaciones considerables entre las diferentes regiones ensayadas. En futuros trabajos debería optimizarse los rangos de frecuencia utilizados y desarrollarse nuevos electrodos para mejorar el ajuste de los modelos predictivos. Así mismo, convendría ampliar el ámbito de estudio a otros índices de deterioro del pescado.

Líneas futuras

La multidisciplinariedad es un concepto patente en este trabajo de principio a fin. No en vano el proyecto fue concebido para cubrir una necesidad compartida por disciplinas científicas autónomas con objetivos comunes. La ambiciosa estrategia de colaboración a tres bandas ha sido muy fructífera. Como consecuencia de estas sinergias se han derivado líneas futuras de investigación con una característica común: establecer complementariedades.

El sistema electrónico de medida implementado y los resultados derivados de sus aplicaciones constituyen el punto de partida para acometer nuevas investigaciones científicas. Proyectos orientados a maximizar las ventajas diferenciales del equipo mediante la ampliación de sus tres conceptos esenciales: la versatilidad, la flexibilidad y la conectividad.

En lo que respecta a la versatilidad, dentro del ámbito alimentario debe ampliarse el estudio a diversos productos alimenticios, especialmente a aquellos en que un parámetro fisicoquímico es un indicador crítico para su procesado. Ya se ha sugerido su aplicación a mermelada, frutas, patatas, etc.

No hay porqué restringir su utilización al sector agroalimentario. La metodología es apta para abarcar proyectos vinculados a otros sectores. Así, se está considerando su empleo en la detección de iones medioambientales de interés en aguas residuales.

Por otro lado, la flexibilidad de la electrónica es el elemento clave para abrir una ambiciosa línea de investigación orientada a obtener una nueva versión del sistema en la que coexistan bajo un mismo soporte la potenciometría y voltametría*. Dotar al sistema de ambas técnicas de medida permitirá la

*.I. Campos, R. Masot, M. Alcañiz, L. Gil, J. Soto, J. L. Vivancos, E. García-Breijo, R. H. Labrador, J. M. Barat, R. Martínez-Mañez. Accurate concentration determination of anions nitrate, nitrite and chloride in minced meat using a voltammetric electronic tongue. *Sensors & Actuators: B. Chemical*. Article in Press, Accepted Manuscript.

determinación de otros tipos de parámetros fisicoquímicos, lo que de nuevo le proporcionará una mayor versatilidad.

Al mismo tiempo, la posibilidad de combinar varias técnicas electroquímicas de medida incrementará la capacidad de discriminación de las matrices analizadas* y reportará un sustancial valor añadido al equipo, el de la selección de técnicas en función de la naturaleza de la muestra, del parámetro objeto de estudio, de las condiciones de trabajo del equipo y/o del criterio del usuario.

En el futuro, con el fin de lograr una mayor caracterización de las muestras, se pretende desarrollar un equipo que integre cuatro técnicas: voltametría, potenciometría, espectroscopía de impedancia y conductimetría.

Asimismo, se está considerando crear una patente y realizar un estudio para su lanzamiento comercial.

Por último, desde el punto de vista meramente electrónico, se sugiere incorporar mejoras en el sistema de comunicación entre el equipo y el PC. Si se consigue implementar soluciones de conectividad basadas primero en USB y posteriormente en modelos Wireless [48][170], será posible abordar con éxito protocolos de monitorización remota.

*. R. H. Labrador, R. Masot, M. Alcañiz, D. Baigts, J. Soto, R. Martínez-Máñez, E. García-Breijo, L. Gil, José M. Barat. Prediction of NaCl, nitrate and nitrite contents in minced meat by using a voltammetric electronic tongue and an impedimetric sensor. Food Chemistry 122 (2010) 864–870.

Referencias bibliográficas

- [1] M. Fernández. Pautas de calidad en el sistema agroalimentario español *Agroalimentaria* 28 (2009) 59-65.
- [2] J. Briz, I. de Felipe. Seguridad alimentaria y trazabilidad. Universidad Politécnica de Madrid. ETSIA Madrid. 2004.
- [3] M. N. García-Casal. La alimentación del futuro: Nuevas tecnologías y su importancia en la nutrición de la población. *Anales Venezolanos de Nutrición* 20 (2007) 108-114.
- [4] Innovación, calidad y empleo en el sector agroalimentario andaluz. *Temas de actualidad agraria* 2009.
- [5] Innovación, un arma cargada de futuro. Federico Morais. “Jornada: Futuro del sector agroalimentario. Los nuevos retos de innovación, crecimiento y desarrollo”. (CEIN Centro Europeo de Empresas e Innovación de Navarra). Proyecto Technofocus. 2000.
- [6] C. Jiménez, D. E. LEÓN. Biosensores: Aplicaciones y perspectivas en el control y calidad de procesos y productos alimenticios. Universidad de Antioquía, Medellín. Colombia. Facultad de química farmacéutica. 16 (2009) 144-154.
- [7] L. Fonseca, C. Cané, E. Figueras, I. Gràcia, R. Rubio, A. Ruiz, N. Sabaté, J. Santander. Microsistemas para la seguridad y calidad alimentaria. *Alimentaria* Abril 05. Centro Nacional de Microelectrónica. (CNM-IMB-CSIC) Campus UAB. E-08193 Bellaterra. SPAIN.
- [8] L. Dornelles, L. Tatsuo. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chemistry* 77 (2002) 237–256.
- [9] J. L. Damez, S. Clerjon. Meat quality assessment using biophysical methods related to meat structure. *Meat Science* 80 (2008) 132–149.
- [10] Y. Shiinoki, Y. Motouri, K. Ito. On-line Monitoring of Moisture and Salt Contents by the Microwave transmission Method in a Continuous Salted Butter-making Process. *Journal of Food Engineering* 38 (1998) 153-167.
- [11] M. Kent, A. Peymann, C. Gabriel, A. Knight. Determination of added water in pork products using microwave dielectric spectroscopy. *Food Control* 13 (2002) 143–149.

- [12] Y. Huang, A.G. Cavinato, D.M. Mayes, G.E. Bledsoe, B.A. Rascon. Nondestructive Prediction of Moisture and Sodium Chloride in Cold Smoked Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Journal of Food Science* 67 (2002) 7.
- [13] J. Gaitán, V. Ortiz, F. España, J. Pérez, E.J. De Pedro. Quantitative analysis of pork dry-cured sausages to quality control by NIR spectroscopy. *Meat Science* 78 (4) (2008) 391–399.
- [14] M. Uddin, E. Okazaki, H. Fukushima, S. Turza, Y. Yumiko, Y. Fukuda. Nondestructive determination of water and protein in surimi by near-infrared spectroscopy. *Food Chemistry* 96 (2006) 491–495.
- [15] C. Vestergaard, J. Risum, J. Adler-Nissen. Quantification of salt concentrations in cured pork by computed tomography. *Meat Science* 68 (2004) 107–113.
- [16] E. Fulladosa, E. Santos-Garcés, P. Picouet, P. Gou. Prediction of salt and water content in dry-cured hams by computed tomography. *Journal of Food Engineering* (2009).
- [17] B. F. Lantry, D. J. Stewart, P. S. Rand, E. L. Mills. Evaluation of total-body electrical conductivity to estimate whole-body water content of yellow perch, *Perca flavescens*, and alewife, *Alosa pseudoharengus*. *Fishery Bulletin* 97 (1999) 71-79.
- [18] N. Shirsat, J.G. Lyng, N.P. Brunton, B. McKenna. Ohmic processing: Electrical conductivities of pork cuts. *Meat Science* 67 (2004) 507–514.
- [19] D. Chevalier, F. Ossart, C. Ghommidh. Development of a non-destructive salt and moisture measurement method in salmon (*Salmo salar*) fillets using impedance technology. *Food Control* 17 (2006) 342–347.
- [20] E. García-Breijo, J. M. Barat, O. L. Torres, R. Grau, L. Gil, J. Ibáñez, M Alcañiz, R. Masot, R. Fraile. Development of a puncture electronic device for electrical conductivity measurements throughout meat salting. *Sensors and Actuators A* 148 (2008) 63–67.
- [21] T. Antequera, A. Caro, P. G. Rodríguez, T. Pérez. Monitoring the ripening process of Iberian ham by computer vision on magnetic resonance imaging. *Meat Science* 76 (2007) 561–567.
- [22] K. Toko. Taste sensor. *Sensors and Actuators B* 64 (2000)205–215.
- [23] M.S. Cosio, D. Ballabio, S. Benedetti, C. Gigliotti. Evaluation of different storage conditions of extra virgin olive oils with an innovative recognition tool built by means of electronic nose and electronic tongue. *Food Chemistry*, 101 (2007) 485–491.
- [24] J. R. Macdonald, E. Barsoukov. *Impedance Spectroscopy. Theory, Experiment and Applications*. 2nd Edition, John Wiley & Sons, Inc. 2005.

- [25] L. Wu, Y. Ogawa, A. Tagawa. Electrical impedance spectroscopy analysis of eggplant pulp and effects of drying and freezing-thawing treatments on its impedance characteristics. *Journal of Food Engineering* 87 (2008) 274-280.
- [26] L. A. Geddes, L. E. Baker. *Principles of Applied Biomedical Instrumentation*. Wiley-Interscience (1989).
- [27] S. Othman, E. Sacristán. Espectrómetro de impedancia compleja para aplicaciones biomédicas. *Memorias II Congreso Latinoamericano de Ingeniería Biomédica*, Habana 2001.
- [28] J Prado, C Margo, M Kouider, M Nadi. Auto balancing bridge method for bioimpedance measurement at low frequency. 1st International Conference on Sensing Technology (2005) Palmerston North, New Zealand.
- [29] A. J. Bard, L. R. Faulkner. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons, Inc. 2001.
- [30] Princeton Applied Research. *Electrochemical Impedance Measurements: Instrumentation and Techniques*. Application Note AC-3.
- [31] K.S. Cole. Electric phase angle of cell membranes. *Journal of General Physiology* 15 (1932) 641-649.
- [32] J. L. Damez, S. Clerjon, S. Abouelkaram, J. Lepetit. Dielectric behavior of beef meat in the 1-1500 kHz range: Simulation with the Fricke/Cole-Cole model. *Meat Science* 77 (2007) 512-519.
- [33] U. Pliquett, M. Altmann, F. Pliquett, L. Schöberlein. Py—a parameter for meat quality. *Meat Science* 65 (2003) 1429-1437.
- [34] R Pething. Dielectric properties of body tissues. *Clinical Physics and Physiological Measurement* 8 (1987) 5-12.
- [35] H.P. Schwan. Electrical properties of tissues and cell suspensions. *Adv. Biol. Med Phys.* 5 (1994) 147-209.
- [36] G. P. Drago, S. Ridella. Evaluation of electrical fields inside a biological structure. *Br. J. Cancer* 45 (1982) 215.
- [37] S. Grimnes, Ø. G. Martinsen. “Bioimpedance & Bioelectricity Basics” Academic Press. 2000.
- [38] W. D. Hurt. Multiterm Debye Dispersion Relations for Permittivity of Muscle. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. BME-32, 1 (1985) 60-64.
- [39] K. R. Foster, H. P. Schwan. Dielectric properties of tissues and biological materials. A critical Review. *CRC Critical Reviews in Biomedical Engineering* 17 (1989) 25-104.

- [40] A. D. Bauchot, F. R. Harker, W. M. Arnold. The use of electrical impedance spectroscopy to assess the physiological condition of kiwifruit. *Postharvest Biology and Technology*, 18 (2000) 9–18.
- [41] J. Lepetit, P. Salé, R. Favier, R. Dalle. Electrical impedance and tenderisation in bovine meat. *Meat Science* 60 (2002) 51–62.
- [42] T. A. Whitman, J. C. Forrest, M. T. Morgan, M. R. Okos. Electrical measurement for detecting early postmortem changes in porcine muscle. *Journal of Animal Science* 74 (1996) 80–90.
- [43] O. G. Martinsen, S. Grimnes, P. Mirtaheri. Non-invasive measurements of post-mortem changes of haddock muscle – a pilot study. *Journal of Food Engineering* 43 (2000) 189–192.
- [44] E. Bozler, K. S. Cole. Electric impedance and phase angle of muscle in rigor. *Journal of Cell Composition Physiology* 6 (1935) 229-241.
- [45] M. Schäfer, C. Schlegel, H. J. Kirlum, E. Gersing, M. M. Gebhard. Monitoring of damage to skeletal muscle tissue caused by ischemia. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 45 (1998) 151-155.
- [46] A. Piccoli, L. Pillon, F. Dumler. Impedance Vector Distribution by Sex, Race, Body, Mass Index, and Age in the United States: Standard Reference Intervals as Bivariate Z Scores. *Nutrition* 18 (2002) 153–167.
- [47] P. J. Riu, R. Bragós, J. Rosell. Broadband quasi-differential multifrequency electrical impedance imaging system. *Physiological Measurement* 17 Suppl 4A (1996) A39-47.
- [48] F. Bogónez, F. Vázquez, O. Shurakhy, J. Sevilla, P. Riu. Portable Wireless Bioimpedance Measurement System for HD Monitoring. *World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering* (2006) Seoul, Korea.
- [49] L. Nescolarde, A. Piccoli, A. Román, A. Núñez, R. Morales, J. Tamayo, T. Doñate, J. Rosell. Bioelectrical impedance vector analysis in haemodialysis patients: relation between oedema and mortality. *Physiological Measurement* 25 (2004) 1271- 1280.
- [50] S. Kun, R. Perua. Tissue ischemia detection using impedance spectroscopy. *Proceedings, IEEE/EMBS 16 Annual International Conference*, 868-9, Baltimore, 1994.
- [51] E. Gersing. Monitoring temperature induced changes during hyperthermia by impedance methods. *Proc. of X International Conference on Electrical BioImpedance Barcelona* (1998) 37-40.

- [52] I. Szymanska, H. Radecka, J. Radecki, R. Kaliszan. Electrochemical impedance spectroscopy for study of amyloid β -peptide interactions with (-) nicotine ditartrate and (-) cotinine. *Biosensors and Bioelectronics* 22 (2007) 1955–1960.
- [53] D. A. McRae, M. A. Esrick. The dielectric parameters of excised EMT-6 tumours and their change during hyperthermia. *Phys. Med. Biol* 37 (1992) 2045-2058.
- [54] B. Blad, B. Baldetorp. Impedance spectra of tumor tissue in comparison with normal tissue, a possible clinical application for electrical impedance tomography. *Physiological Measurement* 17 suppl. 4 (1996) A105-A115.
- [55] J Heintz, O. Minet. Dielectric properties of female breast tumours. Proc. of IX International Conference on Electrical BioImpedance, Heidelberg - Alemania (1995) 356-359.
- [56] S.S. Chaudhary, R. K. Mishra, A. Swarup, J. M. Thomas. Dielectric properties of normal and malignant human tissues at radiowave and microwave frequencies. *Indian J.Biochem. Biophys* 19 (1984) 76-79.
- [57] J. Jossinet, A. Lobel, C. Michoulet, M. Schmitt. Quantitative technique for bioelectrical spectroscopy. *J. Biomed. Eng* 7 (1985) 289-294.
- [58] T. E. Kerner, K. D. Paulsen, A. Hartov, S. K. Soho, and S. P. Poplack. Electrical Impedance Spectroscopy of the Breast: Clinical Imaging Results in 26 Subjects. *IEEE Transactions On Medical Imaging* 21(6) (2002).
- [59] A. Surowiec, S. S. Stushly, J. R. Barr, A. Swarup. Dielectric properties of breast carcinoma and the surrounding tissues. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 25 (1988) 257-262.
- [60] F. Deflorian, S. Rossi, L. Fedrizzi, P. Bonora. The application of electrochemical impedance spectroscopy for studying the mechanism of corrosion protection by organic coating. Third International Conference on Electrochemistry ICE III Luxor, Egypt 1 (2001) 29-30.
- [61] A. Carullo, M. Parvis, A. Vallan. Fast impedance analyzer for corrosion monitoring. XVI IMEKO World Congress Vienna 6 (2000) 161–165.
- [62] K. Srinivas, P. Sarah, S.V. Suryanarayana. Impedance spectroscopy study of polycrystalline $\text{Bi}_6\text{Fe}_2\text{Ti}_3\text{O}_{18}$. *Bull. Mater. Sci.* 26 (2003) 247–253.
- [63] K. Prabakar, S. P. Mallikarjun. Complex impedance spectroscopy studies on fatigued soft and hard PZT ceramics. *Journal of Alloys and Compounds* 437 (2007), 302–310.
- [64] R.T. Coverdale, B.J. Christensen, T.O. Mason, H.M. Jennings, E.J. Garboczi, D.P. Bentz. Interpretation of impedance spectroscopy of cement paste via computer modeling. *J. Mater. Sci.* 30 (1995) 712–719.

- [65] L. K. Pan, H. T. Huang, C. Q. Sun. Dielectric relaxation and transition of porous silicon. *Journal of Applied Physics* 94 (2003) 2695–2700.
- [66] S. Takashima, H. P. Schwan. Dielectric dispersion of crystalline powders of amino acids, Peptides, and Proteins. *Journal of Physical Chemistry* 69 (1965) 4176–4182.
- [67] M. J. Marchello, W. D. Slinger, J. K. Carlson. Bioelectrical impedance: Fat content of beef and pork from different size grinds. *Journal of Animal Science* 77(9) (1999), 2464–2468.
- [68] M. Altmann, U. Pliquet. Prediction of intramuscular fat by impedance spectroscopy. *Meat Science* 72 (2006) 666–671.
- [69] W. D. Slinger, M. J. Marchello. Bioelectrical impedance can predict skeletal muscle and fat-free skeletal muscle of beef cows primal cuts. *Journal of Animal Science*, 72 (1994) 3124–3130.
- [70] J. L. Damez, S. Clerjon, S. Abouelkaram, J. Lepetit. “Beef meat electrical impedance spectroscopy and anisotropy sensing for non-invasive early assessment of meat ageing” *Journal of Food Engineering* 85 (2008) 116–122.
- [71] M. J. Marchello, J. E. McLennan, D. V. Dhuyvetter, W. D. Slinger. Determination of saleable product in finished cattle and beef carcasses utilizing bioelectrical impedance technology. *American Society of Animal Science*, 77(11) (1999) 2965–2970.
- [72] M. Chanet, C. Rivière, P. Eynard. Electric impedance spectrometry for the control of manufacturing process of comminuted meat products *Journal of Food Engineering* 42 (1999) 153-159.
- [73] L. Guerrero, I. Gobantes, M. A. Oliver, J. Arnau, M. D. Guardia, J. Elvira, P. Riu, N. Grèbol, J. M. Monfort. Green hams electrical impedance spectroscopy (EIS) measures and pastiness prediction of dry cured hams. *Meat Science* 66 (2004) 289–294.
- [74] M. A. Oliver, I. Gobantes, J. Arnau, J. Elvira, P. Riu, N. Grèbol, et al. Evaluation of the electrical impedance spectroscopy (EIS) equipment for ham meat quality selection. *Meat Science*, 58(3) (2001) 305–312.
- [75] F. R. Harker, J. H. Maindonald. Ripening of Nectarine Fruit (Changes in the Cell Wall, Vacuole, and Membranes Detected Using Electrical Impedance Measurements). *Plant Physiol.* 106(1) (1994) 165–171.
- [76] R. Zywica, G. Pierzynowska-Korniak, J. Wójcik. Application of food products electrical model parameters for evaluation of apple purée dilution. *Journal of Food Engineering* 67 (4) (2005) 413–418.

- [77] R. Bragós, X. Gámez, J. Cairó, P. J. Riu, F. Gódia. Biomass monitoring using impedance spectroscopy. *Annals Of The New York Academy Of Sciences* 873 (1999) 299-305.
- [78] M.I.N. Zhang, J.H.M. Willison. Electrical impedance analysis in plant tissues: in vivo detection of freezing injury. *Canadian Journal of Botany* 70 (1992) 2254–2258.
- [79] J. Niu, J. Lee. A new approach for the determination of fish freshness by electrochemical impedance spectroscopy. *Journal of Food Science*, 65(5) (2000) 780–785.
- [80] H. J. Swatland, F. Darkin, S. J. Naylor, L. Caston, R. D. Moccia. Muscle colour development in Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.), monitored by fibre-optics and electrical impedance. *Aquaculture Research*, 29(5) (1998) 367–372.
- [81] S. Vidacek, H. Medic, K. Botka-Petrak, J. Nezak, T. Petrak. Bioelectrical impedance analysis of frozen sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Food Engineering* 88 (2008) 263–271.
- [82] H. Lizhi, K. Toyoda, I. Ihara. Discrimination of olive oil adulterated with vegetable oils using dielectric spectroscopy. *Journal of Food Engineering* 96 (2010) 167–171.
- [83] K. Toyoda, I. Ihara, Y. Tamaki, M. Ohta. Characterization of Bread Dough Fermentation by Electrical Impedance Spectroscopy. 3rd International Symposium Food And Agricultural Products: Processing And Innovations. Naples - Italy (2007) 24-26.
- [84] Y. Kitamura, K. Toyoda, B. Park. Electric Impedance Spectroscopy for Yogurt Processing. *Food Science and Technology Research* 6 (4) (2000) 310–313.
- [85] Y.G. Vlasov, A.V. Legin, A.M. Rudnitskaya, A. D’Amico, C. Di Natale. «Electronic tongue» — new analytical tool for liquid analysis on the basis of non-specific sensors and methods of pattern recognition. *Sensors and Actuators B* 65 (2000) 235–236
- [86] M. Holmberg, M. Eriksson, C. Krantz-Rülcker, T. Artursson, F. Winquist, A. Lloyd-Spetz, I. Lundström. 2nd Workshop of the Second Network on Artificial Olfactory Sensing (NOSE II). *Sensors and Actuators B* 101 (2004) 213–223.
- [87] M. Cortina-Puig, X. Muñoz-Berbel, M. del Valle, F. J. Muñoz, M. A. Alonso-Lomillo. Characterization of an ion-selective polypyrrole coating and application to the joint determination of potassium, sodium and ammonium by electrochemical impedance spectroscopy and partial least squares method. *Analytica Chimica Acta* 597 (2007) 231–237.

- [88] A. Gutés, F. Céspedes, M. del Valle. Electronic tongues in flow analysis. *Analytica chimica acta* 600 (2007) 90–96.
- [89] J. Han, L. Huang, Z. Gu, S. Tian, S. Deng. Evaluation of meat quality and freshness based on the electronic tongue. *Journal of Chinese Institute of Food Science & Technology* 8(3) (2008) 125-132.
- [90] K. Beullens, D. Kirsanov, J. Irudayaraj, A. Rudnitskaya, A. Legin, B. M. Nicolai, J. Lammertyna. The electronic tongue and ATR–FTIR for rapid detection of sugars and acids in tomatoes. *Sensors and Actuators B* 116 (2006) 107–115.
- [91] A. Rudnitskaya, D. Kirsanov, A. Legin, K. Beullens, J. Lammertyn, B. M. Nicolai, J. Irudayaraj. Analysis of apples varieties – comparison of electronic tongue with different analytical techniques. *Sensors and Actuators B* 116 (2006) 23–28.
- [92] J. M. Barat, L. Gil, E. García-Breijo, M. C. Aristoy, F. Toldrá, R. Martínez-Máñez, J. Soto. Freshness monitoring of sea bream (*Sparus aurata*) with a potentiometric sensor. *Food Chemistry* 108 (2008) 681–688.
- [93] L. Gil, J. M. Barat, E. García-Breijo, J. Ibáñez, R. Martínez-Máñez, J. Soto, E. Llobet, J. Brezmes, M. C. Aristoy, F. Toldrá. Fish freshness analysis using metallic potentiometric electrodes. *Sensors and Actuators B* 131 (2008) 362–370.
- [94] S. Kun, R. Perua, B. Ristic. Impedance spectrometry system for ischemia monitoring and detection. US Patent n° 5807272, 1998.
- [95] J. Bottman. Pulse-based impedance measurement instrument. US Patent n° 5633801, 1995.
- [96] B. Ristic, S. Kun, R. Perua. Development of an impedance spectrometer for tissue ischemia monitoring: application of synchronous sampling principle. *Proceedings, 21 st IEEE/EMBS Northeast Conference, Maine 1995*
- [97] R. Pallas, J. Webster. Bioelectric impedance measurements using synchronous sampling. *IEEEtrans on Biomed Eng.*, vol. 40 n° 8, pp 824-829, 1993.
- [98] J. Morucci, M. Valentinuzzi, B. Rigaud, C. Felice, N. Marsili. Bioelectrical impedance techniques in medicine. *Crit. Rev. Biomed Eng*, vol. 24. issues 4-6, 1996.
- [99] J. Ackman, M. Seitz. Methods of complex impedance measurements in biologic tissue. *Crit. Rev. Biomed Eng*, vol. 11. pp 281-311, 1984.
- [100] Henry P. Hall. How Electronics Changed Impedance Measurements. *Instrumentation and Measurements IMTC (2004) Technology Conference. Como. Italy, 18-20*

- [101] T Radil, P. M. Ramos, A. C. Serra. Impedance Measurement With Sine-Fitting Algorithms Implemented in a DSP Portable Device. *IEEE Transactions on instrumentation and measurement* 57 (2008) 197.
- [102] P. Arpaia, F. Clemente, C. Romanucci. An instrument for prosthesis osseointegration assessment by electrochemical impedance spectrum measurement. *Measurement* 41 (2008) 1040–1044
- [103] J. Hoja, G. Lentka. An analysis of a measurement probe for a high impedance spectroscopy analyzer. *Measurement* 41 (2008) 65–75
- [104] P. M. Ramos, F. M. Janeiro, T. Radil. Comparison of impedance measurements in a DSP using ellipse-fit and seven-parameter sine-fit algorithms. *Measurement* 42 (2009) 1370–1379.
- [105] P.M. Ramos, M. F. da Silva, A. C. Serra. Low frequency impedance measurement using sine-fitting. *Measurement* 35 (2004) 89–96.
- [106] Agilent Technology. Impedance measurement handbook. A guide to measurement technology and techniques 4th Edition. 2009.
- [107] Agilent Technology PN 4294. A New Technologies for Accurate Impedance Measurement (40 Hz to 110 MHz). 2008.
- [108] E. Sanchis, V. González, A. Arnau, J. Ferrero. R. Masot, E. Pérez. Tratamiento y transmisión de señales. *Moliner* 40 (1999) cap. 2.
- [109] K. F. Anderson. Use gradient guard and charge channels. *IEEE Instrumentation & Measurement Magazine* 3 (1998) 24-27.
- [110] M. Altmann, U. Pliquet, R. Suess, E. von Borell “Prediction of lamb carcass composition by impedance spectroscopy” *Journal of Animal Science*. 2004. 82:816–825
- [111] R. Martínez-Máñez, J. Soto, E. García-Breiño, L. Gil, J. Ibáñez, E. Gadea. A multisensor in thick-film technology for water quality control. *Sensors and Actuators A* 120 (2005) 589–595.
- [112] A. Uranga. Tesis doctoral: Desarrollo de un estimulador eléctrico integrado implantable para el control de la micción en lesionados medulares. Universitat Autònoma de Barcelona.
- [113] H. Martens, M. Martens. Parte II: Metodología (Capítulos 4-11) en *Multivariate Analysis of Quality: an Introduction*. London 2001 John Wiley & Sons 77–233.
- [114] P. Geladi, B. Sethson, J. Nyström, T. Lillhonga, T. Lestander, J. Burger. Chemometrics in spectroscopy Part 2. Examples. *Spectrochimica Acta Part B* 59 (2004) 1347– 1357.

- [115] X. Muñoz-Berbel, N. Vigués, J. Mas, M. del Valle, F.J. Muñoz, M. Cortina-Puig. Resolution of binary mixtures of microorganisms using electrochemical impedance spectroscopy and artificial neural networks. *Biosensors and Bioelectronics* 24 (2008) 958–962.
- [116] S. Wold, M. Sjöström, L. Eriksson. PLS-regression: a basic tool of chemometrics, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 58 (2001) 109–130.
- [117] M. Cortina-Puig, X. Muñoz-Berbel, M. A. Alonso-Lomillo, F. J. Muñoz-Pascual, M. del Valle. EIS multianalyte sensing with an automated SIA system. An electronic tongue employing the impedimetric signal. *Talanta* 72 (2007) 774–779.
- [118] A. Riul, H. C. de Sousa, R. R. Malmegrim, D. S. dos Santos, A. Carvalho, F. J. Fonseca, O. N. Oliveira, L. H.C. Mattoso. Wine classification by taste sensors made from ultra-thin films and using neural networks. *Sensors and Actuators B* 98 (2004) 77–82.
- [119] L. Gil. Tesis Doctoral: Diseño de lenguas electrónicas potenciométricas construidas con electrodos metálicos y con tecnología de capa gruesa para análisis de medios complejos. Universidad Politécnica de Valencia. (2007).
- [120] J. Brezmes. Tesis Doctoral: Diseño de una nariz electrónica para la determinación no destructiva del grado de maduración de la fruta. Universitat Politècnica de Catalunya. (2001).
- [121] User Manual for Frequency Response Analysis (FRA) for Windows version 4.9. Eco Chemie B.V. Utrecht. The Netherlands. 2001.
- [122] R. G. Lyons. *Understanding Digital Signal Processing*. Prentice Hall (2001).
- [123] E. García-Breijo. Tesis Doctoral: Diseño de un sistema multisensor en tecnología THICK-FILM; fabricación, caracterización y estudio de su aplicabilidad a parámetros químicos. Universidad Politécnica de Valencia. (2004).
- [124] J.M. Barat, R. Grau, J. B. Ibañez, P. Fito. Post-salting studies in Spanish cured ham manufacturing. Time reduction by using brine thawing-salting, *Meat Science*, 69(2) (2005) 201-208.
- [125] J.M. Barat, S. Rodríguez-Barona, A. Andrés, P. Fito. Influence of increasing brine concentration in the cod salting process, *Journal of Food Science* 65 (7) (2002) 1922–1925.

- [126] W. Albarracín. Tesis doctoral: Salado y descongelado simultáneo en salmuera para la obtención de jamón curado de cerdo de raza ibérica. Directores: J. M. Barat, R. Grau. UPV. Departamento de Tecnología de Alimentos. Valencia, Junio de 2009.
- [127] J.A. Carrasco, F. J. Mingoarraz. Parámetros físicos del proceso de curado del jamón ibérico. II Jornadas el cerdo ibérico y sus productos. Salamanca (2000).
- [128] E. A. Cabeza. Influencia de la actividad de agua (a_w) concentración de NaCl y glucosa sobre el crecimiento bacteriano. Manual de prácticas de microbiología predictiva. Universidad de Pamplona. Facultad de ciencias básicas. Departamento de microbiología.
- [129] R. Grau, W. Albarracín, G. Clemente, J. M. Barat. Study of the Influence of Product and Process Variables in the Salting and Post-salting Stages of PSE Thawed Hams. *International Journal of Food Engineering* 3 (5) (2007) 11.
- [130] A. Fuentes, J.M. Barat, I. Fernández-Segovia, J.A. Serra. Study of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) salting process: Kinetic and thermodynamic control. *Food Control* 19 (2008) 757–763.
- [131] F. Toldrá. Dry-cured ham. *Handbook of Food Science, Technology and Engineering* 4 (2006). CRC Press, Boca Raton, 164-1–164-11.
- [132] A. Fuentes, J.M. Barat, I. Fernández-Segovia, J.A. Serra. Influence of the presence of skin on the salting kinetics of European sea bass. *Food Science and Technology International* 13 (2007) 199-205.
- [133] El sector del queso en España. ICEX. División Productos Agroalimentarios. 2004.
- [134] FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations (03/02/2008) <http://www.fao.org/statistics/yearbook>.
- [135] El sector lácteo español. Agricultura familiar en España. 2007. Alicia Langreo Navarro.
- [136] Normalización y mejora de queso semiduro, tradicional y con reducido contenido en grasa, de leche de cabra. Fundación Alfonso Martín Escudero. 2004.
- [137] E. Renner. Nutritional aspects of cheese. En: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol. 1: General Aspects. (1987) 345-363 (Ed. P.F.Fox). Elsevier Applied Science Publishers, London, UK.
- [138] Real Decreto 1113/2006, de 29 de septiembre, por el que se aprueban las normas de calidad para quesos y quesos fundidos. BOE nº 239. Viernes 6 de octubre de 2006. pp. 34717-34720.

- [139] F.J. Almenara, S. Álvarez, J. Darias, E. Rodríguez, C. Díaz, M. Fresno. Efecto de la maduración en la composición mineral de los quesos de cabra majorera. *Archivos de zootecnia* 56 Sup. 1 (2007) 667-671.
- [140] M. Medina. Principios Básicos para la Fabricación de Quesos. Hojas Divulgadoras del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Rivadeneyra S.A. Madrid (1990).
- [141] Maduración acelerada del queso. *Mundo Lácteo y Cárnico*. Septiembre/Octubre 2005. pp: 17-20. Adaptación libre de Mundo Lácteo y Cárnico a partir de la siguiente fuente: Jordi Saldo Periago. Cambios en la Características de un Queso de Leche de Cabra Sometido a Alta Presión Hidrostática. Aceleración de la Maduración. Memoria Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona. España. 2002.
- [142] AOAC, Association of Official Analytical Chemists (1997). *Official Methods of Analysis*, 16th Ed. Association of Official Analytical Chemists. Arlington, Virginia, USA.
- [143] J. Exler. Composition of Foods: Finfish and Shell Fish Products, Raw, Processed, Prepared. *In: Agriculture Handbook* (1987), No. 8-15. Superintendent of Documents, US Government Printing Office, Washington, DC, p.192.
- [144] R. Jamet, M. Pereira, J. Rabanal, A. Yáñez. Aplicación de una Red Neuronal Artificial para determinar el Nivel de Frescura de un Pescado mediante Procesamiento de Imagen. Departamento de Ingeniería Eléctrica, Universidad de Antofagasta. Chile, 2008.
- [145] B. Pérez-Villareal. Evaluación sensorial de la frescura del pescado. AZTI- Unidad de Investigación Alimentaria. *Seafood today*. 2005.
- [146] H. H. Huss. Pescado fresco: su calidad y cambios de su calidad. FAO. Documento Técnico de Pesca N° 348. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma, 1998.
- [147] M. R. Pascual-Anderson. Microbiología alimentaria. Metodología para alimentos y bebidas. (2000). Ed. Díaz de Santos, S. A., 2ª edición, Madrid, pp 441.
- [148] Veciana-Nogués, M. T. (1999). Mètodes per a avaluar la frescor del peix. *Tecnología i Ciència dels Aliments*, 4: 16-24.
- [149] G. Ólafsdóttir, E. Martinsdóttir, J. Oehlenschläger, P. Dalgaard, B. Jensen, I. Undeland, I. M. Mackie, G. Henahan, J. Nielsen, H. Nilsen. Methods to evaluate fish freshness in research and industry. *Trends Food Sci Tech*, 8 (1997) 258-265.

- [150] P. Morales, A. I. Haza, Y. Ikken, A. Martinez, B. Sanz, P. E. Hernandez. Freshness and quality of fish: inspection and evaluation. II Evaluation methods. *Alimentación, equipos y tecnología* 15 (2) (1996) 139-147.
- [151] I. González, R. Martín, T. García, P. Morales, B. Sanz, P. E. Hernández. Técnicas rápidas para la detección de microorganismos en alimentos I. Técnicas fisicoquímicas. *Alimentación, equipos y tecnología* XIII 4 (1994a) 97-101.
- [152] I. González, R. Martín, T. García, P. Morales, B. Sanz, P. E. Hernández. Técnicas rápidas para la detección de microorganismos en alimentos II. Técnicas inmunológicas y genéticas. *Alimentación, equipos y tecnología* XIII 5 (1994b) 79-83.
- [153] E.Z. Panagoua, N. Sahgal, N. Magan, G.-J.E. Nychas. Table olives volatile fingerprints: Potential of an electronic nose for quality discrimination. *Sensors and Actuators B* 134 (2008) 902–907.
- [154] P. Malle, S. H. Tao. Rapid quantitative determination of trimethylamine using steam distillation. *Journal of Food Protection* 50 (9) 1987 756-760.
- [155] M.P. Gómez-Carracedo, J.M. Andrade, D.N. Rutledge, N.M. Faber. Selecting the optimum number of partial least squares components for the calibration of attenuated total reflectance-mid-infrared spectra of undesigned kerosene samples. *Analytica Chimica Acta* 585 (2007) 253–265.
- [156] S. Cakli, B. Kilinc, A. Cadun, T. Dincer, S. Tolasa. Quality differences of whole ungutted sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) while stored in ice. *Food Control* 18 (2007) 391–397.
- [157] V. R. Kyrana, V. Lougovois; D. Valsamis. Assessment of shelf-life or maricultured gilthead sea bream (*Saparus aurata*) stored in ice. *International Journal of Food Science and Technology* 32 (1997) 339-347.
- [158] E. Orban, F. Sinesio, F. Paoletti. The Functional Properties of the Proteins, Texture and the Sensory Characteristics of Frozen Sea Bream Fillets (*Sparus aurata*) from Different Farming Systems. *Food Science and Technology* 30 (1997) 214–217.
- [159] J. J. Connell. Method of assessing and selecting for auality. En: *Control fish quality* (4th ed) (1995). Fishing News Books Ltd, Surrey, pp 157, 159-160.
- [160] H. H. Huss. Quality and quality changes in fresh fish. En Huss, H. H. (Ed.) *FAO Fisheries Technical Paper* 348 (1995) Rome, pp. 195.

- [161] V. R. Kyranan, V. P. Lougovois. Sensory and chemical and microbial assessment of farm-raised European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in melting ice. *International Journal of Food Science and Technology* 37 (2002) 319-328.
- [162] E. Orban, G. Di Lena, I. Casini, T. Nevigato, G. Santaroni, A. Marzetti, R. Carponi. Quality characteristics of sea bass intensively reared and from lagoon as affected by growth conditions and the aquatic environment. *Journal of Food Science* 67 (2002) 542-546.
- [163] M.J. Caballero, M. Betancor, J.C. Escrig, D. Montero, A. Espinosa de los Monteros, P. Castro, R. Ginés, M. Izquierdo. Post mortem changes produced in the muscle of sea bream (*Sparus aurata*) during ice storage. *Aquaculture* 291 (2009) 210–216.
- [164] H. K. Davis. Calidad y alteración del pescado crudo. En: *El pescado y los productos derivados de la pesca*. (1995) Ed. Acribia, S.A., Zaragoza, pp. 226-233.
- [165] D.L. Marshall, P.L.W. Lehigh. Comparison of impedance, microbial, sensory, and pH methods to determine shrimp quality. *J. Aquatic Food Product Tech.* 6 (1997) 17–31.
- [166] Inge S. Helland. Some theoretical aspects of partial least squares regression. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 58 (2001) 97–107.
- [167] S.G. Bajwa, J. Kandaswamy, J.K. Apple. Spectroscopic evaluation of the nutrient value of ground beef patties. *Journal of Food Engineering* 92 (2009) 454–460.
- [168] J. L. Valencia, J. Diaz-Llanos, Sainz Calleja. Número de componentes a retener por validación cruzada. En: *Regresión PLS en las ciencias experimentales*. (2003) Editorial Complutense S. A., Madrid, pp. 47-50.
- [169] Y. Tian-Hua, L. Jing, Z. Yi-Xin. Using electrical impedance detection to evaluate the viability of biomaterials subject to freezing or thermal injury. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378 (2004) 1793–1800.
- [170] N. Wang, N. Zhang, M. Wang. Wireless sensors in agriculture and food industry - Recent development and future perspective. *Computers and Electronics in Agriculture* 50 (2006) 1–14.

