

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

**Utilización de la Espectroscopía de Reflectancia en el Infrarrojo
Cercano (NIRS), para la Predicción de la Composición
Nutricional de Sopas Crema**

Tesis presentada como parte de los
requisitos para optar al grado de
Licenciado en Ingeniería en Alimentos

Patricio Javier Acuña Pérez

Valdivia - Chile

2005

Profesor patrocinante:

Daniel Alomar C.

Ingeniero agrónomo

M.Sc

Instituto de Producción Animal

Facultad de Ciencias Agrarias

Profesores informantes:

Wilhelm Heimlich M.

Químico

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Facultad de Ciencias Agrarias

Emilio Teixidó M.

Químico

Diplomado en Tecnología de Alimentos

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Facultad de Ciencias Agrarias

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios y sobre todo a mi mamá Sonia Pérez Badilla, por su esfuerzo y por su ayuda durante estos años en que transcurrió mi vida universitaria, ya que sin ella jamás hubiese llegado a término.

A mi profesor patrocinante Daniel Alomar, por sus consejos y su buena disposición en todas las dudas que me surgieron durante el transcurso de este trabajo.

A la señora Rita Fuchslocher, jefa del Laboratorio de Nutrición Animal, por su disponibilidad y amabilidad.

A mis profesores informantes Wilhelm Heimlich y en especial Emilio Teixidó, por su paciencia y su ayuda en las dudas durante la tesis.

A mis amigos y amigas y a todos quienes de una u otra forma me ayudaron y me apoyaron durante el transcurso de esta investigación.

ÍNDICE DE MATERIAS

| Capítulo | | Página |
|-----------|--|--------|
| 1 | INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2 | REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | 3 |
| 2.1 | Crema “Años Dorados” | 3 |
| 2.2 | Fundamentos básicos sobre espectroscopía | 5 |
| 2.2.1 | Ondas electromagnéticas | 5 |
| 2.2.2 | Bases moleculares | 7 |
| 2.3 | El espectro electromagnético | 8 |
| 2.4 | La radiación infrarroja | 9 |
| 2.5 | Espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) | 10 |
| 2.5.1 | Fundamentos de la técnica NIRS | 10 |
| 2.5.2 | Historia de la técnica NIRS | 13 |
| 2.5.3 | Aplicaciones de la técnica NIRS | 14 |
| 2.5.4 | El equipo NIRS | 15 |
| 2.5.4.1 | Presentación de las muestras para análisis | 18 |
| 2.5.4.2 | Pruebas de diagnóstico | 18 |
| 2.5.4.3 | Fuentes de variación de la técnica NIRS | 19 |
| 2.5.4.3.1 | Tamaño de partícula | 19 |
| 2.5.4.3.2 | Ruido | 19 |
| 2.5.4.3.3 | Temperatura | 19 |
| 2.5.4.3.4 | Presentación de la muestra | 20 |
| 2.5.4.3.5 | Humedad | 20 |
| 2.5.5 | Características de las muestras para la calibración | 20 |
| 2.5.6 | Calibración del instrumento | 20 |

| | | |
|----------|---|----|
| 2.5.7 | Tratamientos matemáticos | 22 |
| 2.5.8 | Muestras aberrantes | 24 |
| 2.5.9 | Análisis de regresión | 25 |
| 2.5.9.1 | Regresiones con una parte del espectro | 25 |
| 2.5.9.2 | Regresiones con el espectro completo | 26 |
| 2.5.10 | Corrección de dispersión | 27 |
| 2.5.11 | Selección de ecuaciones | 28 |
| 2.5.12 | Validación | 29 |
| 2.5.12.1 | Validación cruzada | 29 |
| 2.5.12.2 | Validación externa | 31 |
| 3 | MATERIAL Y MÉTODO | 33 |
| 3.1 | Ubicación del estudio | 33 |
| 3.2 | Características de las muestras | 33 |
| 3.3 | Toma de espectros | 34 |
| 3.4 | Análisis químicos de referencia | 35 |
| 3.5 | Desarrollo de ecuaciones de calibración | 36 |
| 3.5.1 | Tratamientos matemáticos | 36 |
| 3.5.2 | Métodos de regresión | 37 |
| 3.5.3 | Corrección de dispersión | 37 |
| 3.5.4 | Validación y selección de ecuaciones | 37 |
| 4 | PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS | 38 |
| 4.1 | Caracterización química de las muestras | 38 |
| 4.2 | Desarrollo de la calibración | 39 |
| 4.2.1 | Proteínas | 39 |
| 4.2.2 | Cenizas | 42 |
| 4.2.3 | Materia grasa | 45 |
| 4.2.4 | Humedad | 48 |
| 4.2.5 | Carbohidratos disponibles | 50 |

| | | |
|---|--------------|----|
| 5 | CONCLUSIONES | 57 |
| 6 | RESUMEN | 59 |
| | SUMMARY | 60 |
| 7 | BIBLIOGRAFÍA | 61 |
| | ANEXOS | 70 |

ÍNDICE DE CUADROS

| Cuadro | | Página |
|--------|--|--------|
| 1 | Composición química del producto terminado por cada 100 g y por porción de consumo | 4 |
| 2 | Enlaces químicos y constituyentes nutricionales detectados en diversas longitudes de onda del infrarrojo cercano | 12 |
| 3 | Cantidad de muestras analizadas por sabor y fabricante | 34 |
| 4 | Análisis químicos y sus referencias | 35 |
| 5 | Tratamientos matemáticos usados en la calibración | 36 |
| 6 | Composición nutricional de las muestras de sopa utilizadas en la calibración | 38 |
| 7 | Mejores ecuaciones obtenidas para proteínas | 39 |
| 8 | Mejores ecuaciones obtenidas para cenizas | 43 |
| 9 | Mejores ecuaciones obtenidas para materia grasa | 46 |
| 10 | Mejores ecuaciones obtenidas para humedad | 48 |
| 11 | Mejores ecuaciones obtenidas para carbohidratos disponibles por método químico | 51 |
| 12 | Mejores ecuaciones obtenidas para carbohidratos disponibles por diferencia | 53 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|--------|--|--------|
| 1 | Modelo hipotético de movimientos vibracionales de una molécula de agua | 7 |
| 2 | El espectro electromagnético | 8 |
| 3 | Figura esquemática de detectores NIRS, para transmitancia y reflectancia | 17 |
| 4 | Esquema de diferenciación | 23 |
| 5 | Relación entre los valores de referencia y su predicción mediante NIRS para proteínas | 42 |
| 6 | Relación entre los valores de referencia y su predicción mediante NIRS para cenizas | 45 |
| 7 | Relación entre los valores de referencia y su predicción mediante NIRS para materia grasa | 47 |
| 8 | Relación entre los valores de referencia y su predicción mediante NIRS para humedad | 50 |
| 9 | Relación entre los valores de referencia y su predicción mediante NIRS para carbohidratos disponibles por método químico | 52 |
| 10 | Relación entre los valores obtenidos por diferencia y su predicción por NIRS | 55 |

INDICE DE ANEXOS

| Anexo | | Página |
|-------|--|--------|
| 1 | Calibraciones NIRS para proteínas | 71 |
| 2 | Calibraciones NIRS para cenizas | 72 |
| 3 | Calibraciones NIRS para materia grasa | 73 |
| 4 | Calibraciones NIRS para humedad | 74 |
| 5 | Calibraciones NIRS para carbohidratos disponibles por método químico | 75 |
| 6 | Calibraciones NIRS para carbohidratos disponibles por diferencia | 76 |
| 7 | Celda de reflectancia de cuarzo y materiales para la preparación de las muestras | 77 |
| 8 | Muestra de sopa crema deshidratada en cápsula de de cuarzo | 78 |
| 9 | Muestras de sopas en envases de plástico | 79 |
| 10 | Equipo NIRSystems 6500 con cápsula para análisis | 80 |
| 11 | Equipo NIRSystems 6500 con computador adjunto | 81 |

1 INTRODUCCIÓN

La crema “Años Dorados” es un producto basado en harina de cereales y leguminosas, enriquecido con vitaminas, minerales y ácidos grasos esenciales, el cual se encuentra en cuatro sabores: lenteja, arveja, espárragos y verduras. El producto es destinado a personas de la tercera edad con el fin de contribuir a mantener y mejorar su dieta. Las cremas son distribuidas por el Ministerio de Salud a través del Programa de Alimentación Complementaria del Adulto Mayor, en los consultorios a lo largo del país.

Las cremas antes de ser distribuidas en los consultorios son sometidas a un control de calidad, el cual tiene como finalidad que el producto se encuentre dentro de los parámetros establecidos en lo que concierne a su composición nutricional y sus características físicas, microbiológicas y organolépticas. Es por esto que el presente trabajo de investigación pretende contribuir al control de este producto en lo que respecta al análisis químico de sus componentes por medio de la técnica de Espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS, sigla en inglés), ya que de esta manera se puede agilizar el trabajo de análisis debido a que esta técnica posee grandes ventajas, siendo su rapidez y la precisión de los resultados obtenidos, sus características más importantes.

Para que sea eficaz el análisis de las cremas, es necesario que el equipo NIRS sea calibrado con muestras de composición química conocida, las cuales deben ser analizadas por medio de métodos de referencia.

Hipótesis.

Es posible determinar la composición proximal de sopas crema en polvo, mediante la utilización de la técnica de espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS).

Objetivos generales.

Desarrollar ecuaciones que permitan predecir la composición química de las cremas “Años Dorados”, las cuales relacionen los datos espectrales con los determinados por los métodos de referencia.

Objetivos específicos.

- Evaluar el efecto de la aplicación de distintos tratamientos matemáticos sobre la calidad de la calibración obtenida.
- Evaluar las ecuaciones obtenidas a través de una validación cruzada, en base a términos estadísticos como el coeficiente de determinación de validación cruzada ($1-VR$) y el error estándar de validación cruzada (SECV).

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Crema “Años Dorados”

La crema “Años Dorados” es un producto alimenticio enriquecido con vitaminas y sales minerales, bajo en sodio y libre de colesterol. Se encuentra en distintas variedades de sabores, los cuales son: arveja, lenteja, verduras y espárragos.

La crema es un alimento basado en harina de leguminosas, cereales y almidones precocidos o pregelatinizados por extrusión. Además contiene aceites vegetales, verduras deshidratadas, caseinatos, calcio, fósforo, magnesio, vitamina C, niacina, vitamina E, zinc, hierro, vitamina B6, vitamina B1, ácido fólico, vitamina D, vitamina B12 y aditivos permitidos (MARTÍNEZ, 2002).

No se puede utilizar como ingredientes los siguientes alimentos: azúcares simples en cualquier forma de presentación (sacarosa, glucosa, fructuosa, etc), yema de huevo, lupino, harina de soya, aceites de origen marino o materias grasas que contengan ácido erúxico (CHILE. MINISTERIO DE SALUD, 2004).

De acuerdo a especificaciones técnicas el producto debe tener la siguiente composición química:

CUADRO 1. Composición química del producto terminado por cada 100 g y por porción de consumo.

| | 100 g | 1 Porción (50 g) |
|------------------------------------|--------------|-------------------------|
| Energía | 400 Kcal | 200 Kcal |
| Humedad (máximo) | 6 g | 3 g |
| Cenizas (máximo) | 4,2 g | 1,9 g |
| Proteínas (mínimo) | 13 g | 6,5 g |
| Lípidos (máximo) | 11 g | 5,5 g |
| Carbohidratos disponibles (mínimo) | 62,3 g | 31,2 g |
| Fibra dietética total (máximo) | 6,5 g | 2,5 g |

FUENTE: CHILE. MINISTERIO DE SALUD (2004).

Las materias primas utilizadas en la fabricación del producto son harinas de cereales (arroz, trigo), de leguminosas, aceites vegetales restringido a canola y maravilla, soya, maíz. Los almidones empleados corresponden a maltodextrinas y/o almidones de papa o maíz (MARTÍNEZ, 2002).

Los almidones y harinas pueden ser sometidos, por separado, a hidrólisis enzimática, previo al proceso de extrusión. Posteriormente, se agrega aproximadamente un 5% de agua para facilitar la cocción de los gránulos de almidón y las verduras (MARTÍNEZ, 2002).

Los equipos de extrusión a utilizar, así como los mezcladores, dependen de cada fábrica. Se trabaja con alta presión a una temperatura de 140° C por 2-6 s (MARTÍNEZ, 2002).

Después de la extrusión se produce la molienda y posteriormente el mezclado, realizado en mezclador de cinta por alrededor de 20 min, donde se agregan los aceites vegetales, maltodextrinas, verduras deshidratadas,

vitaminas y minerales según especificaciones, además de saborizantes y colorantes permitidos. Las vitaminas y minerales junto a los saborizantes y colorantes son previamente mezclados para mejorar su dispersión. El aceite vegetal a 60° C es agregado por aspersion por el mismo motivo. Finalmente el producto es envasado en bolsas de material trilaminado de 1 kg (MARTÍNEZ, 2002).

2.2 Fundamentos básicos sobre espectroscopía

La palabra espectroscopia deriva de la raíz latina “*spectrum*” (aparición, imagen) y de la raíz griega “*skopia*”. Consiste en la medición e interpretación de fenómenos de absorción selectiva de la luz que entra en la muestra o por la emisión de ciertas formas de luz, como resultado de la muestra que pierde algo de su energía interna. En términos generales, la espectroscopia involucra transferencia de energía entre la luz y la materia (MILLER, 2001).

2.2.1 Ondas electromagnéticas. Una onda electromagnética es una perturbación vibracional por medio de la cual se transmite energía (CHANG, 2001). La longitud de onda (λ , *lambda*), es la distancia entre dos puntos idénticos en ondas sucesivas. El número de longitudes de onda completas o ciclos que pasan por un punto dado en 1 s es la frecuencia de la onda (ν , *nu*). La amplitud de la onda es la distancia vertical entre la línea media de la onda y su cresta y está relacionada con la velocidad de la radiación (BROWN et al., 2004). Para una onda que se mueve en el vacío, su velocidad c , su longitud de onda λ y su frecuencia ν , están relacionadas de una manera sencilla, como lo indica la siguiente fórmula (RUBINSON y RUBINSON, 2001).

$$c = \lambda \nu \quad (2.1)$$

Donde c es la velocidad de la luz, λ es la longitud de onda y ν es la frecuencia de la onda (SKOOG et al., 2001).

La velocidad a la cual viajan las ondas electromagnéticas es la velocidad de la luz, que corresponde a $3 \cdot 10^8 \text{ m s}^{-1}$ y la frecuencia de una onda se expresa en ciclos/seg, unidad que se llama Hertz (Hz) (BROWN et al., 2004).

En 1900 Max Plank (1858-1947) propuso que la energía sólo puede ser liberada o absorbida por los átomos en “paquetes” de cierto tamaño mínimo, al cual dio el nombre de cuanto o fotón (cantidad fija), que es la cantidad más pequeña de energía que se puede emitir o absorber como radiación electromagnética (BROWN et al., 2004). La luz puede ser considerada por tener características de partícula y características de onda. El concepto de energía lumínica resulta de la combinación de ambas características (MILLER, 2001). La luz cuando interacciona con átomos y moléculas, tiene naturaleza de partículas de energía que son los fotones. Por lo tanto, la frecuencia ν de la radiación electromagnética es proporcional a la energía del fotón (RUBINSON y RUBINSON, 2001). La energía E de un solo cuanto es igual a una constante multiplicada por su frecuencia, o sea, la energía de una partícula de luz está definida como se señala en la siguiente ecuación (BROWN et al., 2004; MILLER, 2001; RUBINSON y RUBINSON, 2001).

$$E = h \nu = h c / \lambda \quad (2.2)$$

Donde h es la constante de Plank ($6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J s}$). Por lo que la longitud de onda está asociada con un cuanto de energía. De esta manera se puede calcular la energía de un fotón, la cual aumenta con su frecuencia y es inversamente proporcional a su longitud de onda. Por consiguiente una frecuencia alta o una longitud de onda corta significa una gran energía (FOX y WHITESELL, 2000).

2.2.2 Bases moleculares. En una molécula se presentan tres tipos de niveles energéticos: electrónicos, vibracionales y rotacionales. Para provocar cambios en cada uno de estos tipos de niveles es preciso utilizar diferentes cantidades de energía, lo que hace que sus efectos se muestren en diferentes regiones del espectro (LARRAHONDO *et al.*, 2001).

Una molécula de una sustancia se puede representar como un sistema de pequeñas esferas de diferentes masas, unidas entre sí mediante resortes. En este modelo hipotético las esferas corresponden a los átomos y los resortes a los enlaces químicos. Así para el caso particular de la molécula de agua se puede considerar el modelo indicado en la FIGURA 1 (LARRAHONDO *et al.*, 2001).

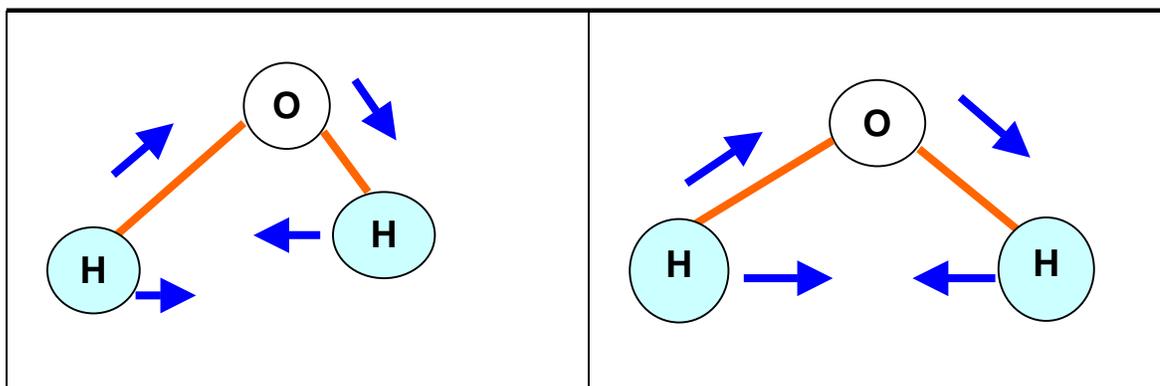


FIGURA 1. Modelo hipotético de movimientos vibracionales de una molécula de agua.

FUENTE: LARRAHONDO *et al.*, (2001).

En una molécula, los átomos vibran dentro de un determinado espacio. Existen muchos tipos de vibraciones entre los átomos de una molécula, los cuales se agrupan en dos clases fundamentales: Vibraciones de valencia (tensión o elongación), en donde los átomos se aproximan y se alejan periódicamente sobre su eje común y las vibraciones de deformación (torsión, flexión o tijera), en donde se modifican los ángulos entre los enlaces de acuerdo

con la estructura molecular (LARRAHONDO *et al.*, 2001). SHENK y WESTERHAUS (1994), señalan que las vibraciones de elongación o de alargamiento ocurre a frecuencias más altas y una baja longitud de onda que las vibraciones de deformación o de curvatura.

BOKOBZA (1998), señala que a temperatura ambiente la mayoría de las moléculas están el nivel vibracional cero ($v = 0$) y pueden pasar al nivel $v = 1$, lo que corresponde a la transición fundamental que domina la absorción en el espectro infrarrojo. Las siguientes transiciones, como pasar de $v = 1$ a $v = 2$ o de $v = 2$ a $v = 3$, tienen bandas mucho más débiles que en la zona de absorción fundamental, las cuales se denominan “bandas calientes”, las cuales no tiene la misma frecuencia que la banda fundamental, lo que hace que las moléculas no oscilen armónicamente.

2.3 El espectro electromagnético

Los diversos tipos de ondas electromagnéticas se muestran en la FIGURA 2. Como se ve no hay un punto de división claro entre un tipo de onda y el siguiente.

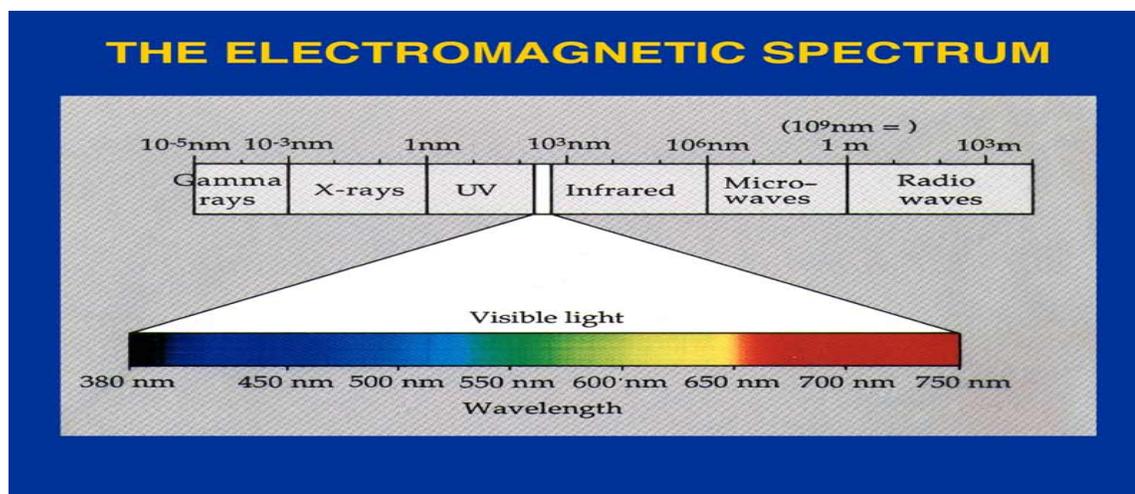


FIGURA 2. El espectro electromagnético.

FUENTE: MABRY (2003).

Las ondas de radio son el resultado de cargas que se aceleran a través de alambres de conducción. Las microondas tienen longitudes de ondas que varían entre aproximadamente 1 mm y 30 cm y son generadas también por dispositivos electrónicos. Las ondas infrarrojas tienen longitudes de onda que varían de 1 mm hasta longitudes de onda más larga de luz visible, $7 \cdot 10^{-7}$ m. Estas ondas, producidas por cuerpos calientes y moléculas, son absorbidas rápidamente por la mayor parte de los materiales. La energía infrarroja absorbida por una sustancia aparece como calor debido a que la energía agita los átomos del cuerpo, aumentando su movimiento vibratorio y rotacional, lo cual origina un aumento de la temperatura. La luz visible, la forma más familiar de onda electromagnética, es aquella parte del espectro electromagnético que el ojo puede detectar. La luz producida por el reacomodo de electrones en átomos y moléculas. La radiación infrarroja es producida por los cuerpos. La luz ultravioleta abarca longitudes de onda que varían de aproximadamente $3.8 \cdot 10^{-7}$ m (380 nm) a $6 \cdot 10^{-8}$ m (60 nm). Los rayos X son ondas electromagnéticas con longitudes de onda en el intervalo de aproximadamente 10^{-8} m (10 nm) a 10^{-13} m (10^{-4} nm). La fuente más común de rayos X es la desaceleración de electrones de alta energía que bombardean a un blanco metálico. Los rayos gamma son emitidos por núcleos radiactivos (^{60}Co ó ^{137}Cs) y durante ciertas reacciones nucleares. Tienen longitudes de onda que van aproximadamente de 10^{-10} m a menos 10^{-14} m (SERWAY, 1997).

2.4 La radiación infrarroja

La región del infrarrojo del espectro electromagnético se extiende desde el extremo del rojo del espectro visible hasta la región de las microondas (SERWAY, 1999).

En la actualidad se considera infrarrojo el intervalo comprendido entre $4 \cdot 10^{14}$ Hz y $3 \cdot 10^{11}$ Hz (0,75 μm a 1 nm; 1,7 eV a 10^{-3} eV). Se suele subdividir

en cuatro regiones: cercano (750 nm a 3 μm), intermedio (3 μm a 6 μm), lejano (6 μm a 15 μm) y extremo (15 μm a 1,0 mm), aunque evidentemente se trata de una subdivisión poco rígida (CABRERA *et al.*, 1993).

FOX y WHITESELL (2000) señalan que el principio fundamental de la espectroscopia infrarroja es que se absorbe radiación infrarroja cuando coinciden la energía radiante y la frecuencia de un movimiento molecular específico, que por lo común es la flexión o alargamiento de los enlaces.

2.5 Espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS)

2.5.1 Fundamentos de la técnica NIRS. Es un método espectroscópico de variadas posibilidades de aplicación en amplios campos, uno de los cuales es el análisis químico de alimentos. Permite efectuar mediciones cuantitativas sin que los componentes o fracciones de interés sean previamente aislados, por lo tanto, esta tecnología permite efectuar diferentes mediciones de manera rápida, que supera ampliamente el tiempo que se emplea en los análisis químicos tradicionales, con un considerable ahorro de personal (ANRIQUE *et al.*, 1996). Por su parte, GARRIDO-VARO *et al.*, (1998), señala que el NIRS es una técnica capaz de examinar y de explorar una muestra hasta su nivel molecular.

El fundamento de esta técnica es el uso de curvas características o espectros de los materiales analizados, los cuales muestran picos situados en longitudes de onda correspondientes a bandas de absorción originadas a partir de los distintos componentes orgánicos presentes en las muestras (BROWN *et al.*, 2004). En otras palabras, este método se basa en que cuando la luz incide sobre una muestra, una parte de los fotones es transmitida a través de la misma, siendo el resto absorbido. La absorción de energía por la muestra produce que los enlaces C-H, O-H y N-H, componentes principales de la

estructura básica de las sustancias orgánicas, vibren en distintos formatos (Givens y Deaville, 1999, citado por COZZOLINO et al., (2003).

OSBORNE et al., (1993), señalan que la radiación total que incide en una muestra es igual a la suma de la radiación absorbida (P_A), transmitida (P_T) y reflejada (P_R).

$$P_0 = P_A + P_T + P_R \quad (2.3)$$

Los equipos NIRS cuando trabajan en transmisión, el componente de reflexión es eliminado por un control o solvente blanco, el cual es también usado para medir P_0 . En reflectancia, P_T es eliminada, de manera que la luz es absorbida o reflejada, pero no atraviesa la muestra, el solvente blanco es reemplazado por una cerámica de referencia blanca. En reflectancia parte de la luz absorbida es reemitida en forma de reflexión difusa y es la que posee información relacionada a la composición (MURRAY, 1988).

SHENK y WESTERHAUS (1994) señalan que las absorciones moleculares en la región del infrarrojo cercano se deben principalmente a enlaces X-H, donde X corresponde a carbono, nitrógeno u oxígeno, además se incluyen C=O, C=C y haluros metálicos. El CUADRO 2 presenta los distintos constituyentes posibles de ser analizados mediante la técnica NIRS, además de los enlaces implicados en estos componentes y sus correspondientes longitudes de onda.

CUADRO 2. Enlaces químicos y constituyentes nutricionales detectados en diversas longitudes de onda del infrarrojo cercano.

| Longitud de onda (nm) | Constituyente | Enlace asignado |
|-----------------------|----------------------|-----------------|
| 1200 | Lípido | C-H |
| 1440 | Agua y carbohidratos | O-H |
| 1730 | Lípido | C-H |
| 1780 | Lípido | C-H |
| 1940 | Agua | O-H |
| 1980 | Proteína | N-H |
| 2080 | Carbohidratos | O-H |
| 2180 | Proteína | C=O y N-H |
| 2320 | Lípido | C-H |
| 2350 | Lípido | C-H |

FUENTE: ALOMAR Y FUCHSLOCHER (1998) y OSBORNE et al., (1993)

El análisis cuantitativo es posible debido a que las moléculas absorben a distintas longitudes de onda, originando un patrón de absorción, el que correlaciona la composición química y la concentración de determinado constituyente dentro de la muestra (Davies y Grant, 1987, citado por ALOMAR y FUCHSLOCHER, 1998). El espectro de determinado material, obtenido con radiación infrarroja cercana, es el resultado de la absorción de energía (luz) por moléculas orgánicas en particular, las que tienen gran número de uniones del tipo C-H, N-H y O-H (APPEL, 1996).

El análisis cuantitativo de la espectroscopia NIR se basa, como en la espectroscopia ultravioleta y visible, en la ley de Beer-Lambert (LARRAHONDO et al., 2001). La cual establece que la concentración de los enlaces moleculares es lineal al log 1/T, pudiendo utilizarse también la ecuación para reflectancia

difusa, lo que se expresa en la siguiente ecuación (SHENK y WESTERHAUS, 1994).

$$A = \log 1/R \quad (2.4)$$

Donde la intensidad de la luz reflejada por la muestra es determinada en relación con la luz reflejada por un material estándar, el cual es usualmente una placa de cerámica (LARRAHONDO *et al.*, 2001).

2.5.2 Historia de la técnica NIRS. La historia del infrarrojo cercano comienza en 1800 con Herschel y sus experimentos para encontrar una forma para filtrar calor desde un telescopio demostrando que existía radiación más allá del espectro visible conocido, siendo su descubrimiento largamente ignorado (BARTON II, 2000).

En 1949 el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, inició los primeros programas de estudio relacionados con espectroscopia, mediante el programa de investigación para desarrollar métodos objetivos de medición de calidad de huevos. Se utilizó, en esa oportunidad, el espectrofotómetro Beckman DU para evaluación por medio de transmitancia de las propiedades de la cáscara, yema y clara, detección de sangre y frescura del huevo, todo esto en un rango comprendido entre 550-950 nm. Los resultados de estos estudios no fueron los esperados, por lo que éstos nunca fueron publicados (NORRIS, 1996).

El inicio de la técnica NIRS como una técnica emergente dentro del mundo analítico, comienza en la década de 1960, con los trabajos de Karl Norris en el US Department of Agriculture, Agriculture Research Service (BARTON II, 2000). En el transcurso de sus trabajos, Karl Norris y sus colaboradores experimentaron con un segmento del espectro electromagnético comprendido entre 700-2500 nm (región infrarroja cercana). En 1968, Ben-Gera

y Norris, aplicaron por primera vez esta técnica utilizando el modo de reflectancia, en el análisis de productos agrícolas, midiendo proteínas y humedad en granos de trigo y niveles de aceite en semillas de soya (NORRIS, 1996).

Karl Norris junto con otros colaboradores en 1976, aplicaron la espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano a los análisis de productos agrícolas y reconocieron el gran potencial de la tecnología de reflectancia difusa para análisis rápidos de proteínas, humedad y contenido de lípidos en granos o semillas de soya (LARRAHONDO *et al.*, 2001). Para esto utilizó nuevas longitudes de onda, con un rango más amplio entre 1600 a 2400 nm aproximadamente. En 1978 se creó la primera unidad móvil NIRS y el USDA NIRS FORAGE NETWORK comenzó a desarrollar un software más avanzado, además de realizar investigaciones y preparar tecnología que luego fueron transferidas al sector privado (SHENK y WESTERHAUS, 1984).

Posteriormente otros investigadores, como Meyer en Sudáfrica, en 1983 y 1986, aplicaron con éxito la espectroscopia NIR para el diagnóstico de nitrógeno en tejido foliar y mineralización de nitrógeno en suelos (LARRAHONDO *et al.*, 2001).

2.5.3 Aplicaciones de la técnica NIRS. Entre las aplicaciones estudiadas para esta técnica están análisis en granos, cerveza, leche, carne y productos derivados, forrajes y productos de confitería (ALOMAR y FUCHSLOCHER, 1998; PERMANYER y PÉREZ, 1989). El uso más extendido de esta técnica ha sido en la determinación de proteínas, humedad, almidón, aceites, lípidos y celulosa (SKOOG *et al.*, 2001), en los productos antes mencionados y en otras áreas como la petroquímica, farmacéutica, medicina, textil, geología, etc.

Entre las ventajas que presenta el NIRS, es que es una técnica no destructiva, no requiere reactivos químicos, rapidez en el análisis, de gran precisión y exactitud, nula o poca preparación de las muestras, es una técnica rentable y se pueden realizar determinaciones simultáneas de varios componentes (ALOMAR y FUCHSLOCHER, 1998; BATTEN, 1998; KUROWSKI et al., 1998; RUIZ, 2001).

La mayor limitación del NIRS en el análisis de alimentos es que depende de métodos químicos de análisis, los cuales en su mayoría fueron desarrollados en el siglo XIX (OSBORNE et al., 1993).

2.5.4 El equipo NIRS. Existen variados modelos de instrumentos disponibles en el mercado, pero todos se caracterizan por estar compuestos principalmente por 5 componentes según (Givens et al., 1997, citado por DE VICENZI, 2002).

- 1) Una fuente de energía
- 2) Un selector para discriminación de longitudes de onda
- 3) Una forma de presentación de muestras
- 4) Un detector para convertir la energía radiante en una señal eléctrica
- 5) Un procesador de señales.

OSBORNE et al., (1993), señalan en relación a la fuente energía, que pueden existir algunas variaciones; en este caso, los espectrofotómetros pueden ser de tres tipos: dispersivos, interferométricos y no termal. Los dos primeros poseen una fuente de radiación termal, lo que los diferencia del último. Los sistemas dispersivos pueden ser por prismas o monocromadores y los sistemas interferométricos no son dispersivos.

LARRAHONDO et al., (2001), señalan que existen dos tipos generales de instrumentos NIR en la actualidad: los instrumentos de filtros fijos, disponibles con 6, 10 o 19 filtros para proporcionar longitudes de onda

específicas. Los instrumentos de filtro fijo utilizan una serie de filtros montados en una rueda giratoria, permitiendo que la muestra sea sucesivamente iluminada durante breves períodos con la radiación correspondiente a cada uno de los filtros. Estos instrumentos de filtro fijo miden $\log 1/R$ en longitudes de onda discretas y son satisfactorios para aplicaciones donde los constituyentes están bien definidos y con longitudes de onda apropiadas bien conocidas (DEAVILLE y FLINN, 2000). El otro tipo de instrumento corresponde a los de barrido continuo, los cuales generan lecturas de absorbancia ($\log 1/R$) cada 2 nm para 700 longitudes de onda entre 1100 y 2500 nm. Debido a la información espectral que se obtiene, a su exactitud mejorada y flexibilidad para procesar la información, estos instrumentos son ampliamente utilizados en laboratorios comerciales y de investigación. Los espectros de barrido continuo pueden ser normalizados, es decir, convertidos a un espectro de primera y segunda derivada, en tanto que los espectros obtenidos con un equipo de filtros no pueden convertirse (LARRAHONDO *et al.*, 2001).

OSBORNE *et al.*, (1993), mencionan en relación a los equipos de barrido, el analizador óptico de multicanales, el cual es un moderno monocromador, rápido, compacto y de bajo costo y mencionan además los equipos NIRS en línea los cuales se ubican en el proceso de producción.

Por otra parte, SCHMIDT (1998), señala la existencia de otros tipos de espectrofotómetros, como son el espectrofotómetro comercial de doble emisión y el espectrofotómetro Fourier. WETZEL (2001), menciona otros instrumentos más contemporáneos, como lo son el equipo con arreglo de diodos (diode array), el cual no posee partes móviles, instrumentos con filtros de interferencia, instrumentos monocromadores con red de difracción e instrumentos en miniatura.

En cuanto a la muestra que se quiere analizar y el equipo a utilizar, LARRAHONDO *et al.*, (2001), señala que si ésta es un sólido, se utilizan preferentemente mediciones de reflectancia difusa, para lo cual la luz penetra perpendicularmente la muestra y es posteriormente reflejada y colectada por un detector ubicados a 45° del rayo de la luz incidente. Si la muestra es líquida, se requiere un detector de transmitancia y la radiación que no es absorbida por la muestra es transmitida al detector. En la FIGURA 3 se muestra un esquema con los detectores NIRS.

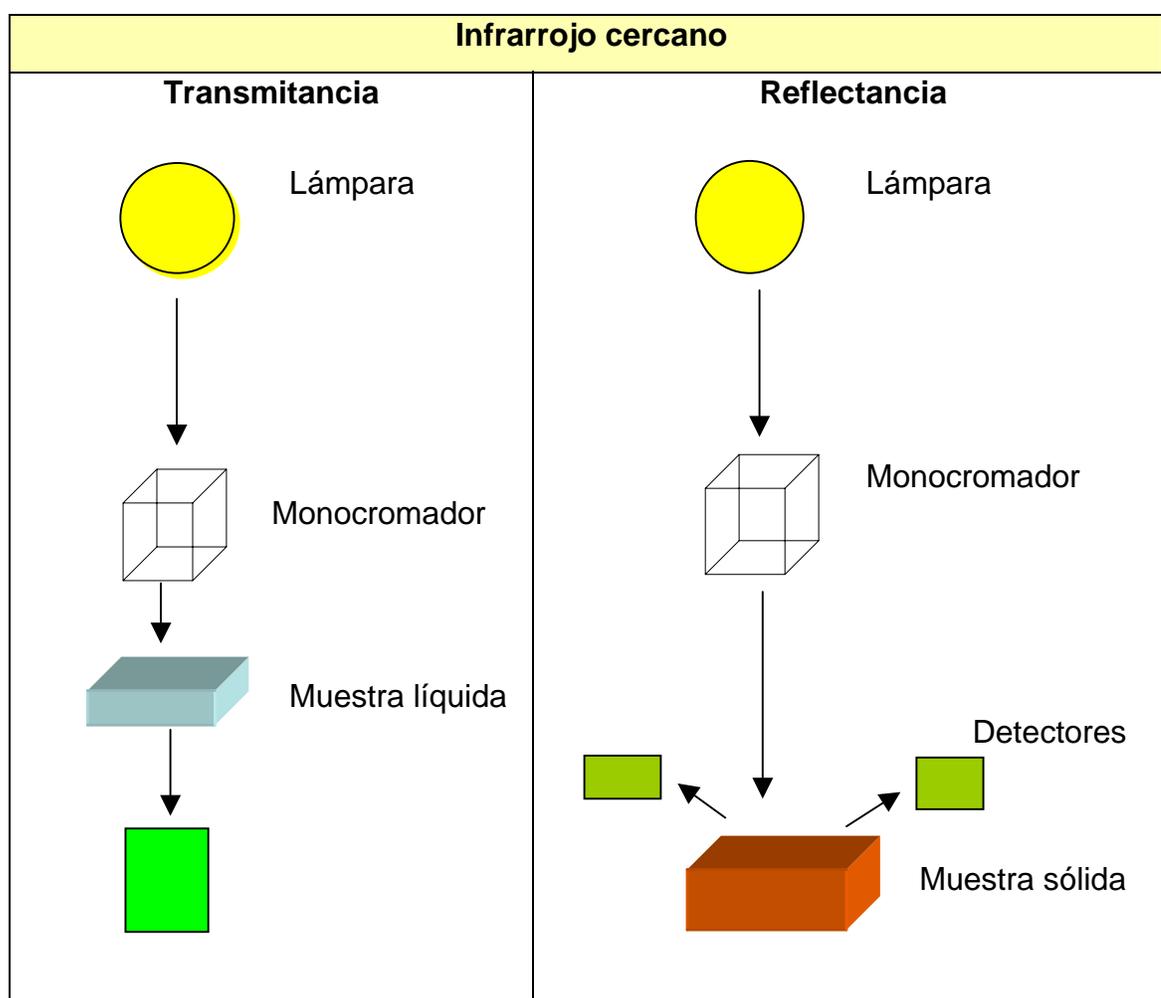


FIGURA 3. Figura esquemática de detectores NIRS, para transmitancia y reflectancia.

FUENTE: LARRAHONDO *et al.*, (2001).

Como se observa en la figura, en el caso de las muestras sólidas, una fuente de luz espectrofotométrica incide sobre la muestra opaca con un ángulo de 90° , reflejándose en 45° respecto al plano de la muestra, siendo captada por detectores que amplifican la información espectral, la que se obtiene a partir de la luz difusa reflejada directamente. Las lecturas de los espectros son promediadas y se expresan como $\log 1/R$ del espectro sobre el rango de longitud de onda a la cual corresponden (COVENTRY, 1988).

2.5.4.1 Presentación de las muestras para análisis. SHENK y WESTERHAUS (1994), hacen referencia a cinco formas de presentación, las cuales son: cubetas pequeñas para materiales uniformes finamente molidos, cubetas grandes utilizadas en muestras heterogéneas que no son molidas o que poseen una alta humedad, los líquidos son medidos mediante transmitancia y la fibra óptica para medidas remotas.

Un equipo presenta cubetas para material molido de forma circular de 10 mm de profundidad, con ventana de cuarzo, de 35 mm de diámetro. Las rectangulares varían entre 20 y 25 cm de largo (BEYER, 1997).

El envasado de la muestra dentro de las cubetas, debe realizarse en forma cuidadosa, para evitar grietas de aire en la superficie de lectura, compactando la muestra de manera uniforme, para que además no existan diferencias de espesor que hagan que la radiación incida en forma dispereja sobre la superficie (SHENK y WESTERHAUS, 1994).

2.5.4.2 Pruebas de diagnóstico. Se deben realizar pruebas de diagnóstico para determinar si el instrumento está operando en forma correcta (CLARK *et al.*, 1991), entre ellas se realizan pruebas de precisión o repetibilidad, toma del espectro de un material estándar (en algunos casos poliestireno) y análisis de una muestra patrón, de espectro y composición conocida.

2.5.4.3 Fuentes de variación de la técnica NIRS. Durante los análisis cuantitativos existen muchas fuentes de error que pueden conducir a alterar los resultados. La técnica NIRS no es ajena a este tipo de situaciones las que pueden ser consecuencia de uno de los siguientes factores:

2.5.4.3.1 Tamaño de partícula. La variación del tamaño de partícula provoca expansión o contracción del espectro por un factor multiplicativo o factor *scaling* (SHENK y WESTERHAUS, 1994). Partículas gruesas e irregulares (diferentes coeficientes de dispersión) pueden resultar en aparentes diferencias de absorción (afecta la linealidad) este fenómeno podría ser el responsable de los altos sesgos (COLEMAN *et al.*, 1990). Esta interferencia debe ser removida matemáticamente o ignorada. Si el espectro NIR no está afectado por: tamaño de partícula, coeficiente de dispersión y variación de la radiación a su paso por la muestra, las calibraciones pueden ser elaboradas directamente con datos de absorbancia (SHENK y WESTERHAUS, 1994).

2.5.4.3.2 Ruido. Los efectos del ruido fueron evaluados por LU *et al.*, (1998), los cuales llegaron a la conclusión que los espectros naturales al trabajar con tabaco, en comparación a espectros sintéticos simulados en un computador, son muchos más sensibles al ruido, ya que se obtuvieron mayores errores de predicción y menores coeficientes de correlación a medida que el ruido fue aumentado (valores no aceptables).

2.5.4.3.3 Temperatura. SHENK y WESTERHAUS (1994), señalan que el efecto de la temperatura se asocia al contenido de humedad de la muestra, ya que actúa sobre los enlaces O-H, produciendo vibraciones a ciertas longitudes de onda. Idealmente los equipos deben trabajar a una temperatura promedio de $25^{\circ} \text{C} \pm 5^{\circ} \text{C}$.

2.5.4.3.4 Preparación de la muestra. La preparación puede afectar los resultados obtenidos por la técnica NIRS o bien afectar las determinaciones químicas, por lo cual OSBORNE et al., (1993), recomiendan mezclarla y homogeneizarla previo al análisis. Además recomiendan ejecutar el experimento en un corto período de tiempo para evitar cambios en las características de las muestras, también pueden existir errores de clasificación. Si los instrumentos están muy usados o las cubetas o celdas están sucias, esto puede resultar en una gradual de la señal.

2.5.4.3.5 Humedad. Se producen errores significativos si muestras con altos contenidos de humedad son probadas usando calibraciones derivadas de muestras con bajo contenido de humedad y viceversa (OSBORNE et al., 1993).

2.5.5 Características de las muestras para la calibración. MURRAY (1988), señala que el set de muestras para la calibración corresponde a una población cerrada y al intentar clasificar muestras de una población abierta en el futuro, éstas deben cumplir con las algunas condiciones, tales como:

- Representar un amplio rango de composiciones o calidades.
- Poseer una distribución uniforme respecto de la población normal.
- Ser típicas de las que se encuentren en la realidad.
- Poder obtener datos analíticos precisos de su composición.

OSBORNE et al., (1993) señalan que las muestras deben presentar distinto tamaño de partícula y humedad para así proporcionar un rango suficiente de variabilidad, para ser incorporadas al set de calibración.

2.5.6 Calibración del instrumento. La calibración del equipo NIRS, debe realizarse con los datos obtenidos en los análisis químicos tradicionales, los cuales no deben incluir errores experimentales o de procedimiento para poder obtener una calibración más exacta (SHENK y WESTERHAUS, 1994).

El propósito de la calibración, según BOKOBZA (1998), es establecer una relación matemática entre el espectro NIR y los parámetros físicos bajo investigación.

En general, las etapas básicas para la calibración del equipo NIRS según (LARRAHONDO et al., 2001) son:

- Adquisición de datos: selección del proyecto, el instrumento y el rango de trabajo (nm), lectura de muestras y almacenamiento de espectros.
- Calibración: introducción de datos obtenidos por un método primario, selección de un conjunto de longitudes de onda, selección del método de calibración, correlación de los valores obtenidos por método primario y NIRS.
- Validación: análisis estadísticos de datos, comparando los métodos convencionales y las lecturas NIRS. Entrada de muestras y análisis en el infrarrojo cercano, correlación NIRS comparado con un método primario.
- Aplicaciones: realización de los análisis de rutina.

MARTENS y NAES (2001), señalan algunos factores involucrados en la calibración de instrumentos NIRS como son:

- Interferencias químicas y ópticas en los datos NIRS que demandan una calibración multivariable indirecta
- La respuesta no lineal de los instrumentos NIRS para variaciones químicas
- Dispersión de la luz y otras interferencias ópticas en datos NIRS son fuertes y no lineales
- Medición de ruido en datos químicos y NIRS
- Multicolinealidad en datos NIRS creando problemas de estimación estadística.
- Un alto número de muestras de calibración es deseado, pero es costoso.

- Análisis químicos y fisicoquímicos exactos son esenciales, pero no están siempre disponibles.

2.5.7 Tratamientos matemáticos. BARNES y DHANOA (1988), señalan que existen varias formas de transformaciones matemáticas de los datos ($\log 1/R$), las cuales se utilizan con el propósito de disminuir las variaciones que se deben principalmente a la preparación y presentación de las muestras.

El método más popular para la derivación del espectro es el del “segmento-intervalo” (“segment-gap method”). En donde el segmento se refiere al número de longitudes de onda o puntos de datos que son promediados o suavizados y el intervalo indica la distancia que existe, en puntos de datos, entre los promedios a ser sustraídos. Las derivadas pueden ser de primer, segundo, tercer y cuarto orden. Las de primer orden representan las diferencias entre dos promedios separados por un determinado intervalo, la de segundo orden equivale a la aplicación del procedimiento indicado, pero a los puntos resultantes de la primera derivación, siguiendo así sucesivamente (SHENK y WESTERHAUS, 1994).

La diferenciación centra el espectro sobre la línea cero. Con la elección de un tamaño apropiado de intervalos y segmentos es posible optimizar la información espectral analíticamente útil. El efecto de este procedimiento es mejorar la separación de las señales de absorción compuestas o mixtas, las cuales aparecen como alteraciones en la parte más alta de la onda, acentuándose o eliminándose rasgos abruptos dependiendo de su significado (MURRAY, 1988).

MURRAY (1988), señala que la primera derivada cambia los picos de absorción a longitudes de onda más corta dependiendo de la amplitud del pico. La segunda derivada produce una desviación de los picos de absorción al lado

negativo (bajo la línea cero) en el mismo espacio de longitud de onda según el $\log 1/R$ aproximadamente. La segunda derivada aumenta el ruido y es a menudo necesario aplicar una suavización de los datos BOKOBZA (1993). Las de tercer y cuarto orden se utilizan con menos frecuencia debido a su dificultad de interpretación. En el caso de las de tercer orden, estas presentan características similares a las de primer orden y las de cuarto orden mejorarían las aproximaciones realizadas con el segundo orden (MURRAY, 1988).

En la FIGURA 4 se muestra cómo es el proceso de cálculo de una primera y segunda diferenciación (MURRAY, 1988).

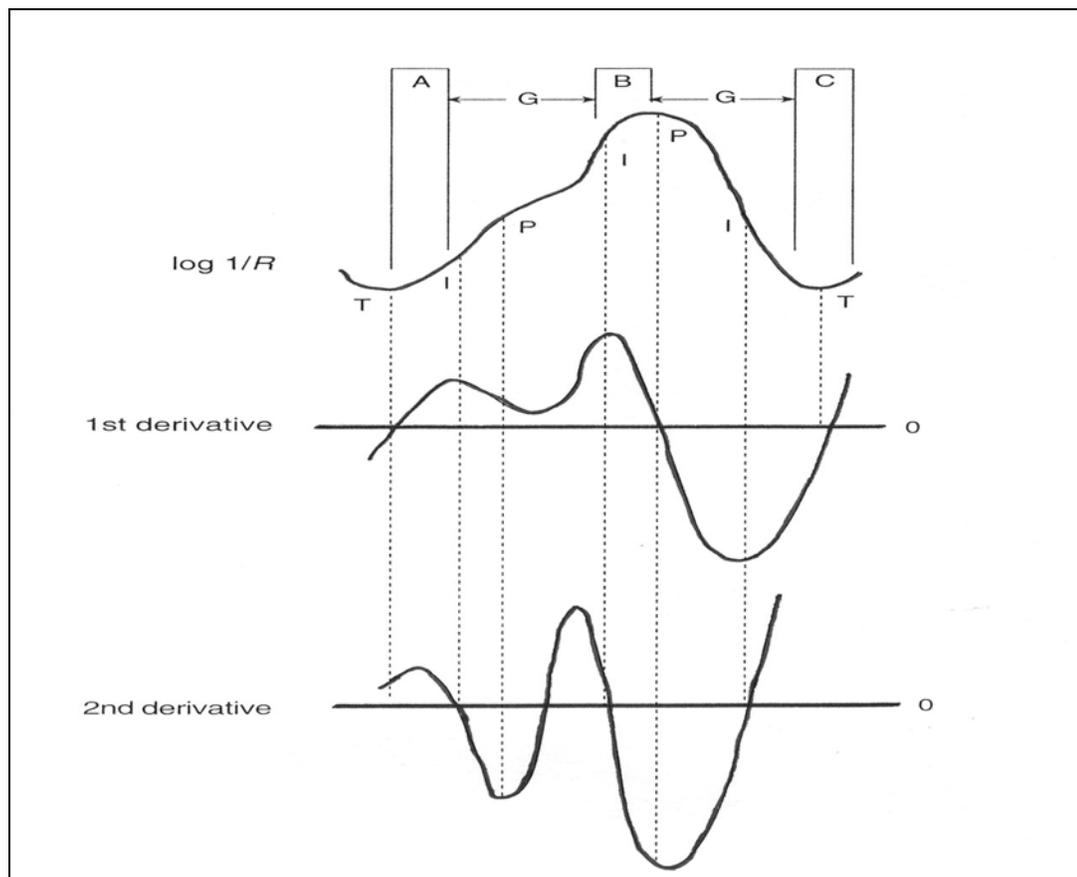


FIGURA 4. Esquema de diferenciación.

FUENTE: DEAVILLE y FLINN (2000).

Los tratamientos matemáticos se expresan mediante cuatro cifras, en donde el primer dígito corresponde al orden de derivación o diferenciación, el segundo dígito es el intervalo de sustracción, o mejor dicho, la amplitud o distancia entre los segmentos a sustraer y el tercer y cuarto dígito corresponden a los segmentos de suavización 1 y 2, o dicho de otra forma, la longitud del segmento a ser suavizado (ALOMAR y FUCHSLOCHER, 1998).

2.5.8 Muestras aberrantes. Durante la validación de la calibración se pueden detectar muestras llamadas aberrantes, las que se clasifican en: aberrante “t” y aberrante “H”. SHENK y WESTERHAUS (1994), señalan que estos aberrantes u “outliers” no se ajustan a la calibración y que son generados por errores en el espectro o en el método de regresión.

Las muestras aberrantes “t”, son aquellas usadas en la calibración cuyos valores de referencia no concuerdan con los obtenidos en la predicción y cuyo valor residual (diferencia entre valores predichos y de referencia) es aproximadamente tres veces el error estándar de calibración (SEC). Los valores de “t” mayores a 3 no deben ser usados en la calibración (MURRAY, 1988). BARNES y DHANOA (1988), señalan que las muestras con valores de “t” altos, son indicadores de datos de laboratorio dudosos.

El valor “H” representa a aquellas muestras que en la calibración o en el muestreo de rutina, presentan un espectro atípico al de aquellos utilizados en la calibración, lo cual puede ocurrir porque la muestra no ha sido representada en el set de calibración o porque es muy diferente y no es aplicable al análisis usando la ecuación (MURRAY, 1988; BARNES y DHANOA, 1988).

Cuando ambos valores son altos para una muestra individual, entonces ésta debe ser removida del conjunto, seguido de un nuevo escáner y análisis (BARNES y DHANOA, 1988)

WILLIAMS y NORRIS (2001), señalan como factores causantes de outliers los siguientes: composición química, la interacción con otros constituyentes, selección de longitudes de onda, estado de humedad, textura física, forma y tamaño de partícula, densidad a granel, técnica de preparación de la muestra, orientación de la muestra en la celda, temperatura de la muestra, número de longitudes de onda utilizadas en la calibración y tratamientos matemáticos de los datos.

2.5.9 Análisis de regresión. MURRAY (1988) y HRUSCHKA (2001), señalan que la forma general de una ecuación de calibración es la siguiente:

$$Y = B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + \dots + B_nX_n \quad (2.5)$$

Donde Y corresponde a la composición calculada en base al espectro NIR, B_0 es la constante de regresión o valor intercepto, B_n es el coeficiente de regresión parcial y X_1 y X_n corresponden a los valores de absorbancia, expresados en distintas formas, de acuerdo al tratamiento matemático del espectro y el método de regresión utilizado para modelar la relación (MURRAY, 1988).

Los métodos que se utilizan son de regresión múltiple y se clasifican en aquellos que ocupan una parte del espectro y aquellos que utilizan el espectro completo para el desarrollo de las ecuaciones.

2.5.9.1 Regresiones con una parte del espectro. SHENK y WESTERHAUS (1994), señalan que a veces no son necesarias todas las longitudes de onda en el modelo de regresión. El método que ellos mencionan es el llamado Step up (Regresión paso a paso de carácter estricto), el cual relaciona las variables X altamente relacionadas con Y, para ser incorporadas al modelo y se agregan variables adicionales hasta que se produzca el sobreajuste.

La regresión paso a paso de carácter amplio, llamada Stepwise, es aquella en que las variables no son forzadas, sino que son removidas y reemplazadas por una que lo mejore, cuando una nueva longitud de onda es agregada al modelo (SHENK y WESTERHAUS, 1994).

2.5.9.2 Regresiones con el espectro completo. En los métodos de regresión que utilizan todo el espectro, se pueden encontrar el método de regresión de componentes principales (PCR), el método de los cuadrados mínimos parciales (PLS) y el método de los cuadrados mínimos parciales modificados (MPLS).

La regresión de componentes principales (PCR), se realiza con los datos espectrales y los datos de referencia, estos últimos son relacionados con el primer componente principal usando una regresión múltiple. Este método construye factores que capturan la variación de los datos espectrales, pero no toma en cuenta si están relacionados o no con los datos de referencia OSBORNE *et al* (1993).

Los cuadrados mínimos parciales (PLS), es un método de regresión que consiste en un pequeño número de factores construidos como una combinación lineal de datos espectrales originales y la regresión usa los factores marcados para derivar una ecuación de predicción. El PLS construye, al igual que PCR, factores que capturan la variación de los datos espectrales, pero se diferencian en que el PLS los construye tomando en cuenta si están relacionados o no con los datos de referencia (OSBORNE *et al.*, 1993). MUIRENS (1998), considera que el PLS no es un buen método de regresión, pero menciona que existe un algoritmo llamado “amplificación espectral”, el cual mejora la precisión de PLS amplificando algunos datos espectrales y multiplicándolos por coeficientes ajustados.

Otro método de regresión con el espectro completo, es el de los cuadrados mínimos parciales modificados (MPLS), que se caracteriza porque los residuos de cada longitud de onda obtenidos después que cada factor es calculado, son estandarizados (divididos por la desviación estándar de los residuos de una longitud de onda) antes de calcular el siguiente factor. Es según varios autores más exacto y estable que el PLS (SHENK y WESTERHAUS, 1994).

2.5.10 Corrección de dispersión. La corrección multiplicativa de dispersión es una adición y una multiplicación de términos para cada muestra, relacionado a un espectro de referencia definido (BOKOBZA, 1998).

Según lo señalado por SHENK y WESTERHAUS (1994), el “detrending” (transformación matemática de los datos a calibrar), es un procedimiento matemático que escala un espectro para tener una desviación estándar de valor uno, que remueva el curso lineal y cuadrático en el espectro.

GARRIDO-VARO *et al.*, (1998), estudiaron la técnica en semillas de girasol y maíz y sus subproductos, utilizando corrección de dispersión SNV (varianza normal estándar) + DT (detrending). Encontraron que las diferencias químicas existentes en la dispersión de los subproductos son mejor interpretadas, o sea, que entrega una definición más alta y una mejor interpretación de las diferencias químicas. Sin embargo, ningún procedimiento arregla completamente los efectos de tamaño de partícula. Es más, ésta puede proveer información útil para la calibración (SHENK y WESTERHAUS, 1994).

El detrending (DT) remueve la curvatura lineal y cuadrática de cada espectro y la varianza normal estándar (SNV) elimina la dispersión para obtener una desviación estándar de 1,0 (DEAVILLE y FLINN, 2000).

2.5.11 Selección de ecuaciones. De acuerdo a la cantidad de tratamientos matemáticos y métodos de regresión utilizados se dispondrá de un cierto número de ecuaciones para cada parámetro a predecir, de las cuales se selecciona la más confiable a fin de ser sometida a pruebas de validación contra un grupo de muestras independientes (SHENK y WETERHAUS, 1994).

Es necesario, entonces, seleccionar aquella que se considere más confiable en base a que tenga un elevado coeficiente de determinación (R^2) y un bajo error estándar de calibración (SEC) (ALOMAR y FUCHSLOCHER, 1998).

El SEC corresponde al error estándar de la diferencia, de acuerdo a lo señalado por PERMANYER y PÉREZ (1989) y SMITH y FLINN (1991) o dicho de otra forma es la desviación estándar de los errores individuales de aproximación (HRUSCHKA, 2001) y se expresa de la siguiente manera:

$$SEC = \sqrt{\frac{\sum (y - x)^2}{n_c - t - 1}} \quad (2.6)$$

Donde y es el valor de referencia del laboratorio, x es el valor predicho por NIRS, n_c es el número de muestras del grupo de calibración y t es el número de términos de la ecuación de regresión.

BEYER (1997), señala que el SEC disminuye cada vez que se agregan nuevos términos a la ecuación (a la vez que aumenta el R^2), pero sin entregar evidencias de un posible sobreajuste, por lo que no constituye un indicador confiable de la calidad de ésta, sin embargo, al comparar distintas calibraciones con los mismos datos, permite definir lo bien que se ajustan las muestras a cada modelo desarrollado en la calibración.

Para que una ecuación pueda ser considerada confiable relativamente, debe presentar un R^2 de 0,85 como mínimo (BEYER, 1997) y su fórmula general es:

$$R^2 = 1 - \frac{SEC^2}{SD^2} \quad (2.7)$$

Donde SD es la desviación estándar de los valores de referencia.

El coeficiente de determinación (R^2) se define como la proporción de variabilidad de los datos de referencia explicada por la ecuación de regresión. Es una medida de la correlación entre dos variables donde se relacionan los métodos de referencia y el análisis NIRS. OSBORNE *et al* (1993), indica que el R^2 fluctúa entre 0 y 1 y representa el porcentaje de la varianza en que el valor Y es explicado por la ecuación. Un R^2 de 0 indica que no existe relación entre ambos métodos, mientras que un R^2 igual a 1 indica un ajuste perfecto con un error estándar de 0. Un bajo valor de R^2 indica generalmente que los valores de laboratorio son imprecisos (Shenk y Westerhaus, 1993; Westerhaus, 1989, citados por PELDOZA, 1999).

2.5.12 Validación. Es el paso final en el proceso de calibración de la ecuación seleccionada y consiste en ratificar o asegurar la fidelidad de las ecuaciones de calibración.

2.5.12.1 Validación cruzada. La validación cruzada es usada por tres razones: identificar outliers, para elegir el número de factores PLS o PCA en el modelo de calibración y para estimar el desempeño del método de calibración cuando se predigan muestras desconocidas (INFRASOFT INTYERNATIONAL. ISI, 2004).

Esta validación consiste en remover una o más muestras del conjunto de calibración y usarlas como un conjunto de predicción de las muestras que quedan; luego estas muestras vuelven a integrar el conjunto de calibración y otras muestras son sacadas para el conjunto de predicción, este proceso se repite hasta que todas las muestras fueron parte del conjunto de predicción (ISI, 2004). OSBORNE *et al* (1993), señalan que esta idea permite que un conjunto de predicción pueda actuar alternativamente como conjunto de calibración y de validación.

SHENK y WESTERHAUS (1994), indican algunas ventajas de la validación cruzada como:

- Uso eficiente de las muestra, tanto para calibrar como para validar.
- Buena estimación del error de predicción al entregar el promedio de varios grupos en lugar de uno solo.
- Detección y eliminación de muestras residuales de validación cruzada excesivamente altos (valor $t > 2,5$).
- Buenos resultados con métodos de regresión en base a todo el espectro debido a que éstos se ven menos afectados por la exclusión de algunas muestras del grupo de calibración.

INFRASOFT INTERNATIONAL. ISI (2004), señala que una validación cruzada no es confiable en dos situaciones. La primera es cuando una muestra del conjunto de predicción tiene una réplica en el conjunto de calibración, esto haría parecer que la predicción se está ajustando a una muestra en el conjunto de calibración, en vez de predecir una muestra desconocida. La segunda situación sucede si el conjunto de calibración posee muestras “especiales”, que no pueden ser predichas por la otras muestras. Estas muestras producirían la inflación del error o serían eliminados automáticamente como outliers.

Los resultados de la validación cruzada son expresados como un coeficiente de determinación ($1-VR$) y un error estándar de validación cruzada (SECV). El SECV corresponde al desvío de los valores predichos respecto de los valores de referencia y a medida que se le incorporan nuevos términos, va disminuyendo, pero sólo hasta que la ecuación comienza a ser sobreajustada. El SECV, además, es un excelente indicador de la exactitud de predicción, ya que el cálculo se hace en base al promedio de varios grupos, considerándose aceptable un SECV menor o igual a un tercio de la desviación estándar de los valores de referencia (Shenk y Westerhaus, 1993; Kennedy et al, 1995, citados por BEYER, 1997). El SECV siempre será mayor que el error de calibración (ISI, 2004).

2.5.12.2 Validación externa. Esta validación puede ser de dos formas. Una es que las muestras pueden ser seleccionadas al azar del conjunto de calibración antes que la calibración se ejecute o puede ser un grupo diferente de muestras (ajenas al conjunto de calibración). La primera forma sirve para estimar sobreajuste y estimar el error de predicción. El otro caso se usa solo para robustecer la ecuación, este caso puede resultar en un alto error de predicción porque no se representan en el conjunto de calibración las muestras de validación (SHENK y WESTERHAUS, 1994).

En un proceso de validación de muestras externas, se determina junto con el coeficiente de determinación (R^2), el error estándar de predicción (SEP), como lo señalan ALOMAR y FUCHSLOCHER (1998) en la siguiente ecuación:

$$SEP = \sqrt{\frac{\sum (y - x)^2}{n_v - 1}} \quad (2.8)$$

Donde y es el valor de referencia, x es el valor predicho por NIRS y n_v es el número de muestras en el set de validación.

El SEP corresponde a las desviación estándar de la diferencia entre los valores de referencia y los valores estimados por NIRS (BATTEN, 1998). Con respecto a este indicador, SHENK y WESTERHAUS (1994), señalan que una ecuación es exacta cuando el SEP(en el caso de una validación cruzada el SECV) es menor que el error de muestreo en la población de la cual las muestras fueron sacadas.

3 MATERIAL Y MÉTODO

3.1 Ubicación del estudio

Los análisis a las sopas crema para la colección de espectros y el ingreso de la información química se realizaron en el Laboratorio de Nutrición Animal del Instituto de Producción Animal. Los análisis químicos de rutina se realizaron en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Ambos pertenecientes a la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile.

3.2 Características de las muestras

Se trabajó con sopas cremas “Años Dorados” de cuatro variedades: arveja, lenteja, espárragos y verduras, las cuales provienen de cuatro distintos fabricantes.

Las muestras de crema fueron llevadas al Laboratorio de Nutrición Animal para su análisis en envases de plásticos cerrados herméticamente (ANEXO 8), en los cuales se señalaba el número de la muestra y el sabor al cual correspondían.

Las muestras una vez analizadas fueron devueltas a los envases de plástico, esto debido a que las muestras no sufrieron ninguna alteración durante la toma de espectros, mencionándose esto anteriormente, como una de las ventajas de la técnica NIRS.

Para el desarrollo de las ecuaciones se trabajó con un total de 240 muestras, 60 de cada sabor y dentro de este total se encontraban muestras de cuatro distintos fabricantes. Los fabricantes son designadas por los números 1, 2, 3 y 4. La descripción general se indica en el CUADRO 3.

CUADRO 3. Cantidad de muestras analizadas por sabor y fabricante.

| Fabricante | Arveja | Lenteja | Espárragos | Verduras |
|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | Nº muestras | Nº muestras | Nº muestras | Nº muestras |
| 1 | 23 | 15 | 13 | 18 |
| 2 | 23 | 15 | 0 | 19 |
| 3 | 0 | 12 | 35 | 5 |
| 4 | 14 | 18 | 12 | 18 |

Como puede apreciarse no existe una cantidad pareja de muestras para cada fabricante en cada sabor, esto se debe a que en el caso de la sopa de arveja no hay muestras del fabricante 3 y en el caso de la de espárragos no hay del fabricante 2. De todas maneras se realizó una distribución lo más pareja posible con respecto a las cantidades de muestras para cada uno de los cuatro fabricantes con el fin de realizar las ecuaciones de calibración.

3.3 Toma de espectros

El equipo utilizado para tomar los espectros de las muestras de sopas es un monocromador NIRSystems 6500 (NIRSystems Inc, MD) (ANEXOS 9 y 10), el cual cubre el rango visible e infrarrojo cercano (entre 400 y 2498 nm).

Para el desarrollo de las ecuaciones de calibración, se utilizó el programa Winisi II v1.04 de Infracsoft International, en donde se manejó la información espectral y de referencia.

Para analizar las muestras se utilizaron cápsulas circulares con ventana de cuarzo, cuyas dimensiones son de 35 mm de diámetro por 10 mm de profundidad, las cuales se pueden apreciar en el ANEXOS 7 y 8.

3.4 Análisis químicos de referencia

Los análisis químicos realizados a las muestras de sopa para determinar su composición nutricional son descritos en el CUADRO 4.

CUADRO 4. Análisis químicos y sus referencias.

| Determinación | Referencia |
|---|--|
| - Proteínas por semi-micro-Kjeldahl. | AOAC 963-29 (1995) |
| - Cenizas por calcinación | AOAC. Oficial method 7.009. 1984. Ash of feed |
| - Materia grasa por hidrólisis ácida | AOAC 954.02 (1995) |
| - Contenido de humedad por el método gravimétrico a 102° C | FIL-IDF 26 A:1993. Dried milk and dried cream. Determination of water content. |
| - Carbohidratos totales disponibles por el método de la Antrona | Osborne D.R and Voogt P. 1978. The analysis of nutrients in foods. 130-131pp. |

Además se determinaron los carbohidratos disponibles por diferencia, o sea, restando de un total de 100 g, el resto de los otros componentes nutricionales (proteína, cenizas, materia grasa y humedad).

$$\% \text{ Carbohidratos disponibles} = 100 - (\% \text{ Proteína} + \% \text{ Cenizas} + \% \text{ Materia Grasa} + \% \text{ Humedad})$$

3.5 Desarrollo de las ecuaciones de calibración

Los espectros colectados de las muestras analizadas se ingresaron en un archivo *.NIR. Luego se ingresaron los datos de referencia obtenidos por los métodos regulares de laboratorio, con lo cual los archivos *.NIR se transforman en *.CAL. Los espectros fueron almacenados como valores de microabsorbancia ($\log 1/R$).

Para llevar a cabo las predicciones de los componentes nutricionales de las sopas crema se realizaron diversos tratamientos matemáticos para determinar la ecuación más precisa para cada componente.

Las ecuaciones se desarrollaron con un máximo de catorce términos y dos pases de eliminación de aberrantes u “outliers”.

3.5.1 Tratamientos matemáticos. Los tratamientos matemáticos están representados por cuatro dígitos, el primero de ellos corresponde al orden de diferenciación o sustracción, el segundo al intervalo de sustracción, el tercero al segmento de una primera suavización y el cuarto a una segunda suavización, en el cual se recomienda usar el valor 1.

Los tratamientos matemáticos evaluados se describen en el CUADRO 5.

CUADRO 5. Tratamientos matemáticos usados en la calibración.

| log 1/R | d(log 1/R) | | d₂(log 1/R) | |
|----------------|-------------------|-----------|-------------------------------|-----------|
| 0:0:5:1 | 1:5:5:1 | 1:20:20:1 | 2:5:5:1 | 2:20:20:1 |
| 0:0:10:1 | 1:10:5:1 | 1:20:5:1 | 2:10:5:1 | 2:20:5:1 |
| 0:5:5:1 | 1:10:10:1 | 1:20:10:1 | 2:10:10:1 | 2:20:10:1 |
| 0:10:10:1 | | | | |

3.5.2 Métodos de regresión. Para elaborar las ecuaciones se utilizó el método de los cuadrados mínimos parciales modificados (MPLS), ya que el riesgo de sobreajuste es mínimo.

3.5.3 Corrección de dispersión. Se aplicaron dos opciones de pretratamiento espectral disponibles en el programa.

- Ninguno (“NONE”)
- SNV y “detrend” (SNV+DT)

3.5.4 Validación y selección de ecuaciones. Para determinar la eficacia de cada calibración para los parámetros de interés, se evaluaron las ecuaciones para cada tratamiento matemático en base al coeficiente de determinación de validación cruzada ($1-VR$), error estándar de validación cruzada (SECV) y por medio de la relación entre la desviación estándar de los valores de referencia para cada fracción analizada y el error estándar de validación cruzada ($d.e/SECV$).

4 PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Características químicas de las muestras

En el CUADRO 6 se resumen las características de las muestras de sopa utilizadas en el proceso de calibración.

CUADRO 6. Composición nutricional de las muestras de sopa utilizadas en la calibración.

| Fracción nutricional | Nº muestras | Límites permitidos | Rango (grs) | Promedio \pm D. E |
|--|-------------|--------------------|-------------|---------------------|
| Proteína | 240 | 13,0 (mín) | 9,70-16,39 | 13,15 \pm 1,33 |
| Cenizas | 240 | 2,6-4,2 | 3,03-6,65 | 4,06 \pm 0,59 |
| Materia grasa | 240 | 8,8-11,0 | 7,30-15,30 | 10,33 \pm 1,38 |
| Humedad | 240 | 3,0-6,0 (máx) | 3,85-6,64 | 5,31 \pm 0,51 |
| Carbohidratos disponibles por método Antrona | 240 | 62,3 (mín) | 51,11-71,80 | 63,28 \pm 3,62 |
| Carbohidratos disponibles por diferencia | 240 | 62,3 (mín) | 60,65-73,14 | 67,16 \pm 2,24 |

Como se puede observar, las distintas fracciones nutricionales analizadas poseen amplios rangos en los resultados obtenidos por los métodos de referencia.

El amplio rango en los porcentajes de composición de las muestras en todas las fracciones analizadas favorecerá la calibración, debido a que se pueden elaborar ecuaciones que permitan analizar sopas con diversos niveles composicionales, esto teniendo en cuenta la diversidad de sabores. Con

respecto a esto, en el caso de las proteínas, cenizas y materia grasa, éstas presentan una desviación de un 10,11%, 14,53% y 13.36% del promedio, respectivamente, mientras que las variables humedad y carbohidratos disponibles por método Antrona y por diferencia presentan desviaciones del orden de 9,60%, 5,72% y 3,34% respectivamente, lo que indicaría que hay un registro más uniforme en la composición de las sopas en relación a estos parámetros nutricionales.

4.2 Desarrollo de la calibración

Las calibraciones se realizaron sobre un total de 240 muestras, las que se evaluaron en base a parámetros como el coeficiente de determinación de la validación cruzada (1-VR) y el error estándar de validación cruzada (SECV). Luego se presentarán las mejores ecuaciones para cada componente.

4.2.1 Proteínas. En el CUADRO 7 se presentan en orden decreciente los siete mejores resultados estadísticos y las características de las ecuaciones que las originaron.

CUADRO 7. Mejores ecuaciones obtenidas para proteínas.

| N | T.M | C.D | SEC | R ² | SECV | 1-VR | Prom | D.E | D.E/SECV |
|-----|-----------|--------|-------|----------------|-------|-------|--------|-------|----------|
| 224 | 1,20,20,1 | None | 0,269 | 0,958 | 0,279 | 0,955 | 13,129 | 1,316 | 4,72 |
| 225 | 1,10,5,1 | SNV+DT | 0,274 | 0,956 | 0,282 | 0,953 | 13,124 | 1,304 | 4,62 |
| 224 | 1,5,5,1 | SNV+DT | 0,267 | 0,957 | 0,281 | 0,952 | 13,139 | 1,286 | 4,58 |
| 225 | 1,10,10,1 | SNV+DT | 0,280 | 0,955 | 0,289 | 0,952 | 13,137 | 1,318 | 4,56 |
| 227 | 1,5,5,1 | None | 0,285 | 0,954 | 0,295 | 0,951 | 13,149 | 1,331 | 4,51 |
| 226 | 1,10,10,1 | None | 0,285 | 0,954 | 0,295 | 0,950 | 13,139 | 1,325 | 4,49 |
| 225 | 2,20,5,1 | SNV+DT | 0,285 | 0,953 | 0,292 | 0,950 | 13,124 | 1,304 | 4,47 |

N: Número de muestras; T. M: Tratamiento matemático; C. D: Corrección de dispersión; SEC: Error estándar de calibración; R^2 : Coeficiente de determinación de calibración; SECV: Error estándar de validación cruzada; 1-VR: Coeficiente de determinación de la validación cruzada; Prom: Composición promedio de las muestras; D. E: Desviación estándar.

Las calibraciones realizadas para la determinación de proteínas en sopas muestran resultados satisfactorios. La mejor ecuación seleccionada para este parámetro corresponde a aquella en que se aplicó el tratamiento matemático 1,20,20,1_{NONE}, sin corrección de dispersión.

Lo satisfactorio de los resultados se ve reflejado en los altos valores de los coeficientes de determinación de calibración (R^2) y de validación cruzada (1-VR) los cuales para la mejor ecuación son de 0,958 y de 0,955 respectivamente, además presenta bajos valores de error estándar de calibración (SEC) y de validación cruzada (SECV), que en el mismo caso de la mejor ecuación seleccionada, son de 0,269 y 0,279 respectivamente.

Con respecto a los valores de 1-VR, éstos están comparables con los arrojados por otros trabajos realizados para determinar proteína, pero en alimentación animal, tal como es el caso de los publicados por GARRIDO-VARO *et al.*, (2003), quienes informan resultados de 0.98 para proteína. Por su parte, STOCKEBRAND (2000), el cual determinó proteínas en ensilajes de praderas, obtiene valores de 0,92 para 1-VR en la mejor ecuación, pero con un tratamiento matemático de 3,10,10,1_{NONE}.

Como una de las formas aceptadas de evaluar la calidad predictiva de una ecuación es relacionar la desviación estándar con el error estándar de validación cruzada (SECV), para el caso puntual de las proteínas se obtuvo un

índice de d.e/SECV máximo de 4,72, el cual está sobre el 3,00 recomendado en la literatura, lo cual es bastante satisfactorio, al igual que los obtenidos por KAYS *et al.*, (2000), quienes arrojan resultados de 5,99 y 5,26 y GARRIDO-VARO *et al.*, (2003) con 6,80 y 6,90, al contrario de lo obtenido en carne por ALOMAR *et al.*, (2003), quienes trabajaron con carne en estado fresco, con un valor más bajo, de 2,33.

Con respecto a la utilización de corrección de dispersión, entre las siete mejores ecuaciones seleccionadas, tres de ellas no incluyeron algún tipo de corrección, incluyendo la primera ecuación seleccionada. Las siguientes tres ecuaciones seleccionadas, sí incluyeron algún tratamiento de corrección, que en este caso corresponde a la varianza normal estándar (SNV). De esta forma no se puede afirmar con certeza que el uso de corrección de dispersión es un factor que beneficie la calidad de las ecuaciones obtenidas, ya que en trabajos realizados por STOCKEBRAND (2000), las mejores ecuaciones para proteínas no fueron tratadas con algún tratamiento de corrección de dispersión a diferencia de los señalados por PELDOZA (1999).

Todos los tratamientos matemáticos utilizados incluyeron algún grado de diferenciación, siendo las seis primeras ecuaciones seleccionadas tratadas con una primera diferenciación. Esto corrobora lo mencionado por INFRASOFT INTERNATIONAL. ISI (2004), donde se señala que los mejores ajustes se consiguen con tratamientos de 1º y 2º diferenciación.

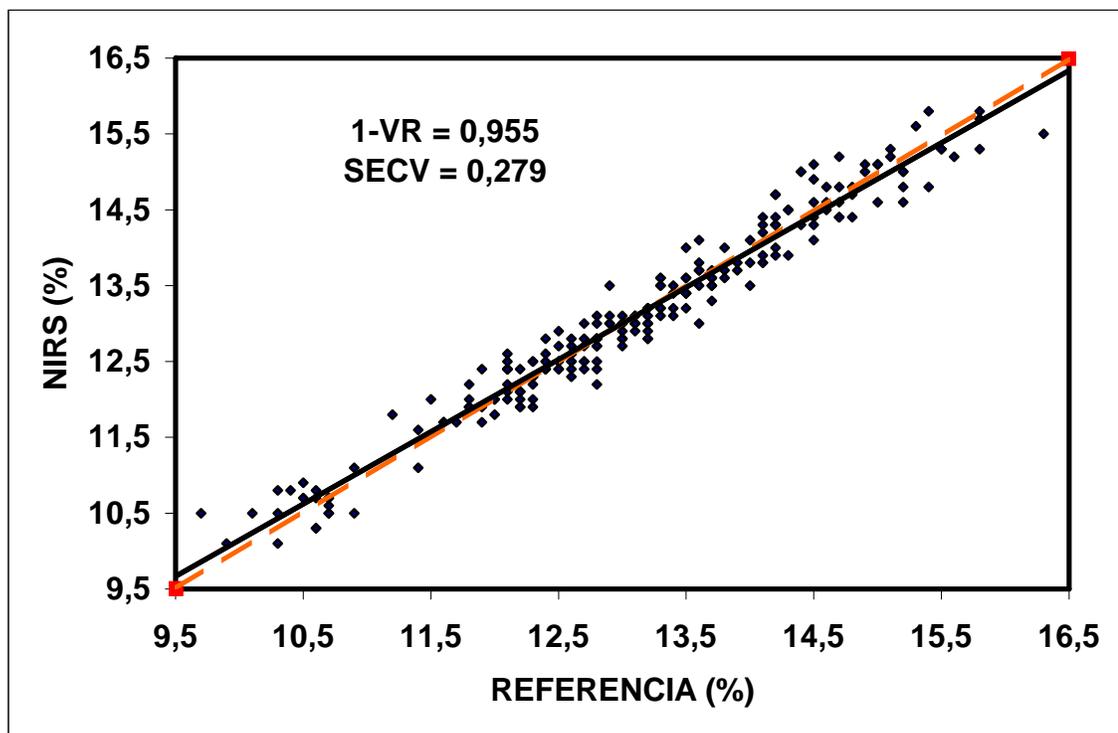


FIGURA 5. Relación entre los valores de referencia y su predicción mediante NIRS para proteínas.

La FIGURA 5 muestra la distribución de las muestras alrededor de la línea de regresión, dada por la ecuación $1,20,20,1_{NONE}$. La distribución de los puntos a través de la línea de regresión se presenta en forma homogénea, observándose igual cantidad de puntos arriba y debajo de ésta, lo cual se explica por el alto coeficiente de determinación. Además se observan muestras que presentan un amplio rango de composiciones, lo que favorece el poder predictivo de la ecuación. Las muestras que tienen altos valores de referencia tienden a ser subvaloradas por NIRS.

4.2.2 Cenizas. A continuación se presentan y se discuten los resultados estadísticos, además de los tratamientos usados en cada caso, para la variable cenizas.

CUADRO 8. Mejores ecuaciones obtenidas para cenizas.

| N | T.M | C.D | SEC | R ² | SECV | 1-VR | Prom | D.E | D.E/SECV |
|-----|-----------|--------|-------|----------------|-------|-------|-------|-------|----------|
| 225 | 1,20,20,1 | SNV+DT | 0,133 | 0,936 | 0,145 | 0,924 | 4,001 | 0,527 | 3,63 |
| 226 | 1,5,5,5 | SNV+DT | 0,129 | 0,941 | 0,147 | 0,924 | 4,006 | 0,531 | 3,61 |
| 225 | 2,5, 5,1 | SNV+DT | 0,136 | 0,935 | 0,147 | 0,923 | 4,004 | 0,531 | 3,61 |
| 224 | 1,20,20,1 | None | 0,135 | 0,934 | 0,146 | 0,923 | 3,998 | 0,526 | 3,60 |
| 226 | 1,10,10,1 | SNV+DT | 0,133 | 0,937 | 0,148 | 0,922 | 4,006 | 0,531 | 3,59 |
| 225 | 1,10,5,1 | SNV+DT | 0,131 | 0,939 | 0,149 | 0,921 | 4,006 | 0,531 | 3,56 |
| 225 | 1,10,10,1 | None | 0,133 | 0,937 | 0,149 | 0,921 | 4,003 | 0,531 | 3,56 |

El CUADRO 8 muestra las calibraciones realizadas para la determinación de cenizas, las cuales muestran resultados satisfactorios al igual que en el caso de las proteínas. Los resultados para el coeficiente de determinación de calibración (R²) y el coeficiente de determinación de validación cruzada (1-VR) fueron de 0,936 y 0,924 respectivamente para la mejor ecuación seleccionada. Estos valores, comparados con los publicados por PELDOZA (1999), son similares para el caso de R², donde el valor para la mejor ecuación es de 0,92. Para 1-VR, los resultados son igualmente positivos que los obtenidos por GARRIDO-VARO *et al.*, (2003), con 0,90.

Para el caso del error estándar de calibración (SEC), el valor obtenido para la mejor ecuación es de 0,133 y para el error estándar de validación cruzada (SECV) de 0,145.

Todas las ecuaciones seleccionadas presentan un índice d.e/SECV superior a 3,00, lo cual está dentro de lo recomendado por los autores para considerar estas ecuaciones de calidad predictiva. En el caso de la mejor ecuación, este índice presentó un valor de 3,63, el cual es similar al publicado por GARRIDO-VARO *et al.*, (2003) de 3,09 y 3,15 y mejores que los obtenidos por PELDOZA (1999), quien en todas las ecuaciones seleccionadas obtiene valores entre 2,2 y 2,42 para ese índice y ALOMAR *et al.*, (2003) quienes

obtienen para carne un valor de 1,61, el cual bastante deficiente en comparación con el obtenido en sopas. Tomando en cuenta estos resultados, se puede afirmar que las ecuaciones de calibración seleccionadas para este parámetro son de buena calidad predictiva. Estos resultados mencionados en otros estudios y que no son ideales para la predicción de cenizas pueden ser consecuencia de que las sustancias inorgánicas y los minerales no poseen absorción en la región del infrarrojo. Sin embargo, los minerales se pueden asociar a la estructura orgánica en forma de óxidos, quelatos u otros complejos e indirectamente ser estimados por NIRS y esto podría ser la causa de por qué se obtienen buenos resultados para sopas (COZZOLINO *et al.*, 2003).

La utilización de corrección dispersión en este caso sí fue considerable en la selección de las ecuaciones ya que de un total de siete, cinco utilizaron varianza normal estándar y detrend (SNV-Detrend), habiendo ecuaciones en las cuales no se utilizó corrección. Debido a esto, no se puede mencionar que en este caso para cenizas, el tratamiento de corrección de dispersión favorece la calidad predictiva de las ecuaciones, al igual que lo señalado por PELDOZA (1999), quien en todas las ecuaciones obtenidas utilizó el tratamiento Detrend. En el caso de la ecuación para carne, ALOMAR *et al.*, (2003), utilizaron el mismo tratamiento de corrección.

En el caso de los tratamientos matemáticos utilizados para estas ecuaciones, todas ellas fueron tratadas con una primera diferenciación, a diferencia de las obtenidas por PELDOZA (1999), en donde las mejores ecuaciones fueron tratadas con una segunda diferenciación.

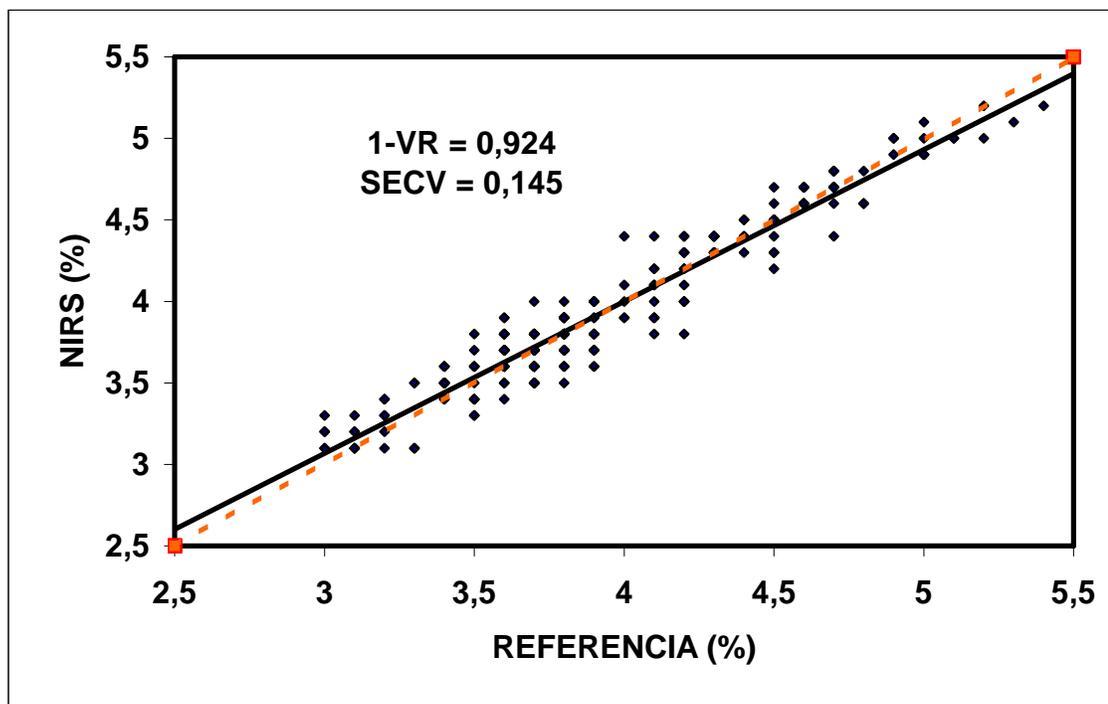


FIGURA 6. Relación entre los valores de referencia y su predicción mediante NIRS para cenizas.

La FIGURA 6 muestra la dispersión de las muestras alrededor de la línea de tendencia obtenida por la mejor ecuación, en este caso $1,20,20,1_{SNV+DT}$ para el caso de las cenizas. Al igual que en el caso de las proteínas, la distribución de los puntos a través de la línea de regresión es homogénea relativamente, ya que los puntos están distribuidos a lo largo de la línea e igual cantidad de puntos sobre y debajo de ésta.

4.2.3 Materia grasa. El CUADRO 9 resume las mejores resultados obtenidos en el proceso de calibración para esta variable, además de las características de las ecuaciones que generaron estos resultados.

CUADRO 9. Mejores ecuaciones obtenidas para materia grasa.

| N | T.M | C.D | SEC | R ² | SECV | 1-VR | Prom | D.E | D.E/SECV |
|-----|-----------|--------|-------|----------------|-------|-------|--------|-------|----------|
| 226 | 1,20,5,1 | None | 0,524 | 0,848 | 0,557 | 0,828 | 10,332 | 1,345 | 2,41 |
| 226 | 1,20,10,1 | None | 0,525 | 0,848 | 0,558 | 0,827 | 10,332 | 1,345 | 2,41 |
| 226 | 2,20,5,1 | SNV+DT | 0,531 | 0,844 | 0,560 | 0,826 | 10,332 | 1,345 | 2,40 |
| 226 | 2,20,10,1 | SNV+DT | 0,531 | 0,844 | 0,561 | 0,826 | 10,332 | 1,345 | 2,40 |
| 227 | 1,10,5,1 | None | 0,539 | 0,840 | 0,562 | 0,825 | 10,339 | 1,346 | 2,40 |
| 225 | 2,10,5,1 | SNV+DT | 0,539 | 0,835 | 0,555 | 0,825 | 10,351 | 1,328 | 2,39 |
| 226 | 1,20,20,1 | None | 0,531 | 0,844 | 0,562 | 0,825 | 10,332 | 1,345 | 2,39 |

Los resultados obtenidos no son tan satisfactorios, como los obtenidos en el caso de proteínas y cenizas. En el caso de esta variable los valores para todas las ecuaciones están entre 0,835 y 0,848 para el coeficiente de calibración R² (0,848 para la primera ecuación seleccionada) y entre 0,825 y 0,828 para el coeficiente de determinación de la validación cruzada 1-VR, los cuales están por debajo de lo recomendado de 0,9, pero según lo señalado por Westerhaus (1989), citado por PELDOZA (1999) y De la Roza, (1995), citado por BEYER (1997), se encuentran dentro de lo recomendado de 0,75 y 0,85 por ambos autores respectivamente. PENMANYER y PÉREZ (1989), obtuvieron para cacao en polvo, un valor de 0,987, y los obtenidos por BÜNING-PFAUE *et al.*, (1998) para productos cárneos, con valores de 0,90, 0,97, 0,55 y 0,96, los cuales son bastante mejores que los obtenidos para sopas, la misma comparación se puede hacer con los obtenidos por GARRIDO-VARO *et al.*, (2003) con resultados para 1-VR de 0,95 y 0,94 para piensos molidos.

Con respecto a los valores de SEC éstos están entre 0,524 y 0,539 y para SECV entre 0,555 y 0,562, siendo para la mejor ecuación de 0,524 y 0,557 respectivamente.

Con respecto al índice d.e/SECV, en todas las ecuaciones seleccionadas se presentaron valores menores a 3.00 que es lo recomendado

para considerar una ecuación con calidad predictiva. Para materia grasa, el valor para este índice en la mejor ecuación es de 2,41, pero considerando el buen valor de 1-VR de 0,828, se puede considerar esta ecuación como buena para los fines de predicción de materia grasa.

Respecto de la utilización de corrección de dispersión para las ecuaciones de materia grasa, de un total de siete ecuaciones, tres utilizaron SNV+Detrend y cuatro ningún tratamiento de corrección, incluyendo las dos mejores ecuaciones.

Para todas las ecuaciones se utilizó tratamientos matemáticos con diferenciación, presentándose cuatro ecuaciones con una primera diferenciación, incluyendo a la mejor, y cuatro con una segunda diferenciación.

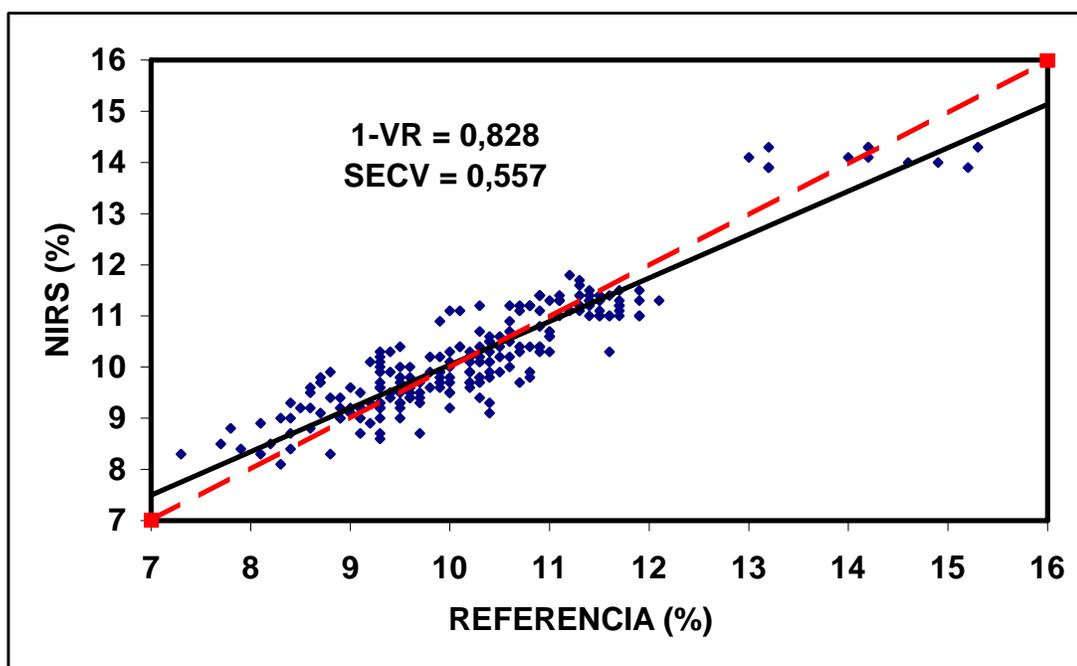


FIGURA 7. Relación entre los valores de referencia y su predicción mediante NIRS para la materia grasa.

La FIGURA 7 corresponde a la gráfica de distribución de las muestras alrededor de la línea de regresión, obtenida por la ecuación 1,20,5,1_{NONE}. Se puede observar que los puntos están más agrupados dentro del promedio y más cercanos a la línea de regresión, a pesar de que existe un amplio rango en el contenido de materia grasa de las sopas. Las muestras con altos valores de referencia tienden a ser sobrevaloradas y en otros casos subestimadas por NIRS.

4.2.4 Humedad. En el CUADRO 10 se presentan los resultados obtenidos en la calibración para humedad, además de las características de las ecuaciones que producen estos valores.

CUADRO 10. Mejores ecuaciones obtenidas para humedad.

| N | T.M | C.D | SEC | R ² | SECV | 1-VR | Prom | D.E | D.E/SECV |
|-----|-----------|--------|-------|----------------|-------|-------|-------|-------|----------|
| 228 | 1,20,20,1 | None | 0.181 | 0.887 | 0.197 | 0.867 | 5.316 | 0.540 | 2.74 |
| 228 | 2,20,5,1 | None | 0.182 | 0.882 | 0.201 | 0.857 | 5.311 | 0.531 | 2.64 |
| 228 | 2,20,20,1 | None | 0.187 | 0.877 | 0.202 | 0.856 | 5.314 | 0.533 | 2.64 |
| 229 | 2,10,5,1 | None | 0.183 | 0.874 | 0.203 | 0.856 | 5.310 | 0.536 | 2.64 |
| 229 | 2,20,10,1 | None | 0.186 | 0.878 | 0.202 | 0.856 | 5.314 | 0.532 | 2.63 |
| 230 | 2,20,20,1 | SNV+DT | 0.190 | 0.874 | 0.204 | 0.853 | 5.310 | 0.535 | 2.62 |
| 230 | 1,10,10,1 | SNV+DT | 0.186 | 0.882 | 0.208 | 0.851 | 5.314 | 0.539 | 2.59 |

Con respecto a los valores de R², todos están entre 0,874 y 0,887, siendo este último valor el obtenido para la primera ecuación, el cual está bajo el obtenido por PENAMANYER y PÉREZ (1989), de 0,978. En cuanto a 1-VR, los valores están entre 0,851 y 0,867, siendo también este último valor el obtenido en la mejor ecuación seleccionada y siendo cercanos a los publicados por GARRIDO-VARO *et al.*, (2003) de 0,82 y 0,84.

Se aprecian, a diferencia de la materia grasa, valores más bajos para SEC, los cuales están entre 0,181 y 0,190, siendo de 0,181 para la mejor

ecuación seleccionada, lo mismo se observa para el caso de SECV, en donde los valores obtenidos están entre 0,197 y 0,208, siendo para la mejor ecuación de 0,197.

Para humedad, el mejor índice d.e/SECV fue de 2,74, por de bajo del óptimo de 3,00, aunque el valor de 1-VR indica el buen grado de ajuste de la ecuación al predecir los cuatro grupos de validación cruzada, ya que podría explicar en un 86,7% las variaciones de los datos , lo que la hace una ecuación aceptable para los fines de predicción de humedad.

En la mayoría de las ecuaciones seleccionadas, no se utilizó un tratamiento de corrección de dispersión, característica que comparten las cinco primeras ecuaciones, no así las dos últimas que sí fueron tratadas con SNV+Detrend.

Por último, hay que señalar que todas las ecuaciones, en su gran mayoría fueron sometidas a una 2º diferenciación, no así la primera y la última ecuación seleccionada, las cuales fueron tratadas solo con una 1º diferenciación.

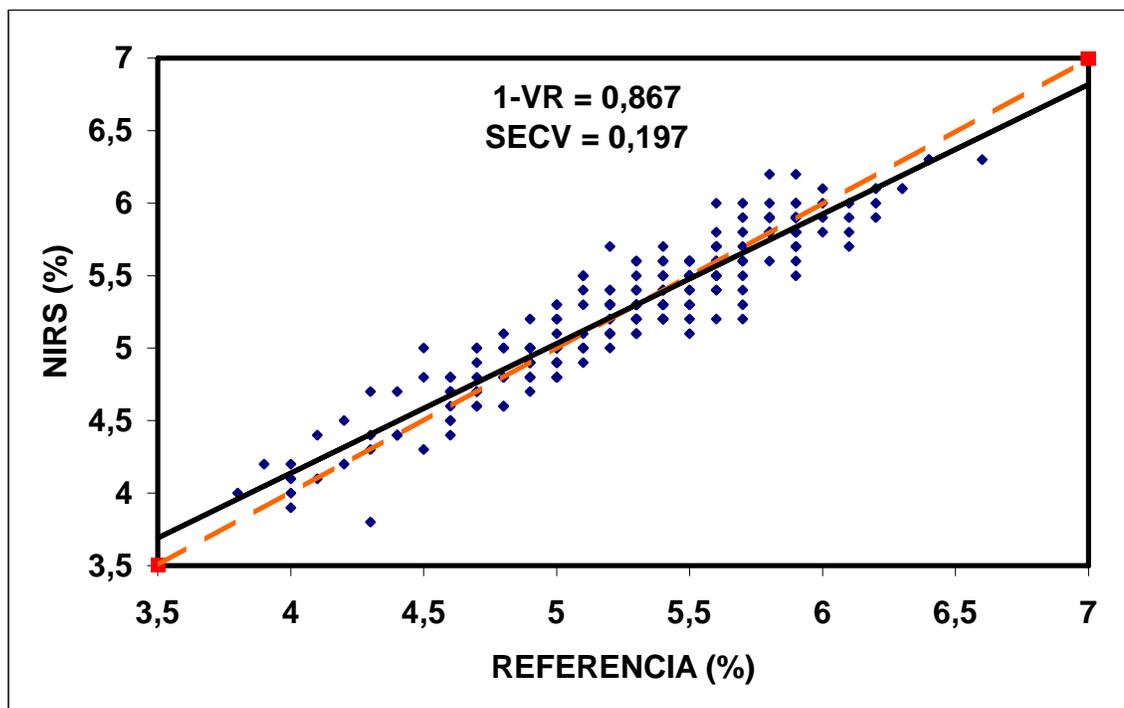


FIGURA 8. Relación entre los valores de referencia y su predicción mediante NIRS para la humedad.

La FIGURA 8 muestra la distribución de las muestras alrededor de la línea de regresión, dando una idea de la capacidad de predecir el constituyente humedad, mediante la ecuación $1,20,20,1_{NONE}$. La distribución de los puntos a través de la línea de regresión es relativamente homogénea, aunque la mayoría de las muestras se concentra en el promedio hay algunos puntos que se alejan del promedio y de la línea de regresión, las cuales son sobrevaloradas o subvaloradas por NIRS.

4.2.5 Carbohidratos disponibles. El CUADRO 11 muestra los resultados estadísticos obtenidos al calibrar para carbohidratos disponibles, además de las características de los tratamientos utilizados, los que originaron los siguientes resultados.

CUADRO 11. Mejores ecuaciones obtenidas para carbohidratos disponibles por método químico.

| N | T.M | C.D | SEC | R ² | SECV | 1-VR | Prom | D.E | D.E/SECV |
|-----|-----------|--------|-------|----------------|-------|-------|--------|-------|----------|
| 228 | 2,5,5,1 | SNV+DT | 2,538 | 0,387 | 2,563 | 0,377 | 63,545 | 3,243 | 1,27 |
| 228 | 2,10,5,1 | SNV+DT | 2,540 | 0,387 | 2,565 | 0,376 | 63,545 | 3,243 | 1,27 |
| 228 | 2,10,10,1 | SNV+DT | 2,542 | 0,385 | 2,567 | 0,375 | 63,545 | 3,243 | 1,26 |
| 229 | 1,20,20,1 | None | 2,566 | 0,389 | 2,614 | 0,368 | 63,581 | 3,281 | 1,26 |
| 229 | 1,20,10,1 | None | 2,568 | 0,388 | 2,616 | 0,367 | 63,581 | 3,281 | 1,25 |
| 229 | 1,20,5,1 | None | 2,568 | 0,388 | 2,617 | 0,367 | 63,581 | 3,281 | 1,25 |
| 229 | 2,5,5,1 | None | 2,576 | 0,384 | 2,620 | 0,366 | 63,581 | 3,281 | 1,25 |

Al observar el cuadro, se puede señalar que en los caso de los carbohidratos disponibles, los ajustes obtenidos son bastante deficientes. En el caso del SEC, se registran valores entre 2,538 y 2,576.

En el caso de R², éstos igual son poco satisfactorios, ya que se observan valores muy bajos, entre 0,384 y 0,389, siendo de 0,387 para la primera ecuación seleccionada. Esto contrasta con el valor de 0,998 para sacarosa de PENMANYER y PÉREZ (1989), Esto se ve reflejado igualmente en los resultados para 1-VR, en donde los valores son igualmente bajos, entre 0,366 y 0,377. Esta discusión de resultados de carbohidratos disponibles, solo se pudo hacer tomando en cuenta resultados de investigaciones en las cuales solo se determinaban carbohidratos como lactosa y sacaros, y no como contenido de almidón en un alimento, debido a no encontrarse bibliografía al respecto.

Tomando en cuenta los resultados anteriores, se observa que los índices d.e/SECV, son bajos, ya que éstos se encuentran entre 1,2523 y 1,2653, siendo este último para la mejor ecuación seleccionada, lo cual está muy por debajo del valor de 3,00 recomendado, además que la ecuación sólo puede explicar el 37,7% de la variación de los datos, la que la hace muy deficiente.

En las tres primeras ecuaciones predictivas se utilizó corrección de dispersión SNV+Detrend, no así en las últimas cuatro.

Por último, todas las ecuaciones fueron sometidas a un tratamiento de diferenciación, en donde las tres primeras seleccionadas fueron tratadas con una segunda derivada.

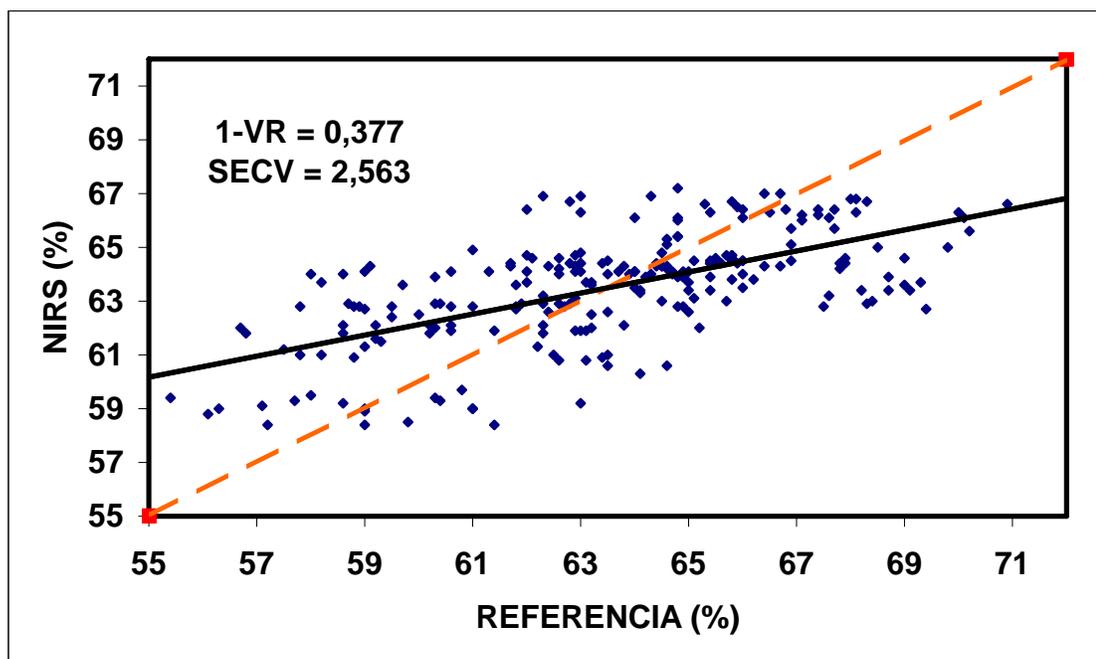


FIGURA 9. Relación entre los valores de referencia y su predicción mediante NIRS para carbohidratos disponibles por método químico.

La FIGURA 9 muestra la distribución de las muestras alrededor de la línea de regresión para la ecuación $2,5,5,1_{SNV+DT}$ para carbohidratos disponibles. Se nota una desuniforme distribución de las muestras, las cuales se encuentran muy lejanas de la línea de regresión, pero se observa un amplio rango de composición entre ellas. Los altos niveles de error son consecuencia

de una débil relación entre la predicción NIRS y los valores de referencia, ya que los datos son sobrevalorados y subvalorados por la técnica NIRS.

Como todos los métodos analíticos utilizados han sido probados estrictamente para los fines de control de calidad, resulta sospechoso que en el caso de los carbohidratos disponibles se obtengan predicciones tan imprecisas mediante NIRS. Es por esto que se realizaron también ecuaciones de calibración pero con datos de carbohidratos obtenidos por diferencia, o sea, restando a 100 el resto de los otros componente (100-[proteína+cenizas+materia grasa+humedad]).

El CUADRO 12 muestra los resultados obtenidos para carbohidratos por diferencia.

CUADRO 12. Mejores ecuaciones obtenidas para carbohidratos por diferencia.

| N | T.M | C.D | SEC | R ² | SECV | 1-VR | Prom | D.E | D.E/SECV |
|-----|-----------|--------|-------|----------------|-------|-------|--------|-------|----------|
| 230 | 2,20,20,1 | None | 0,817 | 0,864 | 0,835 | 0,858 | 67,194 | 2,219 | 2,66 |
| 230 | 2,20,10,1 | SNV+DT | 0,817 | 0,864 | 0,836 | 0,856 | 67,194 | 2,219 | 2,65 |
| 233 | 1,10,10,1 | None | 0,807 | 0,866 | 0,831 | 0,857 | 67,213 | 2,204 | 2,65 |
| 229 | 1,10,5,1 | None | 0,807 | 0,866 | 0,832 | 0,857 | 67,213 | 2,204 | 2,65 |
| 230 | 2,20,5,1 | None | 0,818 | 0,864 | 0,838 | 0,857 | 67,194 | 2,219 | 2,65 |
| 229 | 1,20,5,1 | SNV+DT | 0,812 | 0,864 | 0,835 | 0,856 | 67,213 | 2,204 | 2,64 |
| 229 | 1,20,10,1 | None | 0,812 | 0,864 | 0,835 | 0,856 | 67,213 | 2,204 | 2,64 |

El cuadro muestra bastantes diferencias con respecto a los resultados obtenidos para carbohidratos disponibles determinados por el método analítico de la Antrona, ya que en el caso de los valores de SEC y de SECV, éstos son de 0,817 y 0,835 respectivamente, los cuales contrastan con los altos valores obtenidos para estos índices.

Para R^2 y 1-VR, los valores obtenidos son satisfactorios, ya que son de 0,864 y 0,858 respectivamente, los cuales pueden ser considerados buenos según lo señalan Westerhaus (1989), citado por PELDOZA (1999) y De la Roza (1995), citado por BEYER (1997), quienes sostienen que valores entre 0,75 y 0,85 son satisfactorios.

Los índices d.e/SECV son también mejores, ya que para la mejor ecuación con tratamiento matemático 2,20,20,1_{NONE}, da un valor de 2,66, lo cual difiere bastante de 1,27 arrojado para carbohidratos disponibles determinados por el método analítico y aunque es menor a 3,00, se puede considerar una ecuación utilizable para fines de predicción debido a que el valor de 1-VR es satisfactorio.

En la mayoría de las ecuaciones realizadas no hay corrección de dispersión (cinco de un total de siete), además de esto las primeras dos ecuaciones seleccionadas fueron sometidas a una segunda diferenciación.

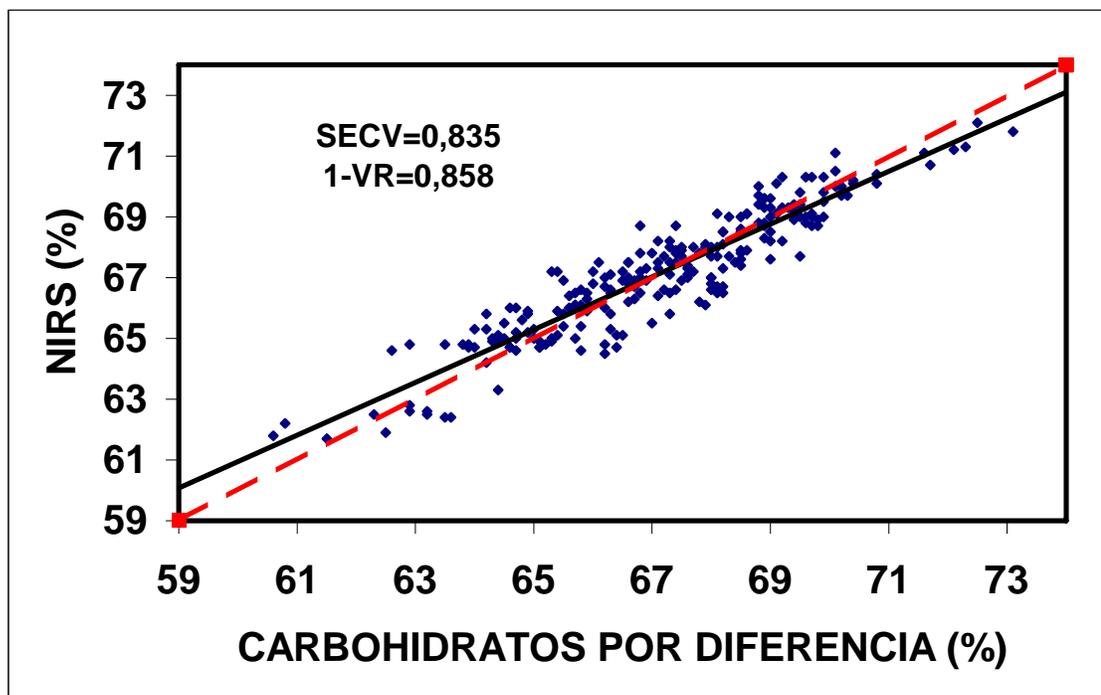


FIGURA 10. Relación entre los valores obtenidos por diferencia y su predicción por NIRS.

La FIGURA 10 muestra para ecuación 2,20,20,1_{NONE} que a diferencia de la gráfica anterior para carbohidratos disponibles por el método de Antrona, los puntos se encuentran mas cercanos a la línea de regresión, esto debido en parte al mejor valor de SECV y 1-VR obtenidos en este caso para los carbohidratos determinados por diferencia, aunque hay algunos puntos que corresponden a muestras con valores mayores al promedio y que se encuentran bajo la línea de igual respuesta lo que indica que son subvaloradas por NIRS.

Como los carbohidratos determinados por diferencia arrojan mejores resultados en NIRS se puede señalar que el método NIRS detecta no solo el almidón en las muestras de sopas, sino que otros carbohidratos que componen el producto, como maltodextrinas que son agregadas durante la elaboración de las sopas una vez terminado el proceso de extrusión, cuando se lleva a cabo la

molienda y el mezclado en donde se agregan finamente los aceites vegetales junto a las maltodextrinas, lo cual puede interferir finalmente en el análisis químico, ya que estas maltodextrinas pueden no ser detectables por acción de las grasas vegetales.

5 CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación, se puede concluir que:

- Las ecuaciones de calibración generadas para la determinación de proteínas y cenizas son las que predicen con mayor exactitud, obteniéndose índices d.e/SECV con valores mayores a 3,0, además de tener un coeficiente de determinación de validación cruzada de 0,995 y 0,924 respectivamente.
- Para materia grasa y humedad, las ecuaciones seleccionadas presentan índices d.e/SECV de 2,41 y 2,74, pero valores de 1-VR de 0,828 y 0,867 respectivamente, lo que las hace útiles para fines de predicción.
- El tratamiento matemático más repetido fue el 1,20,20,1 sin corrección de dispersión, en proteína y materia grasa, arrojando para el primer nutriente el mejor indicador d.e/SECV, además para cenizas también fue el que arrojó el mejor indicador, pero utilizando corrección de dispersión (SNV+DT).
- La mayoría de las ecuaciones seleccionadas fueron tratadas con una primera diferenciación, con excepción de las mejores ecuaciones para carbohidratos disponibles determinados por método químico y por diferencia.
- Los resultados obtenidos para carbohidratos disponibles determinados por método químico fueron los más deficientes con índice d.e/SECV de

1,27, y con un valor de 1-VR de 0,377, no así para los carbohidratos determinados por diferencia con d.e/SECV de 2,66 y 1-VR de 0,858.

- Se puede concluir finalmente que es posible obtener ecuaciones de calibración con alta confiabilidad mediante la técnica NIRS para la determinación de proteínas y cenizas, pero no tan confiables para la determinación de materia grasa y humedad. En cuanto a carbohidratos se puede predecir su composición, pero teniendo como método de referencia su determinación por diferencia con el resto de las fracciones.

6 RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar el potencial de la espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) como un método analítico para predecir la composición nutricional de sopas crema deshidratadas.

Se colectaron los espectros NIR de muestras de cuatro tipos de sopas (arvejas, lentejas, espárragos y verduras) y de diferentes fabricantes (monocromador NIRSystems 6500) y posteriormente fueron analizadas para proteína, cenizas totales, materia grasa, humedad y carbohidratos disponibles. Las ecuaciones de calibración fueron desarrolladas con diferentes tratamientos matemáticos de los datos espectrales y se utilizó un tratamiento de corrección de dispersión (SNV+DT). El método de regresión utilizado fue el de los cuadrados mínimos parciales modificados (MPLS). Se realizó una validación cruzada para evaluar las calibraciones de acuerdo al coeficiente de determinación ($1-VR$) y el error estándar de validación cruzada (SECV), además de la relación $d.e./SECV$.

Los respectivos resultados muestran que el NIRS puede ser usado para predecir el contenido de proteína, cenizas totales, materia grasa y humedad, con alta confiabilidad para proteínas y cenizas, pero no son tan confiables para el caso de materia grasa y humedad. También el método puede ser utilizado para carbohidratos disponibles, pero sólo cuando estos se determinan por diferencia como método de referencia, ya que el método analítico de la Antrona resulta dudoso.

SUMMARY

The objective of the present study was to evaluate the potential of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS), as analytical method to predict the nutritional composition of dehydrated cream soups.

Samples from four types of soups (peas, lentils, asparagus and vegetables) and different manufacturers were scanned for their NIR spectra in a NIRSystems 6500 monochromator and subsequently analyzed for protein, total ashes, fat, moisture and available carbohydrates. Calibration equations were developed with different mathematical treatments of the spectral data and a scatter correction treatment (SNV+DT) was used. The regression method used was the modified partial least squares (MPLS). A cross validation was carried out in order to assess calibration according the determination co-efficients (1-VR), standard error of cross validation (SECV) and the relation d.e/SECV.

The respective results show that the NIRS can be used to predict the protein contents, total ashes, fats and moisture, with high reliability for proteins and total ashes, but are not so reliable as in the case of fats and moisture. Also the method can be used for available carbohydrates, but only when these are determined by difference as a reference method, since the analytical method of the Antrona is doubtful.

7 BIBLIOGRAFÍA

- ALOMAR, D y FUCHSLOCHER, R. 1998. Fundamentos de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) como método de análisis de forraje. *Agrosur*. 26 (1): 88-104.
- ALOMAR, D., GALLO, C., CASTAÑEDA, M y FUCHSLOCHER, R. 2003. Chemical and discriminate analysis of bovine meat by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). *Meat Science*. 63: 441-450.
- ANRIQUE, R., MOREIRA, V., DUMONT, J. C y ALOMAR, D. 1996. Valor energético de ensilajes de corte directo en la zona sur. *In: 8eds Avances en Producción Animal*. Universidad Austral de Chile.
- APPEL. 1996. Recent development and out-book for on-line monitoring in the food industry. *In Focus*. 20(1): 4-7.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). 1984. Official method 7.009. ash of animal feeds. Official methods of analysis of the AOAC. 14^o edición. Editado por Sidney Williams. Publicado por AOAC. Arlington. Virginia. U.S.A.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). 1995. Official method 954.02. fat (crude) or ether extract in some pet foods. Official methods of analysis of the AOAC. 12^o edición. The Association: Washington D.C. 942 p.

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). 1995. Official method 963-29. Official methods of analysis of the AOAC. 12^o edición. The Association: Washington D.C. 942 p.
- BAER, R., FRANK, J y LOEWENSTEIN, L. 1983. Compositional analysis of nonfat dry milk by using near infrared diffuse reflectance spectroscopy. Journal of AOAC. 66(4): 858-863.
- BARNES, R y DHANOA, M. 1988. Advances in near infrared calibration. Development and transfer. Food Science and Technology Today. 2(2): 143-146.
- BARTON II, F. 2002. Theory and principles of near infrared spectroscopy. In: Near infrared spectroscopy. Proceedings of the 10 th International Conference. Editado por A. Davies y R. Cho. Nirs publications. U. K
- BATTEN, G. 1998. Plant analysis using near infrared reflectance spectroscopy: The potential and limitations. Australian Journal of Experimental Agriculture. 38: 697-706.
- BEYER, E. 1997. Dinámica de la degradación ruminal de la materia seca de ensilajes y su predicción por espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano NIRS. Tesis Lic. Agronomía. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 125 p.
- BOKOBZA, L. 1998. Near infrared spectroscopy. Journal of Near Infrared Spectroscopy. 6: 3-17.

- BROWN, T., LEMAY, E., BURSTEN, B y BURDGE J. 2004. Química la ciencia central. 9º Edición. Traducido por H. Escalona y R. Escalona. México. Pearson Education. 1152 p.
- BÜNING-PFAU, H., HARTMANN, R., KEHRAUS, S y URBAN, C. 1998. Near infrared spectroscopy analysis of food and its achievable performance. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. 6: A27-A33.
- CABRERA, J., LÓPEZ, F y AGUILLÓ-LÓPEZ, F. 1993. Óptica electromagnética. Addison_Wesley Iberoamericana. Wilmington, Delaware, Estados Unidos. 256 p.
- CHANG, R. 2001. Química. 6ºEdición. Traducido por M.C Ramírez y R. Zugazagoitia. McGraw Hill. México. 1046 p.
- CHILE. MINISTERIO DE SALUD. 2004. Crema Años Dorados: I. Especificaciones técnicas. II. Control de calidad. Santiago. Chile. 34 p.
- CLARK, D., WINSRYG, M y HONERY, E. 1991. Basics of near infrared reflectance spectroscopy. In: National Forage Testing Association. Forage Analysis Workshop. 18-37.
- COLEMAN, S., CHRIATIANSEN, S y SHENK, J. 1990. Prediction of botanical composition using NIRS calibration development from botanically pure samples. *Crop Science*. 30: 202-207.
- COVENTRY, A. 1988. The development and application of NIR with particular reference to the food industry. *Food Science and Technology Today*. 2(2): 130-131.

COZZOLINO, D., FASSIO, A y FERNÁNDEZ, E. 2003. Uso de la espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano para el análisis de calidad de ensilaje de maíz. Agricultura Técnica (Chile). 63(4): 387-393. INIA. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS. On line: <[http://alerce.inia.cl/agriculturattec/Documentos/v.63\(04\)/NR30321%20p%20387-393.pdf](http://alerce.inia.cl/agriculturattec/Documentos/v.63(04)/NR30321%20p%20387-393.pdf)> (02.11.2004).

DEAVILLE, E y FLINN, P. 2000. Near-infrared (NIR) spectroscopy: an alternative approach for the estimation of forage quality and voluntary intake. In: Forage Evaluation in Ruminant Nutrition. Editado por D. GivenS., E. Owen., R. Axford y H. Omed. CABI Publishing. Londres. UK. Pp 301-320.

DE VICENZI, C. 2002. Potencial de la espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS), para la predicción de la composición botánica en praderas de la décima región. Tesis Lic en Agronomía. Valdivia. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. 84 p.

FOX, M Y WHITESELL, J. 2000. Química Orgánica. 2º edición . Traducido por H. Escalona. Pearson Educación. México. 1232 p.

GARRIDO-VARO, A., CARRTE, R y FERNÁNDEZ-CABAÑAS, V. 1998. Use of difference near infrared reflectance spectra to extract relevant information from the spectra Agro-Food Products. Journal of Near Infrared Spectroscopy. 6: A159-A162.

GARRIDO-VARO, A., PÉREZ, M., GURRERO, J y GÓMEZ, A. 2003. Avances en la utilización de la tecnología NIRS. Aplicaciones en Producción Animal. Departamento de Producción Animal. Universidad Politécnica de Córdoba. España. On line: <http://www.etsia.upm.es/fedna/capitulos/03CAP_I.pdf> (08.11.2004).

HRUSCHKA, W. 2001. Data analysis: Wavelength selection methods. In: Near-infrared technology in the agricultural and food industries. Editado por P. Williams y K. Norris. American Association of Cereal Chemist, Inc. St. Paul. Minnesota. USA. Pp: 39-58.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (IDF/FIL). 1993. Dried milk and dried cream. Determination of water content. FIL-IDF Standards 26A: 1993, Int. Dairy Fed. Brussels. Belgium.

INFRAISOFT INTERNATIONAL. ISI. 2004. Cross validation. On line<
http://216.23.162.12/cgi-bin/winisi_public.dll?cat_id=7&show_html=cross_validation>
(17.08.2004).

KAYS, S., BARTON II, F y WINDHAM, W. 2000. Predicting protein content by near infrared reflectance spectroscopy in diverse cereal food products. Journal of Near Infrared Spectroscopy. 8: 35-43.

KUROWSKI, C., TIMM, D., GRUMMISCH, U., MEYHACK, U y GRUNEWALD, H. 1998. The benefits of near infrared analysis for food products quality. Journal of Near Infrared Spectroscopy. 6: A343-A348.

- LARRAHONDO, J. E., PALAU, F. J y RAMÍREZ, C. 2001. Espectroscopia de infrarrojo cercano NIR. CENICAÑA. Centro de Investigación de la Caña de Azúcar. Colombia. On line: <http://www.cenicana.org/Publicaciones/Serie_Procesos_Industriales/Spi_1.pdf> (04.05.2004).
- LU, J., MCCLURE, W., BARTON II, F y HIMMELSBACH, D. 1998. Effect of random noise on the performance of NIR calibrations. Journal of Near Infrared Spectroscopy. 6: 77-87.
- MABRY, T. 2003. The electromagnetic spectrum. University of Texas. Austin. Texas. USA. On line: <<http://www.esb.utexas.edu/mabrybio211/chapter10/14-Electromagnetic-Spectrum.jpg>> (30.06.2004).
- MARTENS, H y NAES, T. 2001. Multivariate calibration by data compression. In: Near-Infrared technology in agricultural and food industries. Editado por Phil Williams y Karl Norris. American Association of Cereal Chemists, Inc. St, Paul. Minnesota. USA. Pp: 59-100.
- MARTÍNEZ, R. 2002. Caracterización del comportamiento reológico de sopa crema orientada a control de calidad. Tesis Lic en Ing en Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 133 p.
- MILLER, C. 2001. Chemical principles of near infrared technology. In: Near-infrared technology in the agricultural and food industries. Editado por Phil Williams y Karl Norris. American Association of Cereal Chemists. St Paul, Minnesota. USA. Pp: 19-37.

- MUERENS, M. 1998. Spectral amplification in near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. 6: A207-A210.
- MURRAY, I. 1988. Aspects of the interpretation of near infrared spectra. *Food Science and Technology Today*. 2(2): 135-140.
- NORRIS, K. 1996. History of NIR. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. 4: 31-37.
- OSBORNE, B., FEARN, T y HINDLE, P. 1993. *Practical Nirs spectroscopy with applications in food and beverage analysis*. 2º ed. Inglaterra. Longman Scientific and Technical. 217 p.
- OSBORNE, D y VOOGT, P. 1978. The análisis of nutrients of foods. Serie Food Science and Technology. Academic. Londres. Reino Unido. Pp: 130-131.
- PELDOZA, C. 1999. Desarrollo de ecuaciones de calibración para predecir la composición nutricional de ensilaje de pradera mediante espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS). Tesis Lic en Agronomía. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 126 p.
- PERMANYER, J y PÉREZ, M. 1989. Compositional analysis of powdered cocoa products by near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Food Science*. 54(3): 768-769.
- RUBINSON, K y RUBINSON, J. 2001. *Análisis instrumental*. Traducido por Y. Madrid. Printence Hall Pearson Education. Madrid. España. 847 p.

- RUIZ, N. 2001. Near infrared spectroscopy: Present and Future Applications. ContiGroup Companies, Inc. USA. Technical Bulletin ASA (American Soybean Association). On line: <<http://www.asasea.com/feed.html>>
- SERWAY, R. 1999. Física. 4^o Ed en español. Traducido por G. Nagore. McGraw-Hill. México. 2v. 1463p.
- SHENK, J. S y WESTERHAUS, M. O. 1994. The application of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to forage analysis. In: Forage quality, evaluation and utilization. Fahey, G (ed). Based on the national conference of forage quality, Evaluation and utilization held at the University of Nebraska, Lincoln, USA, 13-15 August 1994. Pp: 406-448.
- SKOOG, D., HOLLER, F. J y NIEMAN, T. 2001. Principios de análisis instrumental. 5^o Ed en español. Traducido por M. C. Martín., B. López., M. A. Martín., G. Garcedo y A. I. Olives. McGraw-Hill Interamericana. Madrid. España. 1028 p.
- SMITH, K. F y FLINN, P. C. 1991. Monitoring the performance of a broad-based calibration for measuring the nutritive value of two independent populations of pasture using near infrared reflectance (NIR) spectroscopy. Australian Journal of Experimental Agriculture. 31: 205-210.
- STOCKEBRAND, S. 2000. Efecto del método de secado sobre la composición química de los ensilajes de pradera y la potencialidad del NIRS en su predicción. Tesis Lic en Agronomía. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 68 p.

WETZEL, D. 2001. Contemporary Near_Infrared Instruments. In: Near-infrared technology in the agricultural and food industries. Editado por P. Williams y K. Norris. American Association of Cereal Chemist, Inc. St, Paul. Minnesota. USA. Pp: 39-58.

WILLIAMS, P y NORRIS, K. 2001. Variables affecting near-infrared spectroscopic analysis. In: Near-infrared technology in the agricultural and food industries. Editado por Phil Williams y Karl Norris. American Association of Chemists, Inc. St, Paul. Minnesota. USA. Pp: 171-185.

ANEXOS

ANEXO 1
Calibraciones NIRS para proteínas

| N | T.M | C.D | SEC | R² | SECV | 1-VR | SD | SD/SECV |
|----------|------------|------------|------------|----------------------|-------------|-------------|-----------|----------------|
| 222 | 1,20,20,1 | NONE | 0,269 | 0,958 | 0,279 | 0,955 | 1,316 | 4,7168 |
| 225 | 1,10,5,1 | SNV+DT | 0,274 | 0,956 | 0,282 | 0,953 | 1,304 | 4,6241 |
| 224 | 1,5,5,1 | SNV+DT | 0,267 | 0,957 | 0,281 | 0,952 | 1,286 | 4,5765 |
| 225 | 1,10,10,1 | SNV+DT | 0,280 | 0,955 | 0,289 | 0,952 | 1,318 | 4,5606 |
| 227 | 1,5,5,1 | NONE | 0,285 | 0,954 | 0,295 | 0,951 | 1,331 | 4,5119 |
| 226 | 1,10,10,1 | NONE | 0,285 | 0,954 | 0,295 | 0,950 | 1,325 | 4,4915 |
| 225 | 2,20,5,1 | SNV+DT | 0,285 | 0,953 | 0,292 | 0,950 | 1,304 | 4,4657 |
| 225 | 1,20,5,1 | SNV+DT | 0,279 | 0,954 | 0,293 | 0,949 | 1,305 | 4,4539 |
| 225 | 2,20,10,1 | SNV+DT | 0,279 | 0,954 | 0,293 | 0,949 | 1,305 | 4,4539 |
| 226 | 1,20,5,1 | NONE | 0,284 | 0,953 | 0,295 | 0,949 | 1,312 | 4,4475 |
| 226 | 1,20,10,1 | NONE | 0,286 | 0,953 | 0,296 | 0,949 | 1,312 | 4,4324 |
| 226 | 2,20,20,1 | SNV+DT | 0,284 | 0,953 | 0,297 | 0,948 | 1,304 | 4,3906 |
| 228 | 1,10,5,1 | NONE | 0,294 | 0,951 | 0,305 | 0,947 | 1,329 | 4,3574 |
| 226 | 1,20,10,1 | SNV+DT | 0,286 | 0,952 | 0,300 | 0,947 | 1,303 | 4,3433 |
| 227 | 1,20,20,1 | SNV+DT | 0,290 | 0,950 | 0,300 | 0,947 | 1,301 | 4,3367 |
| 228 | 0,0,10,1 | NONE | 0,297 | 0,948 | 0,305 | 0,945 | 1,303 | 4,2721 |
| 228 | 0,10,10,1 | NONE | 0,297 | 0,948 | 0,305 | 0,945 | 1,303 | 4,2721 |
| 228 | 0,0,5,1 | NONE | 0,300 | 0,948 | 0,307 | 0,945 | 1,308 | 4,2606 |
| 228 | 0,5,5,1 | NONE | 0,300 | 0,948 | 0,307 | 0,945 | 1,308 | 4,2606 |
| 228 | 2,20,20,1 | NONE | 0,298 | 0,948 | 0,312 | 0,943 | 1,309 | 4,1955 |
| 228 | 2,10,10,1 | SNV+DT | 0,297 | 0,949 | 0,313 | 0,943 | 1,313 | 4,1949 |
| 228 | 2,10,5,1 | SNV+DT | 0,303 | 0,947 | 0,316 | 0,942 | 1,313 | 4,1551 |
| 229 | 2,20,5,1 | NONE | 0,306 | 0,943 | 0,315 | 0,942 | 1,306 | 4,1460 |
| 229 | 2,20,10,1 | NONE | 0,307 | 0,945 | 0,315 | 0,942 | 1,306 | 4,1460 |
| 228 | 0,0,5,1 | SNV+DT | 0,299 | 0,945 | 0,316 | 0,939 | 1,283 | 4,0601 |
| 230 | 0,5,5,1 | SNV+DT | 0,299 | 0,945 | 0,316 | 0,939 | 1,283 | 4,0601 |
| 229 | 0,0,10,1 | SNV+DT | 0,308 | 0,944 | 0,321 | 0,939 | 1,300 | 4,0498 |
| 229 | 0,10,10,1 | SNV+DT | 0,308 | 0,944 | 0,321 | 0,939 | 1,300 | 4,0498 |
| 229 | 2,10,10,1 | NONE | 0,314 | 0,943 | 0,324 | 0,938 | 1,309 | 4,0401 |
| 229 | 2,5,5,1 | SNV+DT | 0,302 | 0,945 | 0,320 | 0,939 | 1,292 | 4,0375 |
| 228 | 2,10,5,1 | NONE | 0,308 | 0,943 | 0,321 | 0,938 | 1,292 | 4,0249 |
| 229 | 2,5,5,1 | NONE | 0,311 | 0,942 | 0,324 | 0,937 | 1,292 | 3,9877 |

ANEXO 2
Calibraciones NIRS para cenizas

| N | T.M | C.D | SEC | R² | SECV | 1-VR | SD | SD/SECV |
|----------|------------|------------|------------|----------------------|-------------|-------------|-----------|----------------|
| 225 | 1,20,20,1 | SNV+DT | 0.133 | 0.936 | 0.145 | 0.924 | 0.527 | 3.6345 |
| 226 | 1,5,5,1 | SNV+DT | 0.129 | 0.941 | 0.147 | 0.924 | 0.531 | 3.6122 |
| 225 | 2,5,5,1 | SNV+DT | 0.136 | 0.935 | 0.147 | 0.923 | 0.531 | 3.6122 |
| 224 | 1,20,20,1 | NONE | 0.135 | 0.934 | 0.146 | 0.923 | 0.526 | 3.6027 |
| 226 | 1,10,10,1 | SNV+DT | 0.133 | 0.937 | 0.148 | 0.922 | 0.531 | 3.5878 |
| 225 | 1,10,10,1 | NONE | 0.133 | 0.937 | 0.149 | 0.921 | 0.531 | 3.5638 |
| 225 | 1,10,5,1 | SNV+DT | 0.131 | 0.939 | 0.149 | 0.921 | 0.531 | 3.5638 |
| 225 | 1,20,5,1 | NONE | 0.137 | 0.933 | 0.151 | 0.919 | 0.531 | 3.5166 |
| 227 | 1,20,5,1 | SNV+DT | 0.137 | 0.933 | 0.151 | 0.918 | 0.530 | 3.5099 |
| 227 | 1,20,10,1 | SNV+DT | 0.139 | 0.932 | 0.151 | 0.919 | 0.530 | 3.5099 |
| 226 | 0,5,5,1 | SNV+DT | 0.140 | 0.930 | 0.152 | 0.917 | 0.529 | 3.4803 |
| 226 | 0,0,5,1 | SNV+DT | 0.140 | 0.930 | 0.152 | 0.917 | 0.529 | 3.4802 |
| 226 | 1,10,5,1 | NONE | 0.137 | 0.934 | 0.153 | 0.917 | 0.532 | 3.4771 |
| 228 | 2,5,5,1 | NONE | 0.140 | 0.933 | 0.155 | 0.916 | 0.538 | 3.4710 |
| 226 | 0,0,10,1 | SNV+DT | 0.141 | 0.929 | 0.153 | 0.916 | 0.529 | 3.4575 |
| 226 | 0,10,10,1 | SNV+DT | 0.141 | 0.929 | 0.153 | 0.916 | 0.529 | 3.4575 |
| 228 | 1,5,5,1 | NONE | 0.142 | 0.931 | 0.158 | 0.914 | 0.541 | 3.4241 |
| 227 | 2,20,10,1 | SNV+DT | 0.142 | 0.930 | 0.157 | 0.915 | 0.537 | 3.4204 |
| 226 | 1,20,10,1 | NONE | 0.139 | 0.931 | 0.154 | 0.915 | 0.530 | 3.4416 |
| 227 | 2,20,20,1 | SNV+DT | 0.144 | 0.926 | 0.157 | 0.912 | 0.530 | 3.3758 |
| 229 | 2,20,20,1 | NONE | 0.147 | 0.926 | 0.161 | 0.911 | 0.540 | 3.3540 |
| 228 | 2,10,5,1 | SNV+DT | 0.150 | 0.920 | 0.160 | 0.908 | 0.529 | 3.3063 |
| 228 | 2,10,5,1 | NONE | 0.150 | 0.920 | 0.162 | 0.907 | 0.532 | 3.2840 |
| 229 | 2,10,10,1 | NONE | 0.149 | 0.921 | 0.162 | 0.906 | 0.531 | 3.2778 |
| 229 | 2,10,10,1 | SNV+DT | 0.149 | 0.922 | 0.163 | 0.905 | 0.531 | 3.2577 |
| 229 | 2,20,5,1 | SNV+DT | 0.155 | 0.917 | 0.166 | 0.904 | 0.537 | 3.2349 |
| 230 | 2,20,5,1 | NONE | 0.158 | 0.914 | 0.167 | 0.903 | 0.539 | 3.2275 |
| 231 | 2,20,10,1 | NONE | 0.163 | 0.908 | 0.173 | 0.896 | 0.538 | 3.1098 |
| 227 | 0,0,5,1 | NONE | 0.197 | 0.902 | 0.180 | 0.886 | 0.534 | 2.9667 |
| 227 | 0,5,5,1 | NONE | 0.167 | 0.902 | 0.180 | 0.886 | 0.534 | 2.9667 |
| 228 | 0,0,10,1 | NONE | 0.166 | 0.902 | 0.182 | 0.882 | 0.531 | 2.9176 |
| 228 | 0,10,10,1 | NONE | 0.166 | 0.902 | 0.182 | 0.882 | 0.531 | 2.9176 |

ANEXO 3

Calibraciones NIRS para materia grasa.

| N | T.M | C.D | SEC | R ² | SECV | 1-VR | SD | SD/SECV |
|-----|-----------|--------|-------|----------------|-------|-------|-------|---------|
| 226 | 1,20,5,1 | NONE | 0.524 | 0.848 | 0.557 | 0.828 | 1.345 | 2.4147 |
| 226 | 1,20,10,1 | NONE | 0.525 | 0.848 | 0.558 | 0.827 | 1.345 | 2.4104 |
| 226 | 2,20,5,1 | SNV+DT | 0.531 | 0.844 | 0.560 | 0.826 | 1.345 | 2.4018 |
| 226 | 2,20,10,1 | SNV+DT | 0.531 | 0.844 | 0.561 | 0.826 | 1.345 | 2.3975 |
| 227 | 1,10,5,1 | NONE | 0.539 | 0.840 | 0.562 | 0.825 | 1.346 | 2.3950 |
| 226 | 1,20,20,1 | NONE | 0.531 | 0.844 | 0.562 | 0.825 | 1.345 | 2.3932 |
| 225 | 2,10,5,1 | SNV+DT | 0.539 | 0.835 | 0.555 | 0.825 | 1.328 | 2.3928 |
| 227 | 2,20,5,1 | NONE | 0.548 | 0.846 | 0.561 | 0.825 | 1.342 | 2.3922 |
| 227 | 2,20,10,1 | NONE | 0.528 | 0.845 | 0.561 | 0.824 | 1.342 | 2.3922 |
| 225 | 2,10,10,1 | SNV+DT | 0.541 | 0.834 | 0.557 | 0.823 | 1.328 | 2.3842 |
| 227 | 2,20,20,1 | NONE | 0.531 | 0.844 | 0.564 | 0.823 | 1.342 | 2.3794 |
| 229 | 2,5,5,1 | NONE | 0.547 | 0.840 | 0.568 | 0.821 | 1.345 | 2.3680 |
| 227 | 2,5,5,1 | SNV+DT | 0.546 | 0.832 | 0.565 | 0.819 | 1.331 | 2.3558 |
| 229 | 2,10,5,1 | NONE | 0.552 | 0.832 | 0.573 | 0.818 | 1.345 | 2.3473 |
| 227 | 2,20,20,1 | SNV+DT | 0.545 | 0.836 | 0.576 | 0.816 | 1.346 | 2.3368 |
| 226 | 1,5,5,1 | SNV+DT | 0.548 | 0.827 | 0.564 | 0.814 | 1.308 | 2.3138 |
| 226 | 1,10,5,1 | SNV+DT | 0.545 | 0.826 | 0.566 | 0.813 | 1.308 | 2.3110 |
| 227 | 0,0,5,1 | NONE | 0.551 | 0.831 | 0.581 | 0.812 | 1.342 | 2.3098 |
| 227 | 0,5,5,1 | NONE | 0.551 | 0.831 | 0.581 | 0.812 | 1.342 | 2.3098 |
| 229 | 1,5,5,1 | NONE | 0.553 | 0.831 | 0.583 | 0.811 | 1.345 | 2.3070 |
| 228 | 2,10,10,1 | NONE | 0.548 | 0.824 | 0.569 | 0.811 | 1.308 | 2.2988 |
| 229 | 1,10,10,1 | NONE | 0.563 | 0.825 | 0.586 | 0.809 | 1.345 | 2.2952 |
| 226 | 1,20,5,1 | SNV+DT | 0.550 | 0.823 | 0.571 | 0.809 | 1.308 | 2.2907 |
| 226 | 1,20,10,1 | SNV+DT | 0.551 | 0.822 | 0.571 | 0.809 | 1.308 | 2.2907 |
| 226 | 1,20,20,1 | SNV+DT | 0.554 | 0.821 | 0.573 | 0.808 | 1.308 | 2.2775 |
| 229 | 0,0,10,1 | SNV+DT | 0.579 | 0.817 | 0.595 | 0.806 | 1.353 | 2.2739 |
| 229 | 0,10,10,1 | SNV+DT | 0.579 | 0.817 | 0.595 | 0.806 | 1.353 | 2.2739 |
| 228 | 0,0,10,1 | NONE | 0.562 | 0.825 | 0.592 | 0.805 | 1.344 | 2.2703 |
| 228 | 0,10,10,1 | NONE | 0.562 | 0.825 | 0.592 | 0.805 | 1.344 | 2.2703 |
| 227 | 1,20,10,1 | SNV+DT | 0.554 | 0.821 | 0.577 | 0.806 | 1.309 | 2.2686 |
| 230 | 0,0,5,1 | SNV+DT | 0.586 | 0.813 | 0.603 | 0.801 | 1.354 | 2.2454 |
| 230 | 0,5,5,1 | SNV+DT | 0.586 | 0.813 | 0.603 | 0.801 | 1.354 | 2.2454 |

ANEXO 4
Calibraciones NIRS para humedad

| N | T.M | C.D | SEC | R² | SECV | 1-VR | SD | SD/SECV |
|----------|------------|------------|------------|----------------------|-------------|-------------|-----------|----------------|
| 228 | 1,20,201 | NONE | 0.181 | 0.887 | 0.197 | 0.867 | 0.540 | 2.7411 |
| 228 | 2,20,5,1 | NONE | 0.182 | 0.882 | 0.201 | 0.857 | 0.531 | 2.6418 |
| 229 | 2,10,5,1 | NONE | 0.183 | 0.884 | 0.203 | 0.856 | 0.536 | 2.6404 |
| 228 | 2,20,20,1 | NONE | 0.187 | 0.877 | 0.202 | 0.856 | 0.533 | 2.6386 |
| 229 | 2,20,10,1 | NONE | 0.186 | 0.878 | 0.202 | 0.856 | 0.532 | 2.6337 |
| 230 | 2,20,20,1 | SNV+DT | 0.190 | 0.874 | 0.204 | 0.853 | 0.535 | 2.6225 |
| 230 | 1,10,101 | SNV+DT | 0.186 | 0.882 | 0.208 | 0.851 | 0.539 | 2.5913 |
| 231 | 2,10,10,1 | NONE | 0.188 | 0.876 | 0.207 | 0.850 | 0.536 | 2.5894 |
| 229 | 2,10,10,1 | SNV+DT | 0.194 | 0.868 | 0.208 | 0.848 | 0.534 | 2.5673 |
| 231 | 2,10,5,1 | SNV+DT | 0.194 | 0.871 | 0.211 | 0.847 | 0.541 | 2.5640 |
| 230 | 1,10,5,1 | NONE | 0.190 | 0.877 | 0.212 | 0.847 | 0.542 | 2.5566 |
| 227 | 1,20,5,1 | SNV+DT | 0.191 | 0.869 | 0.207 | 0.846 | 0.528 | 2.5507 |
| 230 | 1,20,5,1 | NONE | 0.188 | 0.880 | 0.213 | 0.846 | 0.543 | 2.5493 |
| 231 | 2,5,5,1 | SNV+DT | 0.205 | 0.857 | 0.214 | 0.844 | 0.543 | 2.5374 |
| 231 | 2,20,10,1 | SNV+DT | 0.198 | 0.865 | 0.210 | 0.846 | 0.537 | 2.5571 |
| 232 | 1,20,10,1 | SNV+DT | 0.194 | 0.873 | 0.215 | 0.845 | 0.545 | 2.5349 |
| 231 | 2,20,5,1 | SNV+DT | 0.201 | 0.860 | 0.212 | 0.844 | 0.537 | 2.5330 |
| 230 | 1,10,10,1 | NONE | 0.191 | 0.876 | 0.214 | 0.844 | 0.542 | 2.5327 |
| 228 | 1,20,10,1 | SNV+DT | 0.196 | 0.863 | 0.211 | 0.842 | 0.531 | 2.5166 |
| 232 | 0,0,5,1 | SNV+DT | 0.209 | 0.853 | 0.220 | 0.836 | 0.544 | 2.4727 |
| 232 | 0,5,5,1 | SNV+DT | 0.209 | 0.853 | 0.220 | 0.836 | 0.544 | 2.4727 |
| 232 | 1,5,5,1 | NONE | 0.201 | 0.863 | 0.221 | 0.835 | 0.544 | 2.4615 |
| 228 | 1,20,20,1 | SNV+DT | 0.203 | 0.847 | 0.211 | 0.833 | 0.518 | 2.4550 |
| 231 | 1,5,5,1 | SNV+DT | 0.200 | 0.860 | 0.218 | 0.833 | 0.533 | 2.4450 |
| 229 | 1,10,5,1 | SNV+DT | 0.208 | 0.844 | 0.216 | 0.830 | 0.525 | 2.4306 |
| 231 | 2,5,5,1 | NONE | 0.210 | 0.840 | 0.218 | 0.826 | 0.525 | 2.4083 |
| 234 | 0,0,10,1 | SNV+DT | 0.218 | 0.837 | 0.229 | 0.819 | 0.539 | 2.3537 |
| 234 | 0,10,10,1 | SNV+DT | 0.218 | 0.837 | 0.229 | 0.819 | 0.539 | 2.3537 |
| 231 | 0,0,5,1 | NONE | 0.227 | 0.825 | 0.232 | 0.816 | 0.542 | 2.3362 |
| 231 | 0,0,10,1 | NONE | 0.227 | 0.825 | 0.232 | 0.816 | 0.542 | 2.3362 |
| 231 | 0,5,5,1 | NONE | 0.227 | 0.825 | 0.232 | 0.816 | 0.542 | 2.3362 |
| 231 | 0,10,10,1 | NONE | 0.227 | 0.825 | 0.232 | 0.816 | 0.542 | 2.3362 |

ANEXO 5

Calibraciones NIRS para carbohidratos disponibles por método químico.

| N | T.M | C.D | SEC | R ² | SECV | 1-VR | SD | SD/SECV |
|-----|-----------|--------|-------|----------------|-------|-------|-------|---------|
| 228 | 2,5,5,1 | SNV+DT | 2.538 | 0.387 | 2.563 | 0.377 | 3.243 | 1.2653 |
| 228 | 2,10,5,1 | SNV+DT | 2.540 | 0.387 | 2.565 | 0.376 | 3.243 | 1.2643 |
| 228 | 2,10,10,1 | SNV+DT | 2.542 | 0.385 | 2.567 | 0.375 | 3.243 | 1.2633 |
| 229 | 1,20,20,1 | NONE | 2.566 | 0.389 | 2.614 | 0.368 | 3.281 | 1.2552 |
| 229 | 1,20,10,1 | NONE | 2.568 | 0.388 | 2.616 | 0.367 | 3.281 | 1.2542 |
| 229 | 1,20,5,1 | NONE | 2.568 | 0.388 | 2.617 | 0.367 | 3.281 | 1.2537 |
| 229 | 2,5,5,1 | NONE | 2.576 | 0.384 | 2.620 | 0.366 | 3.281 | 1.2523 |
| 228 | 2,20,5,1 | SNV+DT | 2.573 | 0.376 | 2.604 | 0.363 | 3.257 | 1.2508 |
| 229 | 2,10,5,1 | NONE | 2.579 | 0.382 | 2.624 | 0.364 | 3.281 | 1.2504 |
| 229 | 2,10,10,1 | NONE | 2.581 | 0.381 | 2.627 | 0.362 | 3.281 | 1.2490 |
| 228 | 1,5,5,1 | SNV+DT | 2.574 | 0.370 | 2.602 | 0.358 | 3.243 | 1.2463 |
| 229 | 2,20,10,1 | SNV+DT | 2.613 | 0.372 | 2.646 | 0.359 | 3.296 | 1.2457 |
| 229 | 2,20,20,1 | SNV+DT | 2.624 | 0.366 | 2.656 | 0.354 | 3.296 | 1.2410 |
| 229 | 1,10,5,1 | SNV+DT | 2.615 | 0.365 | 2.644 | 0.354 | 3.281 | 1.2409 |
| 229 | 1,10,10,1 | SNV+DT | 2.620 | 0.362 | 2.648 | 0.352 | 3.281 | 1.2390 |
| 229 | 2,20,5,1 | NONE | 2.607 | 0.369 | 2.653 | 0.349 | 3.281 | 1.2358 |
| 230 | 0,0,5,1 | SNV+DT | 2.616 | 0.368 | 2.664 | 0.364 | 3.290 | 1.2350 |
| 230 | 0,0,10,1 | SNV+DT | 2.616 | 0.367 | 2.664 | 0.346 | 3.290 | 1.2350 |
| 230 | 0,5,5,1 | SNV+DT | 2.616 | 0.368 | 2.664 | 0.346 | 3.290 | 1.2350 |
| 230 | 0,10,10,1 | SNV+DT | 2.616 | 0.367 | 2.664 | 0.346 | 3.290 | 1.2350 |
| 229 | 2,20,10,1 | NONE | 2.610 | 0.367 | 2.658 | 0.347 | 3.281 | 1.2344 |
| 229 | 1,20,5,1 | SNV+DT | 2.636 | 0.355 | 2.663 | 0.344 | 3.281 | 1.2321 |
| 229 | 2,20,20,1 | NONE | 2.623 | 0.361 | 2.668 | 0.342 | 3.281 | 1.2298 |
| 229 | 1,10,5,1 | NONE | 2.629 | 0.358 | 2.670 | 0.341 | 3.281 | 1.2288 |
| 229 | 1,10,10,1 | NONE | 2.633 | 0.356 | 2.674 | 0.339 | 3.281 | 1.2270 |
| 230 | 1,20,10,1 | SNV+DT | 2.676 | 0.347 | 2.709 | 0.335 | 3.312 | 1.2226 |
| 230 | 1,20,20,1 | SNV+DT | 2.684 | 0.343 | 2.717 | 0.331 | 3.312 | 1.2190 |
| 229 | 1,5,5,1 | NONE | 2.625 | 0.360 | 2.667 | 0.342 | 3.281 | 1.2002 |
| 231 | 0,0,5,1 | NONE | 2.761 | 0.297 | 2.795 | 0.284 | 3.294 | 1.1785 |
| 231 | 0,0,10,1 | NONE | 2.761 | 0.297 | 2.795 | 0.284 | 3.294 | 1.1785 |
| 231 | 0,5,5,1 | SNV+DT | 2.616 | 0.368 | 2.664 | 0.346 | 3.290 | 1.2350 |
| 231 | 0,10,10,1 | NONE | 2.716 | 0.297 | 2.785 | 0.284 | 3.294 | 1.1785 |

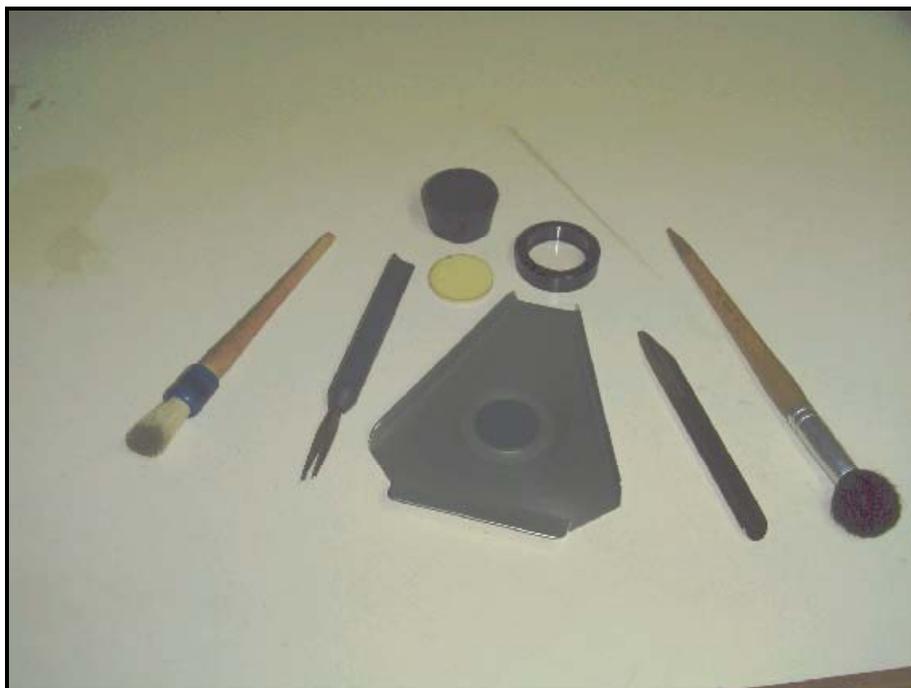
ANEXO 6

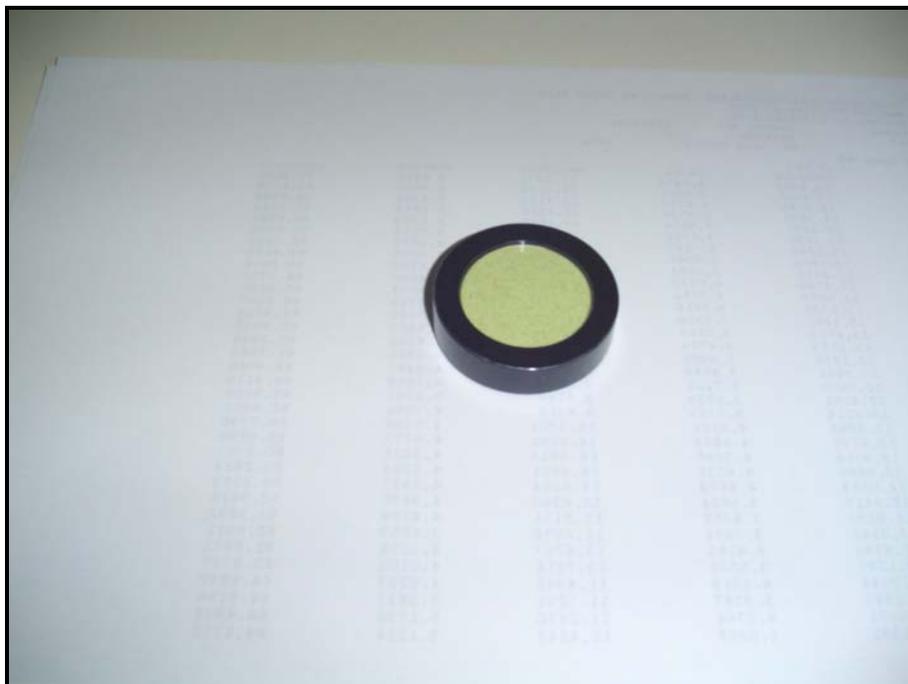
Calibraciones NIRS para carbohidratos disponibles por diferencia.

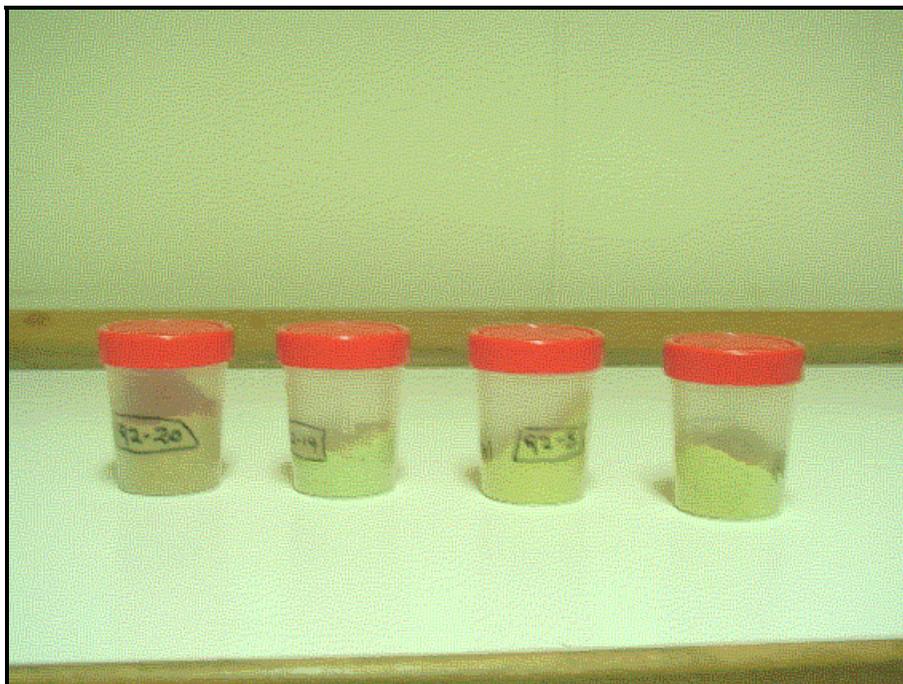
| N | T.M | C.D | SEC | R ² | SECV | 1-VR | SD | SD/SECV |
|-----|-----------|--------|-------|----------------|-------|-------|-------|---------|
| 230 | 2,20,20,1 | None | 0,817 | 0,864 | 0,835 | 0,858 | 2,219 | 2,6575 |
| 230 | 2,20,20,1 | SNV+DT | 0,817 | 0,864 | 0,836 | 0,856 | 2,219 | 2,6543 |
| 233 | 1,10,10,1 | None | 0,807 | 0,866 | 0,831 | 0,857 | 2,204 | 2,6522 |
| 229 | 1,10,5,1 | None | 0,807 | 0,866 | 0,832 | 0,857 | 2,204 | 2,6490 |
| 230 | 2,20,5,1 | None | 0,818 | 0,864 | 0,838 | 0,857 | 2,219 | 2,6480 |
| 229 | 1,20,5,1 | SNV+DT | 0,812 | 0,864 | 0,835 | 0,856 | 2,204 | 2,6395 |
| 229 | 1,20,10,1 | None | 0,812 | 0,864 | 0,835 | 0,856 | 2,204 | 2,6395 |
| 230 | 1,5,5,1 | None | 0,814 | 0,863 | 0,838 | 0,855 | 2,203 | 2,6289 |
| 229 | 0,0,5,1 | None | 0,821 | 0,864 | 0,853 | 0,853 | 2,225 | 2,6084 |
| 229 | 0,5,5,1 | None | 0,821 | 0,864 | 0,853 | 0,853 | 2,225 | 2,6084 |
| 230 | 1,20,20,1 | None | 0,829 | 0,860 | 0,851 | 0,851 | 2,212 | 2,5993 |
| 231 | 2,5,5,1 | None | 0,833 | 0,860 | 0,863 | 0,849 | 2,228 | 2,5817 |
| 231 | 2,20,20,1 | SNV+DT | 0,844 | 0,857 | 0,864 | 0,864 | 2,228 | 2,5787 |
| 231 | 2,20,5,1 | SNV+DT | 0,843 | 0,857 | 0,864 | 0,849 | 2,228 | 2,5787 |
| 231 | 2,20,10,1 | SNV+DT | 0,843 | 0,857 | 0,864 | 0,849 | 2,228 | 2,5787 |
| 231 | 2,5,5,1 | SNV+DT | 0,844 | 0,856 | 0,865 | 0,849 | 2,228 | 2,5757 |
| 231 | 2,10,5,1 | SNV+DT | 0,845 | 0,856 | 0,865 | 0,849 | 2,228 | 2,5757 |
| 231 | 2,10,10,1 | SNV+DT | 0,846 | 0,856 | 0,866 | 0,848 | 2,228 | 2,5757 |
| 232 | 2,10,5,1 | None | 0,843 | 0,857 | 0,872 | 0,847 | 2,233 | 2,5608 |
| 231 | 2,5,5,1 | None | 0,846 | 0,856 | 0,871 | 0,846 | 2,228 | 2,5580 |
| 231 | 0,0,10,1 | None | 0,830 | 0,860 | 0,880 | 0,842 | 2,219 | 2,5216 |
| 231 | 0,10,10,1 | None | 0,830 | 0,860 | 0,880 | 0,842 | 2,219 | 2,5216 |
| 233 | 1,20,5,1 | SNV+DT | 0,870 | 0,848 | 0,889 | 0,841 | 2,232 | 2,5107 |
| 233 | 1,20,10,1 | SNV+DT | 0,870 | 0,848 | 0,889 | 0,841 | 2,232 | 2,5107 |
| 233 | 1,10,10,1 | SNV+DT | 0,870 | 0,848 | 0,890 | 0,841 | 2,232 | 2,5079 |
| 233 | 1,5,5,1 | SNV+DT | 0,872 | 0,848 | 0,892 | 0,840 | 2,232 | 2,5022 |
| 233 | 1,10,5,1 | SNV+DT | 0,872 | 0,848 | 0,892 | 0,840 | 2,232 | 2,5022 |
| 233 | 1,20,20,1 | SNV+DT | 0,875 | 0,846 | 0,894 | 0,839 | 2,232 | 2,4966 |
| 233 | 0,0,5,1 | SNV+DT | 0,833 | 0,844 | 0,906 | 0,835 | 2,235 | 2,4669 |
| 233 | 0,5,5,1 | SNV+DT | 0,883 | 0,844 | 0,906 | 0,835 | 2,235 | 2,4669 |
| 234 | 0,0,10,1 | SNV+DT | 0,886 | 0,842 | 0,910 | 0,833 | 2,230 | 2,4505 |
| 234 | 0,10,10,1 | SNV+DT | 0,886 | 0,842 | 0,910 | 0,833 | 2,230 | 2,4505 |

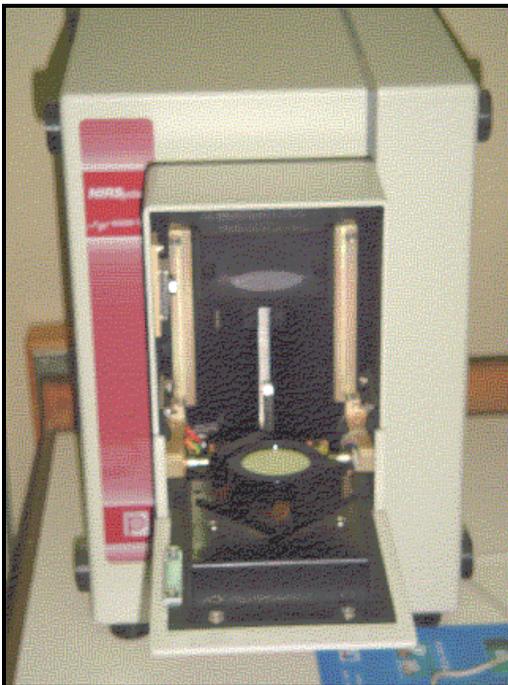
ANEXO 7

Celda de reflectancia de cuarzo y materiales para la preparación de las muestras.



ANEXO 8**Muestra de sopa crema deshidratada en cápsula de cuarzo.**

ANEXO 9**Muestras de sopas en envases de plásticos.**

ANEXO 10**Equipo NIRSystems 6500 con cápsula para análisis.**

ANEXO 11
Equipo NIRSystems 6500.

