

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE GRADUADOS



**ESPECTROSCOPIA DE REFLECTANCIA EN EL INFRARROJO
CERCANO (NIRS) EN EL ANÁLISIS CUANTITATIVO Y
CUALITATIVO DE CARNE DE CORDERO**

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al grado de Magister en Ciencias, mención Producción Animal.

GUILLERMO VERY HERNÁN WELLS MONCADA

VALDIVIA - CHILE
2006

Profesor Patrocinante:

Daniel Alomar C.
Ingeniero Agrónomo Mg.Sc.
Instituto de Producción Animal
Facultad de Ciencias Agrarias

Profesores Evaluadores:

Luis Latrille L.
Ingeniero Agrónomo, M.Sc., Ph.D.
Instituto de Producción Animal
Facultad de Ciencias Agrarias

Suzanne Hodgkinson
B.Sc., M.Sc., Ph.D.
Instituto de Producción Animal
Facultad de Ciencias Agrarias

Valdivia, 27 de abril de 2006

DECLARACIÓN

Yo, **Guillermo Very Hernán Wells Moncada**, declaro que soy autor del presente trabajo, que lo he realizado en su integridad y no lo he publicado para obtener otros Grados o Títulos o en Revistas especializadas.

INDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCION	1
2	REVISION BIBLIOGRAFICA	5
2.1	Antecedentes generales	5
2.1.1	Carne ovina	5
2.1.2	Consumo de carne	5
2.2	Características de la carne	7
2.2.1	Principales componentes químicos de la carne	8
2.2.1.1	Proteína	8
2.2.1.2	Grasa	9
2.2.1.3	Agua	9
2.3	Análisis de los principales componentes químicos de la carne y su calidad	10
2.4	Espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS)	10
2.4.1	Fundamentos de la técnica	11
2.4.2	Tipos de análisis	14
2.4.2.1	Análisis cuantitativo	14
2.4.2.1.1	Criterios de selección de la ecuación	17
2.4.2.2	Análisis cualitativo	21
2.4.3	Aplicaciones de la técnica NIRS en carnes	24
3	MATERIAL Y METODOS	31
3.1	Ubicación y duración del estudio	31
3.2	Primer ensayo	31
3.2.1	Materiales	31
3.2.2	Métodos	31
3.2.2.1	Colección de los espectros	31
3.2.2.2	Análisis químico	32
3.2.2.3	Tratamiento de los datos espectrales	32
3.2.2.4	Evaluación y selección de las ecuaciones de calibración	34
3.3	Segundo ensayo	35
3.3.1	Materiales	35
3.3.2	Métodos	35
3.3.2.1	Lectura de los espectros	35
3.3.2.2	Análisis Quimiométrico	36
3.4	Tercer ensayo	37
3.4.1	Materiales	37
3.4.2	Métodos	37
3.4.2.1	Lectura de los espectros	38
3.4.2.2	Análisis Quimiométrico	38

Capítulo		Página
4	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	39
4.1	Primer ensayo	39
4.1.1	Características químicas de las muestras	39
4.1.2	Caracterización espectral	42
4.1.3	Desarrollo de las calibraciones	43
4.1.3.1	Humedad	44
4.1.3.1.1	Primera etapa de calibración para humedad	44
4.1.3.1.2	Segunda etapa de calibración y validación externa	50
4.1.3.2	Proteína bruta	53
4.1.3.2.1	Primera etapa de calibración de proteína bruta	53
4.1.3.2.2	Segunda etapa de calibración y validación externa	58
4.1.3.3	Grasa	61
4.1.3.3.1	Primera etapa de calibración para grasa	61
4.1.3.3.2	Segunda etapa de calibración y validación externa	65
4.1.3.4	Cenizas totales	68
4.1.3.4.1	Primera etapa de calibración para cenizas totales	68
4.1.3.4.2	Segunda etapa de calibración y validación externa	71
4.2	Segundo ensayo	75
4.2.1	Caracterización espectral	75
4.2.2	Análisis Quimiométrico	76
4.3	Tercer ensayo	78
4.3.1	Caracterización espectral	78
4.3.2	Análisis Quimiométrico	80
5	CONCLUSIONES	83
6	RESUMEN	84
7	SUMMARY	86
8	BIBLIOGRAFIA	88

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Beneficio y producción de carne en vara de ganado ovino.	5
2	Consumo unitario aparente de carne ovina.	6
3	Valores de los estadísticos (R^2 , SEP) y rango de las ecuaciones de predicción obtenidas por diferentes autores.	26
3	Valores de los estadísticos (R^2 , SEP) y rango de las ecuaciones de predicción obtenidas por diferentes autores(Continuación).	27
4	Valores de error de clasificación obtenidos por diferentes autores en productos cárnicos.	30
5	Estadísticas básicas de la composición química de las muestras de carne de cordero lechal utilizadas para la calibración (% del peso fresco).	39
6	Resultado de las 10 mejores ecuaciones obtenidas para el componente humedad en carne de cordero lechal.	44
7	Estadísticas básicas de la humedad de las muestras de carne de cordero lechal utilizadas para la calibración (% del peso fresco).	50
8	Estadística de la validación cruzada y validación externa de la ecuación seleccionada para predecir contenido de humedad.	50
9	Resultado de las 10 mejores ecuaciones obtenidas para proteína bruta.	54
10	Estadísticas básicas de la composición química de las muestras de carne de cordero lechal utilizadas para la calibración (% del peso fresco).	58
11	Estadística de la validación cruzada y validación externa de la ecuación seleccionada para predecir contenido de proteína.	58
12	Resultado de las 10 mejores ecuaciones de calibración obtenidas para el componente grasa en carne de cordero lechal.	62
13	Estadísticas básicas de la composición química de las muestras de carne de cordero lechal utilizadas para la calibración (% del peso fresco).	65

Cuadro	Página
14 Estadística de la validación cruzada y validación externa de la ecuación seleccionada para predecir contenido de grasa.	66
15 Resultados estadísticos de las 10 mejores ecuaciones de calibración obtenidas para el componente cenizas totales en carne de cordero lechal.	69
16 Estadísticas básicas de la composición química de las muestras de carne de cordero lechal utilizadas para la calibración (% del peso fresco).	71
17 Estadística de la validación cruzada y validación externa de la ecuación seleccionada para predecir contenido de cenizas.	72
18 Tratamiento matemático (T.M.) y clasificación correcta de las muestras espectrales para las diez mejores ecuaciones obtenidas sobre un universo de 240 muestras espectrales, para el músculo <i>semimembranosus</i> .	76
19 Tratamiento matemático (T.M.) y clasificación correcta de las muestras espectrales para las diez mejores ecuaciones obtenidas sobre un universo de 240 muestras espectrales, para el músculo <i>quadriceps femoris</i>	77
20 Resultados de la clasificación por las ecuaciones discriminantes NIRS para los músculos de cordero <i>semimembranosus</i> y <i>quadriceps femoris</i> .	77
21 Tratamiento matemático, clasificación correcta de las muestras espectrales y parámetros estadísticos para las diez mejores ecuaciones obtenidas sobre un universo de 120 muestras espectrales, para el músculo <i>Bíceps femoris</i> .	81
22 Tratamiento matemático, clasificación correcta de las muestras espectrales y parámetros estadísticos para las diez mejores ecuaciones obtenidas sobre un universo de 120 muestras espectrales, para el músculo <i>Glutaeus medius</i>	81
23 Resultados de la clasificación por las ecuaciones discriminantes NIRS para los músculos de cordero <i>Bíceps femoris</i> y <i>Glutaeus medius</i> .	82

INDICE DE GRAFICOS

Gráfico	Página
1 Histograma de distribución de las muestras de acuerdo a su humedad.	40
2 Histograma de distribución de las muestras de acuerdo a su Proteína bruta.	40
3 Histograma de distribución de las muestras de acuerdo a su extracto etéreo.	41
4 Histograma de distribución de las muestras de acuerdo a sus cenizas totales.	41
5 Espectro promedio en la región del visible y el infrarrojo cercano (400-2500 nm) y su segundo orden de diferenciación, en carne de cordero lechal.	42
6 Relación entre los valores de referencia y su predicción mediante NIRS para la fracción humedad en carne de cordero lechal.	49
7 Predicción del grupo de muestras de validación externa para el componente humedad, utilizando la ecuación con tratamiento matemático 2.8.8.1 ^{None} .	52
8 Predicción del grupo de muestras de validación externa para el componente humedad, utilizando la ecuación con tratamiento matemático 2.15.8.1 ^{SNV-d} .	53
9 Relación entre los valores de referencia y su predicción mediante NIRS para el componente proteína bruta.	57
10 Regresión de la predicción del grupo de muestras de validación externa para el componente proteína bruta (%), utilizando la ecuación con tratamiento matemático 2.10.8.1 ^{SNV-d}	60
11 Regresión de la predicción del grupo de muestras de validación externa para el componente humedad, utilizando la ecuación con tratamiento matemático 2.8.4.1 ^{SNV-D}	61
12 Relación entre los valores de referencia y su predicción mediante NIRS para la variable grasa.	64
13 Grafico de dispersión del grupo de muestras de validación externa para el componente extracto etéreo, utilizando la ecuación con tratamiento matemático 2.8.8.1 ^{SNV-D}	67

Gráfico	Página
14 Grafico de dispersión del grupo de muestras de validación externa para el componente extracto etéreo, utilizando la ecuación con tratamiento matemático 1.8.4.1 ^{SNV-D}	68
15 Relación entre los valores de referencia y su predicción mediante NIRS para el componente cenizas.	71
16 Grafico de dispersión del grupo de muestras de validación externa para el componente cenizas totales, utilizando la ecuación con tratamiento matemático 3.4.4.1 ^{NONE}	73
17 Grafico de dispersión del grupo de muestras de validación externa para el componente cenizas totales, utilizando la ecuación con tratamiento matemático 2.10.10.1 ^{NONE}	74
18 Espectro NIR promedio, como $\log(1/R)$, de muestras de carne de cordero, refrigerada y congelada-descongelada de los músculos (a) <i>quadriceps femoris</i> y (b) <i>semimembranosus</i> .	75
19 Espectro promedio en la región NIR, como $\log(1/R)$, para muestras de jugos de carne de cordero refrigerada (línea superior) y congelada-descongelada (línea inferior) para a) el músculo <i>Biceps femoris</i> y b) el músculo <i>Glutaeus medius</i> .	79

1 INTRODUCCIÓN

La salud y el bienestar del hombre son dependientes en gran medida de su alimentación. Los alimentos aportan energía, proteínas, vitaminas, sustancias minerales y agua, los que cumplen funciones vitales en el organismo.

Aunque la mayoría de la población mundial tiene hábitos alimentarios de tipo vegetariano, con dietas balanceadas que evolucionan a medida que pasa el tiempo, no existe duda que la carne es una fuente importante de nutrientes.

La importancia fisiológica y nutritiva de la carne ha sido reconocida cada vez más a medida que han ido progresando las investigaciones sobre nutrición. Pero a pesar de que la carne juega un papel importante en la nutrición humana y que el nivel de información respecto a la misma, hoy en día, es mucho mayor, los conocimientos del consumidor nacional son insuficientes, anticuados e incluso en algunos casos falsos por completo. Es por lo tanto necesario entregar una mayor y mejor información al consumidor, principalmente en lo que respecta a calidad cárnica.

La variabilidad de la calidad de la carne es un reflejo de las diferencias dadas por factores genéticos y de manejo durante la etapa de producción como así también por factores de tipo ambiental que pueden actuar antes y después del faenamiento, como son los métodos de conservación de este producto.

Para poder controlar la calidad de la carne, se debe contar con un sistema que clasifique cuantitativamente y cualitativamente las canales y la carne comercializada.

En Chile, se ha promulgado la ley 19.162 o Ley de Carnes, de la cual se hizo obligatoria, a partir de enero de 1994, la aplicación de las normas de clasificación de bovinos y de tipificación de sus canales.

Estas normas están orientadas principalmente hacia una diferenciación de calidad, desde un punto de vista comercial, composicional u organoléptica, viéndose estas características reflejadas de alguna manera en las distintas categorías de tipificación.

Hoy día, el acceso a los mercados internacionales exige calidad y seguridad alimentaria, en lo que respecta a atributos del producto, certificación y etiquetado. Estos atributos se clasifican en atributos de compra, de consumo y de confianza, estando en este grupo la trazabilidad, que posibilita el proceso de certificación a lo largo de la cadena alimentaria.

En lo que respecta a la carne ovina, aún no existe una norma que clasifique y tipifique las canales de este tipo de animales, por lo cual no existe una diferenciación de calidad, lo que se podría reflejar en la falta de confianza del consumidor frente a este producto y así al bajo consumo de este tipo de carnes, la cual en general se asocia a un producto con alto contenido de grasa y de poco valor nutricional.

Los principales componentes químicos del organismo animal son agua, grasa, proteína y minerales o cenizas. Por esto el valor nutritivo de la carne adquiere importancia, si se considera que su consumo tiene como finalidad adquirir nutrientes que el organismo requiere para la formación y reparación de tejidos y energía necesaria para los procesos fisiológicos.

El análisis de la composición química en la carne se realiza generalmente a través de métodos oficiales AOAC, con lo cual se obtienen los porcentajes de proteína, extracto etéreo, humedad y cenizas que contiene este producto.

Estos métodos, utilizados con mayor frecuencia, tienen la desventaja de ser caros, lentos y destructivos, por lo cual es interesante considerar otros métodos que eviten estos inconvenientes.

Una de las técnicas alternativas de análisis es la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS), que presenta la característica de ser una técnica no destructiva, rápida, múltiple (varias determinaciones simultáneas), de gran precisión y exactitud si los procedimientos de generación de las ecuaciones de predicción son los adecuados. Además es una técnica analítica de bajo impacto ambiental, ya que no requiere de sustancias químicas para sus determinaciones.

Otro punto importante que afecta la calidad cárnica y que no es considerado por el consumidor nacional, es el de las diferencias cuantitativas y cualitativas entre carne fresca y carne congelada-descongelada. Este tema ha adquirido gran importancia en países europeos, donde se exige que los productos cárnicos que se comercializan en el mercado lleven especificado en sus etiquetas la naturaleza del producto. Para esto existe un riguroso control, utilizando métodos de discriminación rápidos y seguros, como es el uso de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS).

En nuestro país, además de ser poca la información respecto a características cuantitativas y cualitativas de la carne, también lo son los estudios que se han realizado en la utilización de la técnica NIRS como herramienta en el análisis químico y como herramienta discriminante de carne y productos cárnicos, no existiendo ninguna investigación aplicada a carne de cordero.

Por lo expuesto anteriormente, este estudio tuvo como objetivo general, evaluar el potencial de la técnica de espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) como herramienta para predecir la composición química de carne de cordero lechal (humedad, proteína, grasa y cenizas totales), así como para discriminar entre carnes de cordero que han sido o no sometidas a congelamiento.

De este objetivo general se desprenden los siguientes objetivos específicos.

1.- Desarrollar y evaluar ecuaciones de calibración para predecir la composición nutricional de muestras de carne de cordero lechal, ensayando diferentes tratamientos matemáticos y métodos de corrección de dispersión espectral sobre la calidad de la calibración obtenida.

2.- Evaluar la técnica NIRS como herramienta discriminante para reconocer diferentes condiciones de conservación (refrigerado vs congelado), específicamente en los músculos *Semimembranosus* y *Quadriceps femoris* de la pierna de cordero, basándose sólo en sus datos espectrales.

3.- Evaluar la aplicación de la técnica de espectroscopía NIRS con el mismo objetivo anterior, pero basándose en los datos espectrales del extracto seco (técnica DESIR) de jugos de los músculos *Biceps femoris* y *Glutaeus medius*.

2 REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 Antecedentes generales

Por primera vez la disponibilidad total de carnes en nuestro país supera el millón de toneladas, lo que entrega una disponibilidad *per cápita* cercana a 73,5 kilos por habitante, cifra que marca un récord en el consumo aparente de este tipo de proteínas en Chile (Odepa, 2004).

El desarrollo de la oferta de carnes ha sido diferente según cuales sean las especies. Las carnes de aves y de cerdos han tenido un crecimiento espectacular estos últimos años, en tanto la carne de bovino ha crecido más débilmente y es sólo la carne ovina la que ha tenido una reducción (Odepa, 2004).

2.1.1 Carne ovina. La producción nacional de carne ovina en vara durante el año 1999 creció, alcanzando un total de 12.753 toneladas. Sin embargo, durante el año 2000, 2001 y 2002 la producción ovina nacional tuvo un fuerte retroceso, llegando el año 2002 a 9.857 toneladas (Cuadro 1)(Instituto Nacional de Estadística, 2003).

Cuadro 1. Beneficio y producción de carne en vara de ganado ovino.

Año	Beneficio (cabezas)	Variación (%)	Carne en vara (ton)	Variación (%)
1997	639.233	13,5	9.811	11,6
1998	745.268	16,5	11.335	15,5
1999	810.606	8,8	12.753	12,5
2000	786.915	-2,9	11.141	-12,6
2001	740.648	-5,9	10.884	-2,3
2002	729.850	-1,5	9.857	-9,4

Fuente: Instituto Nacional de Estadística, 2003.

2.1.2 Consumo de carne. En los últimos diez años el consumo de carnes en el ámbito nacional ha tenido incrementos muy superiores al aumento de lo producido (Fundación Chile, 2000). Durante el año 2004, el consumo per capita alcanzó los 74,6 kilos, con proyecciones para el año 2005 de 76 kilos (INE, 2005).

El consumo de carne se ha comportado diferente para las principales especies productoras de carne. Las aves, porcinos y bovinos han aumentado en un 196%, 47% y 36% respectivamente en el período 1990-1997, en tanto el consumo de carne ovina ha disminuido de 1 kg habitante⁻¹ año⁻¹ en los años 80 a 0,4 kg estos últimos años (Cuadro 2) (Instituto Nacional de Estadística, 2003).

Cuadro 2. Consumo unitario aparente de carne ovina

AÑO	Consumo (kg/habitante)	Variación anual (%)
1997	0,4	-20,0
1998	0,5	25,0
1999	0,5	0,0
2000	0,4	-20,0
2001	0,4	0,0
2002	0,4	0,0

Fuente: Instituto Nacional de Estadística, 2003

Si se excluye del consumo nacional los volúmenes consumidos en las regiones XI y XII se llega a la conclusión de que el consumo de carne ovina entre la I y X región es mínimo. Esto ha sido consecuencia de un proceso histórico de desaparición de las ovejerías de la zona central, que eran las que abastecían de cordero a los grandes centros urbanos y a una percepción negativa que tiene el consumidor de esta carne (Fundación Chile, 2000).

Un estudio realizado en Oklahoma, Estados Unidos, el año 1993, indica que los atributos sobre los cuales los consumidores norteamericanos basan su consumo de carnes son: sabor, colesterol, contenido nutricional, precio, grasa, facilidad de cocción y características generales. De acuerdo a los resultados de la evaluación de siete tipos de carne, la carne de cordero calificó en último lugar en los atributos de sabor, facilidad para cocinar y características generales. En sexto lugar en contenido nutricional y un quinto lugar en contenido de colesterol y grasa. Es interesante mencionar que en este estudio las tres cuartas partes de los encuestados, el año que se hizo el estudio, había consumido carne de cordero en restaurantes, caracterizándose por ser del grupo de mayor edad, con mejor educación y con los ingresos más altos de los encuestados (Ward *et al.*, 1995).

Aún cuando la actividad productiva ovina en Chile se encuentra en una situación deprimida, se señala que durante los últimos años su consumo se considera un lujo, por lo menos en las grandes ciudades, siendo consumida preferentemente fuera del hogar (Campos, 2000).

2.2 Características de la carne.

La carne, se define como el tejido muscular de los animales utilizado como alimento, aún cuando músculo y carne son cosas diferentes, por los procesos bioquímicos y biofísicos que experimenta el músculo a partir del momento de la muerte del animal (Lawrie, 1998).

Si se considera que el propósito esencial del consumo de carne es el de obtener nutrientes necesarios para las necesidades del organismo, adquiere gran importancia el conocimiento de la calidad cuantitativa y cualitativa de ella. Es así como durante los últimos años se ha presentado una continua preocupación e interés por el contenido nutricional de la carne y los productos cárnicos y el papel que juega este alimento en la dieta humana (Schweigert, 1994).

En los EE.UU., el Departamento de Agricultura (USDA) tiene la responsabilidad de garantizar al consumidor que la carne y los productos cárnicos que consumen sean seguros y de buena calidad. El constante interés público por conocer la composición de los alimentos y los continuos cambios en los procesos de elaboración junto al desarrollo de nuevas tecnologías en los alimentos de origen animal, ha obligado al USDA a examinar, modificar o desarrollar nuevos métodos analíticos para caracterizar carnes frescas y productos cárnicos que permitan una mejor fiscalización (Benedict and Ellis, 1987).

La carne, como materia prima, es extremadamente variable en su composición con rangos que pueden ir desde 1-65% de grasa, 25 a 80% de agua y de 5-25% de proteína (King-Brink *et al.*, 1996), siendo necesario el análisis composicional de cada lote.

2.2.1 Principales componentes químicos de la carne. En la industria cárnica se entiende por componentes mayores de la carne a la proteína

total (proteína cruda), la grasa, el agua, las cenizas y, en ocasiones, los hidratos de carbono. La determinación de los componentes principales se denomina "análisis total", la suma de los resultados individuales debe dar un resultado del 100% ($\pm 0,5\%$). La determinación cuantitativa de estas fracciones principales permite ordenar las materias primas por tipos de transformaciones, elaborar los productos conforme a las normas internas o generales de calidad y clasificar por categoría los productos terminados (Prändl *et al.*, 1994).

2.2.1.1 Proteína. Las proteínas constituyen el mayor componente del cuerpo animal, después del agua. Las proteínas del músculo son trascendentales en los cambios postmortem involucrados en la transformación del músculo en carne, además de ser la mayor fuente de proteína de alta calidad en la dieta humana (Bandman, 1994).

Las proteínas del músculo se pueden clasificar en grupos discretos dependiendo de su localización. Aquellas que forman parte del aparato contráctil son tipificadas como proteínas miofibrilares. Las proteínas sarcoplásmicas, incluyen todas las enzimas metabólicas de la célula muscular, el pigmento mioglobina y los componentes proteicos del núcleo y de los lisosomas. Todas las proteínas del tejido conectivo se encuentran fuera de la fibra muscular y constituyen la matriz extracelular, que ofrece el soporte y rigidez al músculo vivo, y que se relaciona posteriormente con la dureza de la carne. Existen también otras proteínas como las de la membrana, ya sea en el sarcolema, en las membranas del núcleo y de los lisosomas, del aparato de Golgi, del retículo endoplasmático y otras vesículas (Bandman, 1994).

Las proteínas de la carne desempeñan un papel crucial en el mecanismo que liga agua en el tejido muscular. En el músculo vivo las proteínas dan una estructura de gel al tejido de modo que una superficie recién cortada de un músculo inmediatamente tras el sacrificio aparecerá seca y elástica (Wismer and Pedersen, 1994).

2.2.1.2 Grasa. El término grasa animal comprende usualmente todos los tipos de lípidos, incluyendo triglicéridos, fosfolípidos, esteroides y ésteres de esteroles y otros lípidos si están presentes (Dugan, 1994).

La grasa es un componente mayoritario y el segundo más variable de la canal de los animales de abasto, superado sólo por el contenido de agua. Comprende entre 18 a 30% del peso de la canal del ternero y el 12 a 20% del peso vivo de un cerdo listo para el mercado. La grasa es la forma energética más concentrada accesible a la vida animal. Para un mejor uso de la carne en nutrición humana, se requiere el conocimiento del valor calórico de las diferentes grasas, sus características nutricionales esenciales, sus relaciones con otros nutrientes y los posibles efectos deletéreos de su manipulación inadecuada. Los cambios tecnológicos y el conocimiento nutricional, que causan modificaciones en los patrones de consumo de la grasa y de los derivados grasos, acrecientan la necesidad del desarrollo de nuevos usos para las grasas. (Dugan, 1994).

Los lípidos se encuentran en el espacio intermuscular e intramuscular, en el tejido adiposo, en el tejido nervioso y en la sangre (Dugan, 1994).

2.2.1.3 Agua. Cuantitativamente, el agua es el constituyente más importante de la carne. La carne roja magra puede contener más del 76% de agua y aún más durante el desarrollo del curado y la emulsión. El contenido de agua varía con el de grasa. Si aumenta el contenido de grasa, el de agua decrece y se aproxima al contenido de agua del tejido adiposo, cercano al 10%. El contenido de agua varía con el grado de engrasamiento de la canal y con el modo de despiezarla. La proporción entre proteína y agua es casi constante en un amplio rango de contenido graso. Esta regla se aplica a la carne de cerdo procedente de animales con un peso vivo al sacrificio de más de 90 kg y a la de vacuno con pesos vivos superiores a los 450 kg. En animales más jóvenes esta relación es menor (Wisner and Pedersen, 1994).

2.3 Análisis de los principales componentes químicos de la carne y su calidad.

Los principales componentes de la carne son generalmente determinados por métodos tradicionales, como los aceptados oficialmente por la Association of Official Agricultural Chemists (AOAC, 1995).

Los métodos cuantitativos y cualitativos tradicionales de análisis son dificultosos, demandan tiempo, mano de obra, equipos y son de un elevado costo (Murray, 1986; Osborne *et al.*, 1993).

La tecnología de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) se presenta como una alternativa en la industria de la carne, por tener las ventajas de ser una técnica rápida, exacta y capaz de medir varios componentes químicos simultáneamente (Valdés and Summers, 1986; Mitsumoto *et al.*, 1991; King-Brink *et al.*, 1996; Batten, 1998.) Además es una técnica no destructiva, con una mínima preparación de las muestras, que tiene una alta precisión (Givens *et al.*, 1997; Wrigley, 1999).

2.4 Espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS)

La espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano, se presenta como una alternativa de análisis que ha experimentado un notable desarrollo en las últimas décadas (Alomar y Fuchslocher, 1998).

Las propiedades ópticas de los alimentos y en particular la aplicación de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) se han empleado desde la década del 70 en la industria alimenticia, farmacéutica y petroquímica, como alternativa a los métodos químicos y químico-biológicos tradicionales (Norris *et al.*, 1976; Murray, 1986; Cozzolino *et al.*, 2000; Bokobza, 1998).

Esta técnica alternativa es relativamente nueva en Latinoamérica y fue a fines de los setenta, principio de los ochenta que se adquieren varios equipos en esta parte del mundo, para análisis de alimentos y granos, pero por desconocimiento de la técnica, fue sólo en los años

noventa que en Brasil se utilizó con éxito, analizando harina de soya (Peldoza, 1999).

2.4.1 Fundamentos de la técnica. La técnica se basa en que el espectro lumínico cercano al infrarrojo puede proporcionar información acerca de los principales elementos estructurales asociados a las sustancias orgánicas, donde los grupos funcionales que corresponden a este espectro son carbono e hidrógeno (C-H), oxígeno e hidrógeno (O-H), nitrógeno e hidrógeno (N-H) y probablemente azufre e hidrógeno (S-H) y carbono y oxígeno (C=O) (Davies and Grant, 1987; Shenk and Westerhaus, 1993; Givens *et al.*, 1996; Givens and Deaville, 1999; Wrigley, 1999; Van Kempen, 2001).

En general, el método espectroscópico se basa en la cuantificación de la vibración de las moléculas, a partir de la energía absorbida por ellas y medida por un espectrofotómetro. El valor de la absorción de energía (E_a) se establece mediante la diferencia entre la intensidad de la energía transmitida (E_t) o reflejada (E_r), con la intensidad de energía incidente (E_o) (Murray and Williams, 1987).

$$E_o = E_t + E_r + E_a \quad (2.1)$$

La interacción de la energía con la materia obedece a la ley de Beer-Lambert, que establece que la absorbancia a cualquier longitud de onda es proporcional al número o concentración de moléculas absorbentes presentes en el camino recorrido por la radiación (Alomar y Fuchslocher, 1998; Cozzolino, 1998). Esto determina que para un material de naturaleza química heterogénea el espectro obtenido en la región NIR sea una combinación de bandas de absorciones parciales sobrepuestas o muy cercanas, que suelen confundirse en una línea suavizada, en que se encuentran picos, valles y curvaturas en forma de hombro (Osborne *et al.*, 1993). Esta técnica permite estimar la composición nutricional de una muestra en base a la relación matemática que se produce entre sus características de reflexión o transmisión de luz infrarroja y los parámetros que se desean predecir (Davis and Grant, 1987). Lo anterior permite llegar a resultados de manera rápida y exacta, siempre que se sigan los procedimientos adecuados y se logre

generar calibraciones confiables para desarrollar las ecuaciones de predicción requerida (Alomar y Fuchslocher, 1998; Givens and Deaville, 1999).

Según Garrido *et al.*, (2000), la tecnología NIRS tiene muchas ventajas que aconsejan su uso en evaluaciones de todo tipo de productos, aunque también existen algunas desventajas.

Entre las ventajas de la técnica NIRS, respecto a los métodos tradicionales de análisis están:

- Rapidez del método, una vez que el instrumento ha sido correctamente calibrado, lo que permite velocidad de respuesta para la toma de decisiones.
- Posibilidad de llevar a cabo varias determinaciones sobre la misma muestra.
- Procedimiento no destructivo, lo que reviste gran importancia, particularmente en el caso de que se disponga de poca cantidad de muestra o ésta sea de alto valor.
- Técnica respetuosa del medio ambiente, ya que no requiere de reactivos al hacer las determinaciones, por lo que no genera ningún tipo de residuos.
- Presenta un bajo costo por muestra.
- Es necesaria una nula o escasa preparación de la muestra.
- Facilidad de uso en análisis de rutina.
- Presenta una precisión próxima a los métodos de referencia y reproducibilidad mejor que la de éstos.

Las principales limitaciones o desventajas, según una encuesta realizada a usuarios e investigadores de la técnica NIRS son la dificultad en la calibración de los equipos y su alto costo de inversión en etapas iniciales (Rosenthal, 1996). Esta técnica como es secundaria, necesita calibración frente al método de referencia y el espectro está influenciado por factores no químicos (temperatura, tamaño de partícula, humedad, etc.)(Delgado, 2003).

Los datos obtenidos con un instrumento NIRS, pueden ser utilizados, tanto para el análisis cuantitativo como cualitativo. Garrido *et al.*,

(1996) sintetizan ambos tipos de análisis como se indica a continuación:

El análisis cuantitativo, más generalizado, estima la concentración de un componente en una muestra. Para ello se ha de establecer la relación, a través de una ecuación de regresión, existente entre los valores de absorbancia en la región NIR y la concentración de dicho componente, determinada mediante un método de referencia, en muestras de composición conocida.

Este proceso se conoce con el nombre de etapa de calibración, a la relación matemática desarrollada se le denomina ecuación de calibración y el grupo de muestras de composición se designa como set o colectivo de calibración. Una vez establecida la ecuación de calibración, ésta permite predecir el contenido de otras muestras similares en características a las incluidas en el colectivo de calibración (Williams and Sobering, 1996; Shenk and Westerhaus, 1996).

El análisis cualitativo NIRS, consiste en la comparación de un espectro de un producto desconocido, con una biblioteca espectral o con un espectro estándar, representativo de un determinado producto y del cual se posee información sobre sus atributos. La distancia n-dimensional, entre el espectro del producto desconocido y la media de los espectros contenidos en la biblioteca, o la existente con respecto al espectro estándar, permite clasificar cualitativamente el espectro del producto desconocido (Infrasoft International, 1992).

En los últimos años, el interés por la tecnología NIRS se ha incrementado a partir del perfeccionamiento en instrumentación y en el análisis de datos, como también a partir de la introducción de fibras ópticas, que facilitan la obtención de la información espectral (Bokobza, 1998).

Según Downey (1999), el uso de la técnica NIRS en la industria alimentaria en el futuro, conllevará cambios estructurales (reducción de costos, armonización de técnicas analíticas, adaptación de sistemas

de calidad, etc.) y conceptuales (mayor dominio y autoridad por parte del consumidor y minoristas, demanda de una mayor consistencia en la industria, etc.).

2.4.2 Tipos de análisis

Como se ha indicado, el desarrollo de una aplicación de esta tecnología, puede ser abordado a partir de dos enfoques: cuantitativo y cualitativo. Tanto el análisis cuantitativo como el cualitativo NIRS, se basan en la obtención de espectros de absorción de un grupo de muestras con características conocidas, para después obtener un modelo quimiométrico, es decir, una ecuación de calibración si se realiza un análisis cuantitativo, o un modelo de clasificación, si es cualitativo.

A partir de este modelo quimiométrico desarrollado, se podrán estimar los parámetros incluidos en el modelo en muestras de características desconocidas.

De acuerdo con Geladi (1996) la quimiometría es "la ciencia del uso de métodos matemáticos, estadísticos e informáticos con el fin de mejorar la extracción de informaciones obtenidas a partir de datos analíticos".

2.4.2.1 Análisis cuantitativo. El fin de este análisis es establecer una relación matemática entre los espectros generados por el instrumento y los valores químicos o biológicos de referencia del laboratorio (Windham *et al.*, 1989). Esta relación se establece mediante una ecuación de calibración, basada en el establecimiento de una regresión que identifica las longitudes de onda individuales o combinaciones de éstas que mejor explican en la población a analizar la variabilidad del constituyente en cuestión (Hruschka, 2001). Por todo ello, la exactitud y precisión de la calibración depende de la variabilidad de la población muestral y de la magnitud de esta variabilidad (Ripoche and Guillard, 2001).

Una de las etapas básicas en el desarrollo de una ecuación de calibración NIRS, es la selección de muestras que constituyen el grupo

o set de calibración. En general, a mayor número de muestras que constituyan este colectivo, mayor será la capacidad de predicción de la ecuación. Por otro lado, es también de gran importancia la variabilidad que cubran estas muestras, tanto espectral como química (Naes and Isaksson, 1989; Isaksson and Naes, 1990; Infracsoft International, 1992; Shenk and Westerhaus 1996).

Hoy en día se han propuesto numerosos métodos de selección de muestras para constituir el set de calibración (Naes and Isaksson, 1989; Isaksson and Naes, 1990) e incluso, en algunos de los programas de tratamiento quimiométricos de espectros NIR, se suelen incorporar herramientas para construcción, estructuración y selección de muestras representativas de una librería espectral NIR (Infracsoft International, 1992; Shenk and Westerhaus, 1996). La mayoría de dichas herramientas se basan en la realización de un análisis de componentes principales, seguido de cálculo de distancias entre muestras espectrales en un espacio n-dimensional, a través generalmente de la distancia de Mahalanobis (Infracsoft International, 1992; Shenk and Westerhaus, 1996).

Otra de las etapas a considerar en el análisis cuantitativo es el desarrollo del modelo matemático que relacione ambos tipos de datos. Para ello existen diferentes métodos de regresión, siendo los más utilizados la regresión lineal múltiple (RLM o MLR), la regresión por componentes principales (RCP o PCR) y la regresión mediante cuadrados mínimos parciales (RMCP o PLS).

La regresión multivariante de cuadrados mínimos parciales modificados (MPLS), que es una variante de la regresión de cuadrados mínimos parciales (PLS), es un procedimiento en que los residuales obtenidos, después de que cada factor es calculado, son estandarizados antes de calcular el siguiente factor, por lo cual resulta más estable y exacto que el algoritmo RMCP o PLS estándar (Infracsoft International, 1992).

Durante el desarrollo de una ecuación de calibración NIRS, siempre se observa la presencia de determinadas muestras que, por diferentes motivos, presentan un comportamiento diferente al resto de las muestras presentes en el set o grupo de calibración. A estas muestras se le denomina anómalas (outliers). La anomalía puede ser causada tanto por la información espectroscópica (anómalos H) como por la química (anómalos T). La detección, interpretación y posible eliminación de estas muestras anómalas es una etapa crítica en el desarrollo de una ecuación de calibración, debido a la gran influencia que provoca su presencia en los resultados del modelo (García Olmo, 2002, citado por Delgado, 2003).

Una vez detectada la presencia de anómalos químicos y espectrales, estas muestras han de ser interpretadas mediante la búsqueda de causas que pudieran provocar dichas diferencias, repitiendo en la medida de lo posible su análisis espectral o de referencia (Infrasoft International, 1992). A continuación se procede a estimar la capacidad de predicción de muestras que no hayan intervenido en la calibración. Este proceso se denomina validación externa, designando a estas muestras como set o grupo de validación.

Una variante de la validación externa, es la denominada validación cruzada, la cual consiste en una validación basada únicamente en los datos empleados en la etapa de calibración. En este procedimiento, el grupo de muestras de calibración es segmentado repetidamente en subgrupos, reservando uno para validar y usando los restantes en la calibración, en forma iterativa, hasta que todos los grupos hayan sido empleados en la validación (Infrasoft International, 1992). Este método permite realizar una validación, aun cuando por el número reducido de muestras, no se pueda hacer una validación externa (Infrasoft International, 1992). Con ello se logra obtener una estimación de la capacidad de predicción de una ecuación más real que la obtenida durante el desarrollo del modelo de calibración.

Desde el punto de vista estadístico, la etapa de validación consiste en la comparación, mediante diferentes criterios estadísticos, del

valor verdadero y el valor estimado (Massart *et al.*, 1988, citados por Delgado 2003), especificando que en la tecnología NIRS, se considerará como valor verdadero aquel determinado mediante el método de referencia mientras que el valor estimado será aquel predicho por la ecuación de calibración NIRS.

2.4.2.1.1 Criterios de selección de la ecuación. El análisis NIRS se basa en procedimientos estadísticos para la obtención de valores predichos exactos y controlar todos los aspectos del proceso de calibración y validación (Shenk and Westerhaus, 1994).

Los estadísticos utilizados para la evaluación de ecuaciones NIRS no han sido totalmente estandarizados por la comunidad NIRS, siendo frecuente que diferentes trabajos publicados y software difieran a veces en los estadísticos utilizados.

No obstante existen algunos estadísticos, de uso muy generalizado, normalmente propuestos por investigadores en el área NIRS, de relevancia en el desarrollo teórico de esta tecnología (Shenk *et al.*, 1992; Workman, 1992).

A continuación se detallan los diferentes estadísticos de calibración utilizados en el desarrollo de las mismas.

- El coeficiente de determinación (R^2), que se define como el porcentaje de variabilidad explicada en las concentraciones modeladas por la ecuación de regresión. Se emplea tanto en el proceso de calibración (R^2) como en el proceso de validación cruzada (1-VR). 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 error estándar de 0. Un bajo valor de R^2 indica generalmente que los valores de laboratorio son imprecisos (Westerhaus, 1989; Shenk and Westerhaus, 1994).
- El error estándar de calibración (SEC), de validación cruzada (SECV) y de predicción (SEP) son los errores estándares de los residuales para el set de calibración, validación cruzada y

validación externa, respectivamente, y se obtienen a partir de la fórmula general del error estándar (SED) (Infrasoft International, 1992).

$$SED = \sqrt{\sum(D)^2 / N} \quad (2.2)$$

Donde: D = diferencia entre dos valores.
N = número de muestras.

El SEC tiene como función comparar diferentes calibraciones generadas a partir de un mismo grupo de datos, indicando la incertidumbre de la calibración (Davies and Grant, 1987). Un bajo valor SEC indica un buen ajuste de las muestras usadas para la calibración. Si la medición NIR y el proceso de calibración estuvieron libres de error, el SEC será igual al error estándar de laboratorio (SEL) de la variable calibrada (Westerhaus, 1989). El SEL se define como el error estándar de muestras analizadas en duplicado mediante el método de referencia y cuya formula es:

$$SEL = \frac{\sum_{i=1}^M (L_{1i} - L_{2i})^2}{2M} \quad (2.3)$$

Donde: M = número de muestras analizadas por duplicado
L_{1i}=valor de laboratorio para la primera repetición de la muestra i.
L_{2i}=valor de laboratorio para la segunda repetición de la muestra i.

- El error estándar de la validación cruzada (SECV) se obtiene de la predicción de las muestras no incluidas en los grupos de calibración en una validación cruzada y resulta ser el mejor estimador de la capacidad de predicción de una ecuación de calibración (Shenk and Westerhaus, 1996).

Se debe tener en cuenta que el error estándar de la validación cruzada (SECV) será siempre mayor al error estándar de la calibración (Infrasoft International, 1992).

Aunque no existen normas que determinen la mejor ecuación, la mayoría de los investigadores NIRS emplean uno o varios de los siguientes criterios:

1. Los valores de error estándar de la calibración (SEC) y validación cruzada (1-VR) deben ser de magnitud similar entre sí y semejantes al error estándar de laboratorio. En general, las ecuaciones que posean un error estándar de la validación cruzada (SECV) o de predicción (SEP) de una magnitud 1 a 1.5 veces el error estándar de laboratorio (SEL), tienen una precisión excelente. Ecuaciones con valores de SECV o SEP de una magnitud de 2 a 3 veces el error estándar de laboratorio de referencia, tienen una precisión buena (Delgado, 2003).
2. Se considera que los valores de SEC o SECV de dos ecuaciones, no son significativamente diferentes, cuando se diferencian en menos del 20% (Delgado, 2003).
3. Los valores del coeficiente de determinación de la validación cruzada (1-VR) y de la calibración (R^2) deben ser próximos a 1 o bien ser acordes con el máximo establecido por la ecuación de Workman (1992), donde se estima R^2 , de acuerdo al error estándar de laboratorio y el error estándar de los valores de concentración de las muestras analizadas.

$$R^2_{est} \approx 1 - \frac{SEL^2}{SD^2_{rango}} \quad (2.4)$$

Donde: SEL = error estándar del laboratorio
 SD_{rango} = error estándar de los valores X (valores de concentración)

Shenk y Westerhaus (1996) indican que las calibraciones con valores de R^2 entre 0,89 y 0,69 producen una buena predicción cuantitativa y las que tengan un valor comprendido entre 0,6 y 0,5 permiten una adecuada separación entre muestras de alto, medio y bajo contenido en un determinado parámetro analítico. Los mismos autores sugieren que

aquellas calibraciones con un valor de R^2 inferior al 0,5 permiten únicamente una separación de muestras en dos grandes grupos: alto y bajo contenido.

4. Se elegirán ecuaciones sencillas que utilicen un menor número de términos o factores PLS.
5. A igualdad de los estadísticos SECV y SEC, son preferibles las ecuaciones que utilicen derivadas y dentro de éstas son preferibles las ecuaciones que utilizan 1ª y 2ª derivada frente a las de orden superior.

Una vez seleccionadas las mejores ecuaciones de calibración NIRS para cada uno de los componentes analizados, y teniendo un set de muestras para validación externa, el procedimiento de validación externa se basa en los siguientes criterios de acuerdo con Infrasoftware International (1992) y Shenk and Westerhaus (1996).

1. El set de validación ha de tener, como mínimo, 9 muestras
2. Se establece como limite para el sesgo el obtenido de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Limite sesgo} = \text{SECV} \times 0,6 \quad (2.5)$$

3. Se define el error estándar de predicción corregido por el sesgo (SEP(C)) como un estimador del error aleatorio o error no explicado por la regresión. Se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{SEP} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_{ci} - y_{pi} - \text{sesgo})^2}{N-1}} \quad (2.6)$$

Donde: N = N° de muestras set de validación
 y_{ci} = Valor del constituyente para la muestra i
 y_{pi} = Valor predicho para la muestra i .

El sesgo expresa la diferencia entre los valores obtenidos en laboratorio y los predichos por NIRS. El signo del sesgo indica si los

valores obtenidos en laboratorio son mayores o menores a los obtenidos en la predicción NIRS, además indica el promedio de esa diferencia.

Al mismo tiempo, se establece un límite para SEP(C) de acuerdo con la fórmula:

$$\text{Límite SEP(C)} = \text{SECV} \times 1,3 \quad (2.7)$$

4. La pendiente de la regresión entre los valores predichos y los valores del método de referencia, debería estar comprendida entre 0,9 y 1,0.
5. La media de los valores predichos y de referencia no debe diferir en más de un 20%.
6. El coeficiente de determinación (R^2) de la regresión establecida entre los valores predichos y los del método de referencia debe ser mayor de 0,6 e idealmente aproximarse a 1.
7. La distancia H de las muestras del set de validación debe ser inferior al valor límite de 3.

2.4.2.2 Análisis cualitativo. El análisis cualitativo NIRS, consiste en la comparación de espectros de muestras desconocidas con grupos de espectros NIR de muestras de características conocidas (Mark, 1992). Estas características o atributos, variables categóricas y no continuas, pueden ser, como ejemplo, el origen geográfico, variedad, tipo de producto, tipo de alimentación, etc.

Se ha de destacar que la principal diferencia del análisis cualitativo con el análisis cuantitativo es que en este caso, no es preciso disponer de ningún dato químico adicional al dato espectroscópico NIR, por lo que el set de aprendizaje sólo está constituido por información espectral NIR, de ahí que se pueda denominar análisis espectral *per se*.

Todos los métodos de clasificación o de reconocimiento de pautas se podrían agrupar en dos grandes categorías: supervisados y no supervisados. Ambos se diferencian en el nivel de información que se disponga *a priori* del agrupamiento existente en los datos (Massart *et al.*, 1997, citado por Delgado, 2003).

Los no supervisados son aquellos en los que no se dispone de ninguna o escasa información acerca de los grupos (categorías) existentes en las muestras analizadas. El principal objetivo de estos métodos es poder identificar tendencias al agrupamiento de las muestras disponibles, sin necesidad de disponer de ningún tipo de información adicional acerca de ellas, nada más que sus datos espectrales (Downey, 1996, Naes *et al.*, 2002).

A diferencia de los métodos no supervisados, en los supervisados sí se dispone de información acerca de los grupos o categorías existentes en el set de muestras, y son los utilizados normalmente en el análisis cualitativo. El principal objetivo de este tipo de método es el de generar diferentes reglas o modelos de clasificación para un número determinado de clases o grupos de muestras analizadas (Downey, 1996; Naes *et al.*, 2002).

La variante más extendida de análisis cualitativo consiste en comparar el espectro de un producto, con una librería espectral o con un espectro estándar, representativo de un determinado producto, del cual se posee información de sus atributos cualitativos (color, procedencia geográfica, variedad, etc.) Por lo tanto, es necesaria una librería espectral representativa del producto en cuestión, para el cual el espectro de un material de comprobación pueda ser comparado, con el fin de establecer su calidad o autenticidad.

Dentro del análisis cualitativo, también se puede incluir la interpretación espectral visual donde se estudian los picos de absorbancia de los espectros, localizándose las bandas de absorción de grupos funcionales, detección de zonas de máxima diferencia entre varios productos, etc.

Un aspecto general dentro del análisis cualitativo, es que es necesario tener un perfecto conocimiento de las muestras que se van a analizar, para que las pequeñas diferencias en absorbancia, puedan ser usadas para separar los espectros dentro de diferentes grupos y poder construir, de esta forma, un modelo de clasificación, que una vez validado, se utilizará para predecir muestras de características desconocidas (Downey, 1999).

Gracias a los avances en los instrumentos de medición, al desarrollo informático y a un mejor tratamiento de los datos espectrales, en las últimas décadas se han abierto enormes expectativas de aplicación al análisis cualitativo (Griffin and Grummisch, 1992, citados por Delgado, 2003).

Un paso preliminar al análisis discriminante suele ser un Análisis de Componentes Principales, mediante el cual se reducen los datos de longitudes de onda del espectro original, a unos pocos nuevos ejes o dimensiones. El espectro de cada muestra puede ser representado como un punto, con respecto a estos nuevos ejes (Downey, 1999).

La presencia de muestras anómalas es también de gran importancia en el análisis cualitativo, debido a la necesidad de constituir el grupo de aprendizaje, a partir de muestras de características muy controladas y definidas. Las herramientas de detección de anomalías son similares a las empleadas en el análisis cuantitativo. En general, muestras detectadas como de elevadas diferencias al resto en cuanto a los valores de distancia de Mahalanobis y/o varianza residual, tanto durante el desarrollo del modelo como en su posterior evaluación con muestras externas, han de ser consideradas anómalas (Mark, 1992; Naes *et al.*, 2002).

Los principales métodos que se utilizan para abordar el estudio de estos modelos discriminantes son: Análisis de conglomerados ("Cluster Analysis"), Análisis Discriminante Factorial, Análisis de variables Canónicas, Análisis de los vecinos más cercanos ("K-nearest Neighbours

Analysis"), Análisis de Modelado SIMCA ("Soft Independent Modeling of Class Analogy"), Análisis Discriminante mediante ecuaciones de regresión de términos PLS, Análisis Discriminante mediante Redes Neuronales, etc. Este último análisis se lleva a cabo mediante relaciones no lineales.

La validación o evaluación de un modelo cualitativo es tan importante en análisis cualitativo como en las aplicaciones cuantitativas. En general, el estadístico a emplear en cualquier método de clasificación es el error, entendido éste, como el porcentaje de muestras clasificadas incorrectamente. Este error de clasificación puede estimarse, tanto mediante un proceso de validación cruzada como mediante un conjunto de muestras que no hayan intervenido en el desarrollo del modelo, entendiendo que mientras menor sea su valor, mayor capacidad de clasificación presentará el modelo (Naes *et al.*, 2002).

Las ventajas que presenta el análisis cualitativo, son la posibilidad de realizar una clasificación directa, usando únicamente datos NIR y tener menos dependencia de determinaciones a realizar mediante los métodos de referencia. Como desventaja, hay que tener en cuenta el enfoque conceptual poco conocido y la dependencia de cálculos estadísticos multivariantes también poco conocidos.

2.4.3 Aplicaciones de la técnica NIRS en carnes

Desde principios de los años sesenta, la tecnología NIRS ha evolucionado considerablemente, siendo considerada hoy en día un potente sensor para el análisis cualitativo y cuantitativo en la industria agro-alimentaria, farmacéutica, química, etc.(Garrido *et al.*, 2000, Van Kempen, 2001).

La técnica NIRS fue aplicada por primera vez al análisis de carne en 1968, por Ben-Gera y Norris, quienes utilizando medidas de transmitancia, obtuvieron la composición química de productos cárnicos. Desde entonces han sido publicados numerosos trabajos en torno a este tema.

Con respecto al análisis cuantitativo, se elaboró un cuadro que incluye los estadísticos obtenidos para carne y productos cárnicos en algunas publicaciones (cuadros 3).

Cuadro 3. Valores de los coeficientes de determinación de la calibración (R^2), error estándar de la predicción (SEP) y rango de las ecuaciones de predicción obtenidas por diferentes autores.

Autor(es)	Muestras De	Humedad			Grasa			Proteína		
		Rango	R^2	SEP	Rango	R^2	SEP	Rango	R^2	SEP
Kruggel <i>et al.</i> , (1981) ^(R)	Cordero	46 - 63	0,72	-	15 - 36	0,70	-	14 - 17	0,59	-
	Vacuno	49 - 70	0,88	-	9 - 37	0,88	-	15 - 20	0,72	-
Lanza (1983) ^{(R)(T)}	Vacuno ^(R)	66 - 75	0,96	0,52	3 - 14	0,99	0,31	18 - 23	0,75	0,61
	Cerdo ^(T)	67 - 76	0,96	0,59	4 - 16	0,69	1,12	18 - 26	0,55	0,99
	Cerdo ^(R)	67 - 76	0,95	0,60	4 - 16	0,99	0,16	18 - 26	0,76	0,66
Bartholomew and Osuala (1988)	Cordero	63 - 74	0,98	-	6 - 19	0,98	-	17 - 19	0,75	-
Mitsumoto <i>et al.</i> , (1991) ^(R, T y F)	Vacuno ^(R)	60 - 76	0,89	-	3 - 22	0,93	-	16 - 21	0,82	-
	Vacuno ^(T)	59 - 76	0,88	-	3 - 23	0,93	-	15 - 21	0,73	-
	Vacuno ^(F)	59 - 76	0,80	-	3 - 23	0,79	-	15 - 21	0,68	-
Berg and Kolar (1991) ^(T)	Vacuno y cerdo	33 - 77	0,96	-	0,9 - 59	0,98	-	9 - 23	0,92	-
Clark and Short (1994) ^{(F)(1)}	Vacuno	22 - 59	0,91	3,01	0,3 - 53	0,96	2,51	-	-	-
Kim and Yoo (1995) ^(F)	Vacuno	53 - 79	0,97	0,81	-	-	-	16 - 24	0,86	0,74
Solberg (1996) ^(T)	Salmon	69 - 78	0,98	0,21	0,5 - 10	0,98	0,33	19 - 21	0,98	0,20
Isaksson <i>et al.</i> , (1996)	Vacuno	60 - 73			6 - 22			18 - 21		
Cozzolino <i>et al.</i> , (1996) ^(R)	Pollo	57 - 74	0,99	-	0,1 - 10	0,95	-	21 - 25	0,97	-
Czarnik-Matusiewicz and Korniewicz (1996)	Cerdo	69 - 74	0,84	0,40	0,3 - 1,3	0,82	0,10	19 - 24	0,80	0,63

(R)reflectancia; (T) transmitancia, (F) Fibra óptica

(1) Los valores publicados hacen referencia a la materia seca y no a la humedad.

Cuadro 3. Valores de los coeficientes de determinación de la calibración (R^2), error estándar de la predicción (SEP) y rango de las ecuaciones de predicción obtenidas por diferentes autores (continuación).

Autor(es)	Muestras De	Humedad			Grasa			Proteína		
		Rango	R^2	SEP	Rango	R^2	SEP	Rango	R^2	SEP
Czarnik-Matuszewicz and Korniewicz (1998) ^{(R)(1)}	Cerdo	24 - 27	0,97	0,17	1 - 3	0,96	0,20	-	-	-
Togersen <i>et al.</i> , (1999) ^(R)	Vacuno y cerdo	58 - 75	0,77	1,11	7 - 26	0,90	1,16	16 - 20	0,52	0,57
Cozzolino <i>et al.</i> , (2000) ^(R)	Cordero ^(E)	-	0,56	-	-	-	-	-	0,71	-
	Cordero ^(M)	-	0,76	-	-	-	-	-	0,83	-
Solís <i>et al.</i> , (2001) ^(R)	Cerdo	67 - 73	0,98		5 - 13	0,99		19 - 22	0,71	
García-Lagombra <i>et al.</i> , (2001) ^{(R)(1)}	Vacuno y Cerdo		0,93	3,4		0,99	0,98		0,96	0,65
Cozzolino <i>et al.</i> , (2002) ^(R)	Cordero		0,76						0,83	
	Vacuno		0,98	-		-	-		0,81	-
	Pollo		0,99						0,97	
Cozzolino <i>et al.</i> , (2002) ^(R)	Vacuno ^(M)	61 - 75	0,41	-	0,2 - 15	0,92	-	17 - 27	0,71	-
	Vacuno ^(E)									
Alomar <i>et al.</i> , (2003) ^{(R)(1)}	Vacuno	21 - 27	0,77	-	0,5 - 6	0,82	-	18 - 23	0,82	-
Delgado (2003) ^(R)	Cerdo	33 - 45	0,89	1,77	9 - 29	0,97	4,05	29 - 44	0,90	3,38

(R)reflectancia; (T) transmitancia, (F) Fibra óptica

(1) Los valores publicados hacen referencia a la materia seca y no a la humedad.

Con respecto al análisis cualitativo, son varios los trabajos que se han desarrollado en carne.

Thyholt and Isaksson (1997) utilizaron la técnica NIRS en el modo de reflectancia, para identificar carne que ha sido congelada y descongelada, utilizando muestras enteras y jugos de carne de vacuno. Estos últimos fueron analizados usando espectroscopía del extracto seco en reflectancia infrarroja (DESIR). Utilizaron un análisis de discriminante de vecinos (KNN) y los resultados fueron un 100% de carnes clasificadas correctamente a través de los jugos de carne, y sobre un 98% en muestras de carne entera.

Downey and Beauchêne (1997) utilizaron espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano para diferenciar carne de vacuno fresca congelada y descongelada una, dos o tres veces, a través de muestras de jugos exudados, utilizando el análisis DESIR. Utilizaron los métodos de análisis discriminante factorial, el análisis de modelado SIMCA ("Soft Independent Modeling of Class Analogy") y el análisis discriminante mediante ecuaciones de regresión de términos PLS. El método de análisis discriminante factorial fue el que mejores resultados entregó, con un porcentaje de clasificación correcta superior a un 93%.

Thyholt et al.(1997) utilizando muestras picadas de carne de 68 canales de vacuno, cerdo, cordero y aves, realizaron un estudio donde usaron NIR empleando el extracto seco como método para: reconocer el origen de la carne de la especie marcada en el etiquetado y para determinación de la especie de la que procede si no es la de la etiqueta. Como métodos de análisis utilizaron PLS, QDA (análisis discriminante cuadrático) y LDA (análisis discriminante lineal) y los resultados encontrados fueron que del total de muestras el 90-100% fueron clasificadas correctamente, donde el mejor método fue el QDA.

Ding et al. (1999) utilizaron la técnica de la espectroscopía NIR para diferenciar origen de la carne de pollo (broilers y pollos

chinos locales), utilizando muestras de muslo y pechuga picadas y sin picar, con piel y sin ella. Para ello utilizaron diferentes modelos de regresión: componentes principales (PCR), lineal múltiple (MLR), cuadrados mínimos parciales (PLS) y PLS modificado. De su estudio concluyeron que existen variaciones en los resultados según las distintas técnicas de regresión y la exactitud en la clasificación fue un 100% para carne de muslo picado, 96% para pechuga sin picar y sin piel y 92% para carne de pechuga picadas y pechuga picada con piel. Ningún modelo mostró diferencias en la exactitud de la clasificación.

Fumiére *et al.* (2000) realizaron experimentos en canales de pollos utilizando espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano para diferenciar aves de crecimiento lento (81 días al sacrificio) de aves "industriales" de crecimiento rápido (42 o menos días al sacrificio), a través del análisis espectral de muestras de pechuga y muslo, con y sin piel. Utilizaron el programa de discriminación "Discriminate groups" del software WinISI II de Infrasoftware International. Los equipos utilizados para el análisis cualitativo fueron un espectrómetro Nirsystems 6500 y un espectrómetro PERTEN DA 7000. Los resultados obtenidos indican que con el equipo NIRSYSTEM 6500 se obtienen los mejores resultados de clasificación.

Alomar *et al.* (2003) utilizaron NIRS como herramienta discriminante para separar diferentes músculos (*Longissimus*, *Semitendinosus* y *Supraspinosus*), diferentes razas (Friesian y Hereford) y diferentes tipificaciones de animales bovinos (V,A,C,U,N,O). En su trabajo usaron un equipo monocromador NIRSYSTEM 6500 con módulo de transporte y la técnica de regresión de los cuadrados mínimos parciales modificados (MPLS), a través del software WinISI II de Infrasoftware International. Los porcentajes de las muestras correctamente clasificadas a partir de las ecuaciones discriminantes NIRS obtenidas fueron: para razas, de un 79%; para los diferentes músculos, entre un 89,5 y un 97,8% y para las diferentes tipificaciones, entre un 28,9 y un 94,4%.

Otros trabajos en análisis cualitativo se resumen en el cuadro 4.

Cuadro 4 Valores de error de clasificación obtenidos por diferentes autores en productos cárnicos.

Autor	Muestra	Estudio o Determinación	Tratamiento	Error de Clasificación
Naes and Hildrum (1997)	Lomo de vacuno	Diferenciación de distintos métodos de clasificación para determinación de la ternera	PCR, análisis de Bayes y distancia de Mahalanobis	Buena clasificación para las muestras tiernas y duras, peor para intermedias
Downey (1999)	Cerdo, pollo y pavo	Diferenciación de carne cruda picada de las distintas especies	Discriminación factorial para ciertos rangos de longitud de onda	8,1 %
McElhinney et al. (1999)	Pollo, pavo, cerdo, vacuno y cordero	Identificación de las distintas especies	Análisis discriminante factorial (FDA), análisis de modelado SIMCA, KNN y PLS	Mejores rangos de clasificación con FDA y con ecuaciones discriminantes PLS
Ding et al. (1999)	Canguro y vacuno	Diferenciación de las dos especies con carne cortada y picada	Análisis discriminante canónico (CDA) y MLR	Con MLR se obtiene 0-16,7% para carne cortada y 0-5,6% para carne picada. Con CDA se obtiene 0-2,4% para carne cortada y 0-7,3% para carne picada
Chen and Massie (1993)	Aves	Diferenciación entre canales anormales y normales	Análisis discriminante basado en Regresión Lineal múltiple (MLR)	6,7% en muestras normales 3,8% en muestras anormales
Chen et al. (2000)	Aves	Diferenciación de pollos anormales y enfermos de normales	4 modelos discriminantes utilizando métodos de redes neuronales	2,6 - 6,9%

3 MATERIAL Y METODOS

3.1 Ubicación y duración del Estudio

El estudio se realizó en el Laboratorio de Nutrición Animal perteneciente al Instituto de Producción Animal de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile, en la ciudad de Valdivia, entre septiembre de 1999 y enero del 2000.

Este estudio se dividió en tres ensayos, el primero fue un análisis cuantitativo de carne de cordero lechal y los dos siguientes, análisis cualitativos de carne y de jugo de carne de cordero.

3.2 Análisis cuantitativo de carne de cordero lechal (primer ensayo).

En este primer ensayo, a muestras de carne de cordero lechal, se le colectaron los espectros, se caracterizaron químicamente a través de métodos convencionales y se generaron ecuaciones de calibración para cada uno de los componentes analizados.

3.2.1 Materiales. Se utilizaron 120 muestras de carne de cordero lechal congeladas a -20°C , provenientes de un ensayo realizado en la Universidad de Chile, Facultad de Medicina Veterinaria, las cuales fueron descongeladas a 4°C por 24 horas y posteriormente molidas en un procesador de alimentos Moulinex ^(MR) de 750 watts, modelo 1-2-3 equipado con un recipiente de 400 cc, por un tiempo de 2 minutos; para luego almacenarlas envueltas en papel de aluminio a una temperatura constante de 4°C por 10 a 12 horas hasta que se tomaron los espectros correspondientes.

3.2.2 Métodos

3.2.2.1 Colección de los espectros. Cada muestra fue homogeneizada a temperatura ambiente por aproximadamente 20 minutos y dividida en 5 submuestras con las cuales se llenaron cuidadosamente 5 cubetas circulares con ventana de cuarzo de 35 mm de diámetro y 10 mm de espesor. Los espectros fueron tomados en el rango de 400 a 2500 nm a intervalos de 2 nm. En la lectura de los espectros se utilizó un equipo

monocromador NIRSystems modelo 6500, con detector de reflectancia y un módulo de rotación de muestras, manejado por el programa Scan del software NIRS 3.0 de INFRASOFT INTERNATIONAL (1992), asistido por un computador personal. Los valores de absorbancia ($\log (1/R)$) se almacenaron como un promedio de las 5 submuestras.

3.2.2.2 Análisis químico. Para el análisis químico de las muestras se utilizó una muestra compuesta de las 5 submuestras analizadas espectralmente, la que fue analizada en fresco y en duplicado, utilizando los siguientes métodos:

Humedad: se utilizó el método oficial AOAC 950.46, de secado al horno, para determinar humedad en carne (AOAC,1995).

Proteína bruta: se utilizó el método oficial AOAC 928.08, método Kjeldahl que determina N en carne (AOAC,1995).

Grasa: se utilizó el método oficial AOAC 991.36, de extracción por solvente (sumersión) para grasa (cruda) en carne y productos cárnicos (AOAC, 1995).

Cenizas: Se utilizó el método oficial AOAC 923.03, método directo de calcinación en mufla (AOAC,1995).

3.2.2.3 Tratamiento de los datos espectrales. De acuerdo a las recomendaciones del manual NIRS 3.0 de Infrasoft International (1992) para encontrar el mejor tratamiento por ensayo y error, se sometió a los espectros a varios tratamientos matemáticos, intentando las mejores combinaciones. El tratamiento matemático se describe mediante cuatro cifras, la primera corresponde al orden de diferenciación ("Derivative"), el segundo al intervalo de sustracción ("Gap") y el tercer y cuarto número corresponden al primer y segundo segmento de suavización ("Smooth"). Además, se evaluó la aplicación o no aplicación de un tratamiento de corrección de dispersión de luz (scatter correction). Para esto los espectros se sometieron al método combinado

de la varianza normal estándar (SNV) y el método "Detrend", "SNV-detrend", recomendado por Infracsoft International (1992)

En este estudio, siguiendo recomendaciones de Infracsoft International (1992), se utilizó el método de regresión de los cuadrados mínimos parciales modificados ("MPLS") calificado como más estable y preciso, ya que estandariza cada factor calculado, dividiéndolo por el valor residual promedio, esto previo al cálculo del próximo factor. Este método utiliza toda la información espectral (longitudes de onda) y los valores de laboratorio para formar la ecuación de regresión.

También, de acuerdo a recomendaciones del manual NIRS 3.0 de Infracsoft International (1992), se validó las ecuaciones en base a cinco grupos de validación cruzada, realizando 2 pasadas de eliminación de muestras aberrantes ("outliers") en forma automática, según un valor de 2,5 del estimador estadístico de la desviación del valor predicho respecto al de referencia (T) como límite máximo. El número máximo de términos para cada ecuación, correspondió al número de muestras dividido por 10 más 2, con un total de 14 términos para este caso. El número final de términos lo definió el programa al realizar el proceso de calibración y validación cruzada.

La calibración para la obtención de las ecuaciones se realizó sobre un total de 120 muestras de carne de cordero lechal, registrando en primer lugar los resultados obtenidos de los análisis químicos y luego haciendo una correlación con los datos espectrales de cada una de las muestras, lo que fue almacenado en un archivo de extensión CAL.

Esta calibración se hizo en dos etapas.

Primera Etapa. Se calibró sobre el total de muestras analizadas, variando el tratamiento matemático y usando o no corrección de dispersión del espectro. Para la obtención de la mejor ecuación para cada fracción, se hicieron calibraciones consecutivas a través del programa "global equations" de WinISI II. Los términos estadísticos de

certidumbre e incertidumbre, así como el número de términos de las ecuaciones se definieron mediante validación cruzada.

Segunda Etapa. A través de la opción "Select samples from a spectra file" del programa WinIsi II se seleccionaron del total de 120 muestras, 90 muestras para originar un set de calibración y las 30 restantes para realizar una validación externa de la mejor ecuación.

En esta etapa se generaron dos ecuaciones de regresión. Una de ellas, mediante el mismo tratamiento matemático que originó la mejor ecuación de la primera etapa, para cada fracción analizada. La otra, mediante calibraciones sucesivas variando los tratamientos matemáticos, con el fin de obtener una nueva ecuación para cada componente químico analizado.

A continuación se realizó una validación externa, utilizando las dos ecuaciones generadas con las muestras del set de calibración.

3.2.2.4 Evaluación y selección de las ecuaciones de calibración. El programa realizó una validación cruzada, que consiste en dividir el total de muestras en grupos, tomando un grupo de muestras para validar y el resto para calibrar, repitiendo este proceso hasta haber realizado la calibración y validación con todos los grupos.

Para cada componente se evaluó la calidad de las ecuaciones de calibración utilizando términos estadísticos de certidumbre, como el coeficiente de determinación de la validación cruzada ($1-VR$) y el coeficiente de determinación de la calibración (R^2). Además se midió el error a través del error estándar de la validación cruzada (SECV) y de la calibración (SEC).

En cada fracción se seleccionaron las ecuaciones examinando el $1-VR$ más alto. En caso de haber coincidencia en los valores, se seleccionó el SECV más bajo. En caso de ocurrir nuevamente coincidencia se siguió el mismo criterio buscando el R^2 más alto junto al menor SEC.

La habilidad predictiva de las ecuaciones se analizó en base a los estadísticos 1-VR, SECV, la relación entre desviación estándar y el error estándar de la validación cruzada (d.e/SECV), conocido como índice RED, y la relación porcentual del SECV con la media o promedio (índice REP)

3.3 Análisis cualitativo de carne de cordero (Segundo ensayo)

Se evaluó la técnica NIRS como herramienta discriminante entre carne refrigerada y carne congelada-descongelada.

3.3.1 Materiales. Se utilizaron 20 piernas de cordero deshuesadas y selladas al vacío, las que fueron disectadas para obtener 2 músculos de cada una de ellas. El músculo *Semimembranosus*, correspondiente al corte posta negra y el músculo *Quadriceps femoris* correspondiente al corte posta rosada.

3.3.2 Métodos. Cada músculo fue molido en un procesador de alimentos Moulinex^(MR), modelo 123 por 60 seg. y subdividido en 2 submuestras, las cuales fueron envasadas en bolsas transparentes de polietileno de 10 x 30 cm y de 0,03 mm de espesor, debidamente identificadas y refrigeradas a 4°C, hasta el momento de tomar la lectura de los espectros, los cuales fueron tomados a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C). Esta temperatura se encuentra dentro de los rangos recomendados por Infracsoft International (1992) de 24 ± 1 °C . A continuación cada una de las bolsas con muestra se congeló a -20 °C por 28 días, para luego descongelarlas lentamente por 24 horas hasta 4°C y volver a tomar su espectro a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C).

3.3.2.1 Lectura de los espectros. Los espectros fueron colectados mediante un equipo monocromador NIRSystems modelo 6500, (ISI, Port

Matilda, PA, USA) con detector de reflectancia y equipado con módulo externo de transporte de muestras. Los datos de absorbancia fueron colectados como $\log 1/R$ desde los 400-2500 nm a intervalos de 2 nm.

El equipo se manejó mediante el programa Scan del software NIRS 3.0 de Infrasoftware International (1992), instalado en un computador personal. El equipo fue configurado para realizar 30 lecturas espectrales por cada descenso del módulo, de manera de obtener un espectro representativo. Después de tomada la primera lectura, cada submuestra fue invertida para así tomar el espectro de su cara posterior, luego se readaptó la submuestra por segunda vez en la bolsa de polietileno, obteniendo por lo tanto 3 lecturas espectrales para cada submuestra, con un total de 6 por cada músculo, de las 20 piernas.

3.3.2.2 Análisis Quimiométrico. En orden a identificar la carne de cordero refrigerada y congelada-descongelada, proveniente de los dos músculos utilizados, se realizó un análisis discriminante mediante ecuaciones de regresión usando el método multivariado de calibración de los cuadrados mínimos parciales (PLS 2)(WinISI II, 1999). Se separaron los archivos espectrales para cada una de las condiciones de conservación de la carne y para cada uno de los músculos utilizados. Con el programa WinISI II versión 1.02 A, se generaron las ecuaciones discriminantes.

En este método de análisis, se establece una matriz de calibración con todas las muestras, asignándole variables ficticias (dummy) con un valor uno si el espectro pertenece a un grupo en particular (de acuerdo al archivo), o un valor cero si no pertenece a ese grupo. La calibración se realizó con los datos espectrales de las muestras utilizando los valores de referencia (cero o uno) asignados como variables ficticias. La validación cruzada se utilizó para comprobar la precisión de la calibración y lograr un mínimo valor de error estándar en la validación (Alomar et al., 2003).

En el desarrollo de las ecuaciones se probaron diferentes tratamientos matemáticos, intentando las mejores combinaciones, al

igual que en el primer ensayo. Siguiendo recomendaciones de Infrasoftware International (1999) y de acuerdo al número de muestras espectrales, se utilizaron catorce como número máximo de términos de la ecuación y cuatro grupos de validación cruzada.

3.4 Análisis cualitativo de jugos de carne (Tercer ensayo)

Se utilizó espectroscopía del extracto seco por reflectancia infrarroja (DESIR) en jugos de carnes, como herramienta discriminante entre aquellas carnes que han sido o no sometidas a congelación.

3.4.1 Materiales. Se utilizaron 15 piernas de cordero deshuesadas, selladas al vacío, y refrigeradas a 4°C, las que fueron disectadas para obtener 2 músculos de cada una. El músculo *Biceps femoris*, que corresponde al corte punta de ganso y el músculo *Glutaeus medius*, que corresponde al corte asiento.

3.4.2 Métodos. Cada músculo fue trozado a un tamaño de $\pm 1\text{cm}^3$ y subdividido en 2 muestras. Una de ellas fue envasada en bolsa de polietileno, debidamente etiquetada, sellada y congelada a -20°C. De la otra muestra, se pesaron en una balanza Sartorius modelo 6100 de pesaje rápido, 4 submuestras de 10 ± 1 g, colocando cada una de ellas en tubos de policarbonato de 50 ml de capacidad, las que fueron centrifugadas en un equipo International Centrifuge modelo HT a 10.000 RPM por 15 minutos, para la extracción de jugo. Este se recolectó en una probeta graduada de 5 ml. Posteriormente, ésta fue agitada en un equipo Vortex-Genie, modelo k-550-GE y se colectó una cantidad de 0,3 ml utilizando una pipeta graduada de 1 ml. El líquido colectado se aplicó sobre cuatro filtros circulares de microfibra de vidrio (GF/A Whatman International Ltd., Maidstone, UK) de 35 mm de diámetro. Luego de esperar que el líquido difundiera a través del filtro, se secaron en un horno de aire forzado marca Memmert modelo UM-500 a 60°C por 20 minutos, para colocarlos a continuación en un desecador de vidrio para bajar su temperatura hasta temperatura ambiente. Enseguida los filtros fueron colocados en cubetas circulares con ventana de cuarzo de 35 mm de diámetro y 10 mm de espesor, tomando las lecturas espectrales de cada uno de los filtros, correspondiente a cada músculo utilizado.

Las muestras congeladas a -20°C por un periodo de 28 días, fueron descongeladas lentamente a 4°C por 24 horas. Para la extracción del jugo y posterior lectura de los espectros se siguió el mismo procedimiento anteriormente descrito.

3.4.2.1 Lectura de los espectros. Los espectros de cada tratamiento fueron colectados con un equipo monocromador NIRSystems modelo 6500, (ISI, Port Matilda, PA, USA) con detector de reflectancia y equipado con módulo de rotación de muestras. Los datos de absorbancia fueron colectados como $\log 1/R$ entre los 400-2500 nm, a intervalos de 2 nm.

El equipo se manejó mediante el programa Scan del software NIRS 3.0 de Infrasoft International (1992), instalado en un computador personal.

3.4.2.2 Análisis Quimiométrico. Al igual que en el segundo ensayo, se utilizó un análisis discriminante mediante ecuaciones de regresión de cuadrados mínimos parciales multivariados (PLS 2) (WinISI II, 1999). Se separaron los archivos espectrales para cada uno de los jugos de carne en las diferentes condiciones de conservación y para cada uno de los músculos utilizados. Con el programa WinISI II versión 1.02 A, se generaron las ecuaciones discriminantes.

4 PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Análisis cuantitativo de carne de cordero lechal (primer ensayo).

4.1.1 Características químicas de las muestras.

Las características composicionales de las muestras de carne de cordero lechal, determinadas a través del análisis químico, se muestran en el cuadro 5, expresadas base peso fresco, que es la misma forma como las muestras fueron escaneadas por el equipo NIRS.

Cuadro 5. Estadísticas básicas de la composición química de las muestras de carne de cordero lechal utilizadas para la calibración (% del peso fresco).

Componente	Nº de muestras	Rango	Promedio \pm d.e.
Humedad (%)	120	54,18 - 74,90	64,73 \pm 4,72
Proteína Bruta (%)	118	14,28 - 21,11	18,36 \pm 1,19
Extracto Etéreo (%)	120	2,22 - 26,99	14,92 \pm 5,02
Cenizas Totales (%)	120	0,88 - 1,79	1,13 \pm 0,16

Los coeficientes de variación de los distintos componentes analizados muestran variaciones de un 6,48%, 7,29%, 14,16% y 33,65 % con respecto al promedio, para proteína bruta (PB), humedad (Hm), cenizas totales (CT) y extracto etéreo (EE), respectivamente.

Una característica importante que debiera tener un set de muestras para calibración es que su distribución composicional sea lo más amplia posible y que se encuentre lo más uniformemente distribuida, además de tener una información originada de una técnica referencial precisa (Murray, 1986).

En los gráficos 1, 2, 3 y 4, se muestra la variabilidad composicional de las muestras en los parámetros humedad (H), proteína bruta (PB), extracto etéreo (EE) y cenizas totales (CT), respectivamente. En proteína bruta y cenizas totales, la distribución presenta desuniformidad y menor amplitud que para humedad y extracto etéreo, con variaciones en puntos porcentuales de 20,72; 6,86; 24,77 y

0,91 para humedad, proteína bruta, extracto etéreo y cenizas totales, respectivamente.

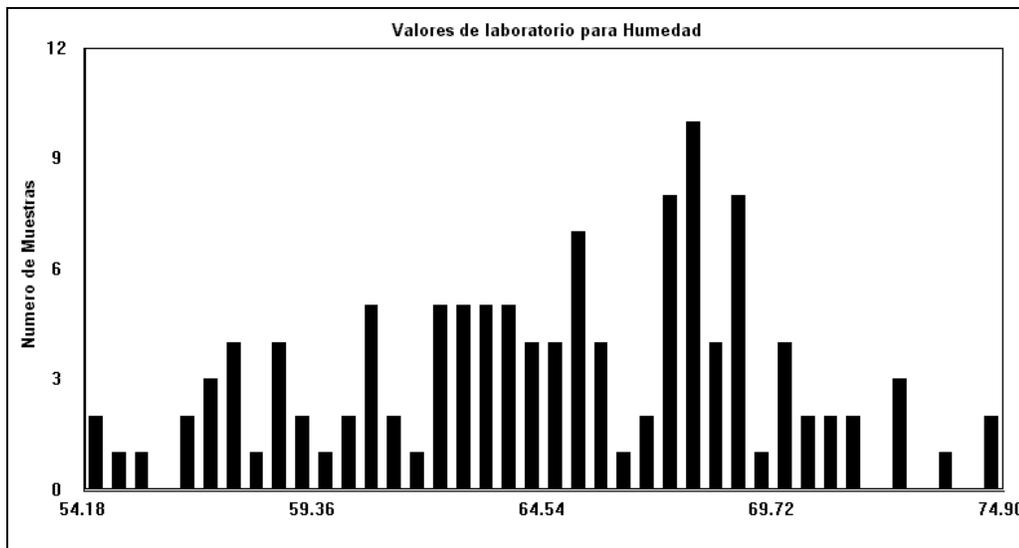


Gráfico 1. Histograma de distribución de las muestras de acuerdo a su humedad.

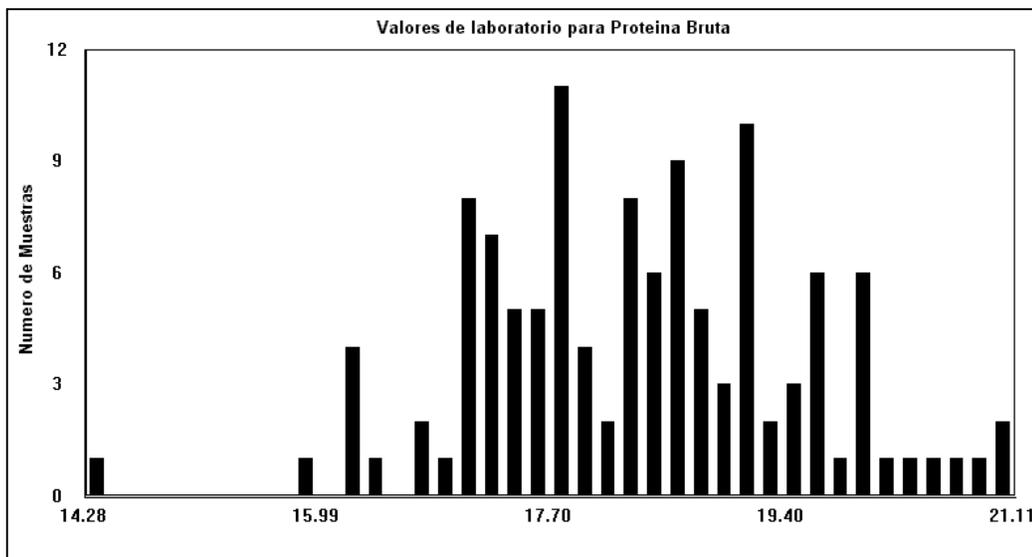


Gráfico 2. Histograma de distribución de las muestras de acuerdo a su proteína bruta.

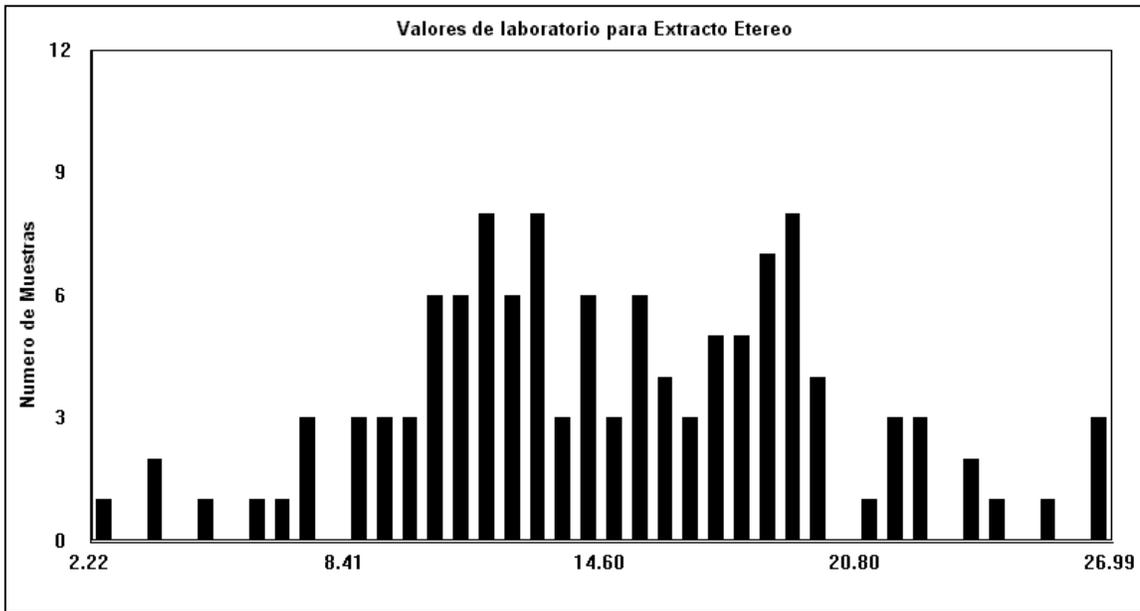


Gráfico 3. Histograma de distribución de las muestras de acuerdo a su extracto etéreo.

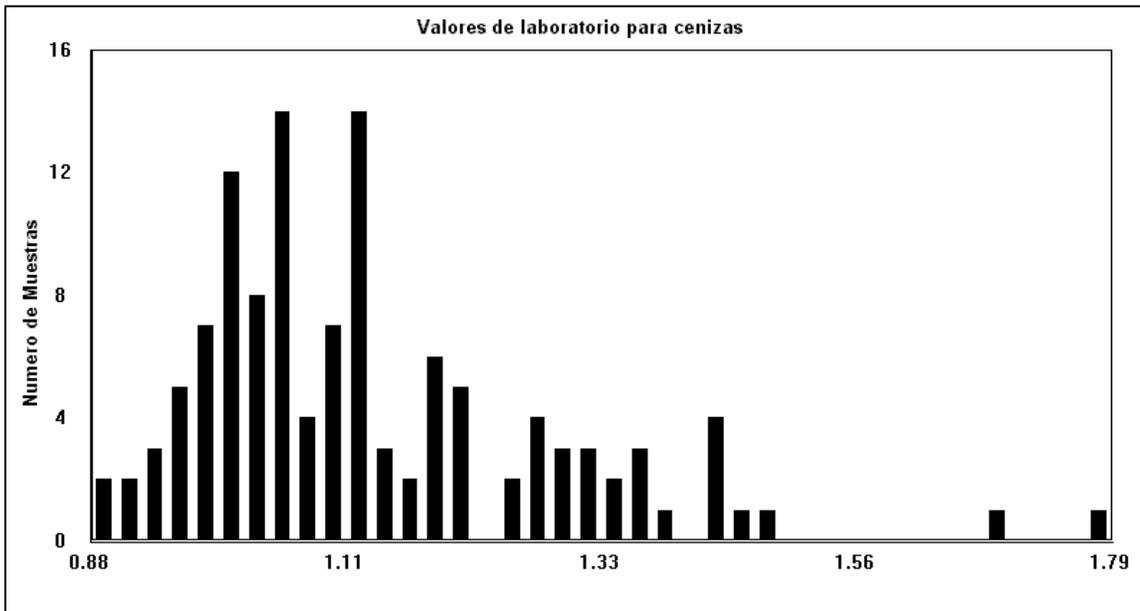


Gráfico 4. Histograma de distribución de las muestras de acuerdo a sus cenizas totales.

Como se observa en el gráfico 2, en el caso de la proteína sólo existe una muestra con un 14,28% de PB, presentando las muestras restantes valores superiores a un 15,88% de PB, por lo cual el intervalo en unidades porcentuales para esta fracción, sin considerar

esta única muestra, sería menor al indicado anteriormente, haciendo más estrecha su amplitud. Lo mismo sucede para cenizas totales, (gráfico 4) donde sólo dos muestras se escapan de la concentración de observaciones. Al excluirlas estrechan el rango composicional para esta fracción.

4.1.2 Caracterización espectral. En el gráfico 5 se muestra el espectro promedio y su segunda derivada en las regiones del visible y el infrarrojo cercano (400-2500 nm) para el promedio de todas las muestras de carne de cordero lechal.

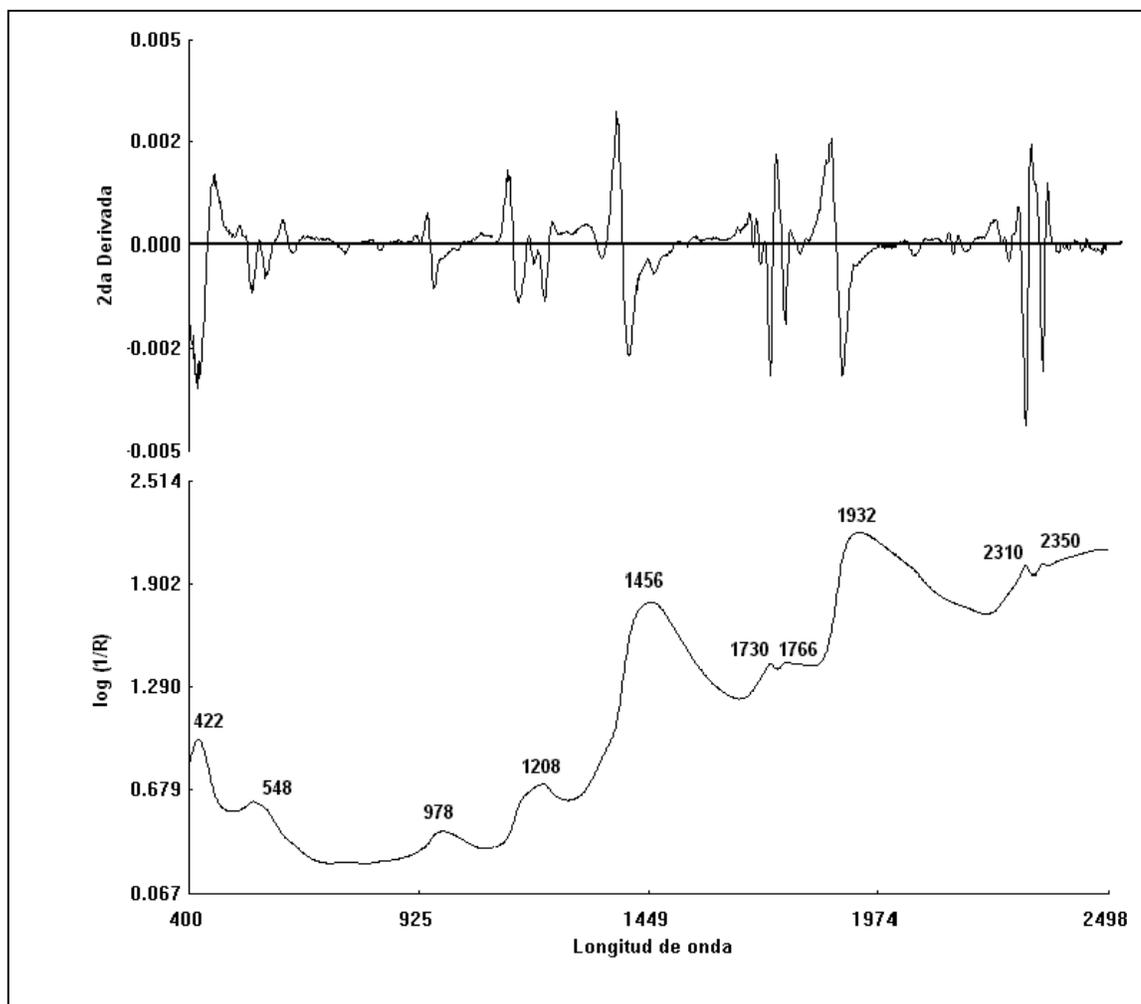


Gráfico 5. Espectro promedio en la región del visible y el infrarrojo cercano (400-2500 nm) y su segundo orden de diferenciación, en carne de cordero lechal.

Se pueden observar además las bandas de absorción en las longitudes de onda de 422 y 548 nm en la región del visible, bandas que están relacionadas con las bandas de absorción de Soret y con los pigmentos mioglobina y oxihemoglobina (Carballo *et al.*, 2001, Lawrie, 1998, Swatland, 1986; 1999). En la región NIR el espectro promedio tiene bandas de absorción asociadas a los enlaces OH segundo sobretono (978 nm), CH segundo sobretono (1208 nm), OH primer sobretono (1456 nm), CH primer sobretono (1730 y 1766 nm), a la banda de absorción del agua (1932 nm) y al enlace CH combinado (2310 nm) (Murray, 1986). El gráfico que representa el segundo grado de diferenciación del espectro permite acentuar los picos de absorbancia del promedio de las muestras de carne.

Estas características espectrales concuerdan con las obtenidas por Cozzolino *et al.* (2000) en muestras enteras y molidas de diferentes músculos de cordero escaneadas en un equipo monocromador NIRSystem 6500 y con las obtenidas por el mismo autor el año 2002 en muestras de carne bovina, específicamente el músculo *Longissimus dorsi*, entero y molido.

4.1.3 Desarrollo de las calibraciones. Para cada uno de los componentes analizados se presentarán dos etapas. La primera sobre un universo de 120 muestras para humedad, extracto etéreo y cenizas totales, y de 118 muestras para la fracción proteína bruta. De acuerdo a lo indicado por Infrasoft International (1992) se utilizó el método de prueba y error ejecutando varias calibraciones, las que fueron evaluadas principalmente en base a parámetros estadísticos como el coeficiente de determinación de la validación cruzada (1-VR), el error estándar de la validación cruzada (SECV), el coeficiente de determinación de la calibración (R^2) y el error estándar de la calibración (SEC).

Al intentar comparar los datos obtenidos en este ensayo con otros estudios sobre calibraciones del método NIRS en carne de corderos lechales, no se encontraron referencias publicadas en Chile ni en el extranjero, basándose la discusión por lo tanto, principalmente, en la información existente sobre determinación de la composición química a través de la técnica NIRS en muestras de carne ovina (corderos y carneros), (Cozzolino *et al.*, 2000 y 2002; Bartholomew and Osuala, 1988;

Kruggel *et al.*, 1981) y de carne bovina, porcina y de ave (Delgado, 2003, Alomar *et al.*, 2003; Cozzolino and Murray, 2002; Cozzolino *et al.*, 2002; Solís *et al.*, 2001; Togersen *et al.*, 1999, Cozzolino *et al.*, 1996; De Pedro *et al.*, 1997, Czarnik-Matusiewicz and Korniewicz, 1998; Clark and Short, 1994; Mitsumoto *et al.*, 1991,; Lanza, 1983).

4.1.3.1 Humedad. A continuación se presentan y analizan los resultados logrados en las dos etapas de calibración para el componente humedad de la carne de cordero lechal.

4.1.3.1.1 Primera etapa de calibración para humedad. En el cuadro 6 se muestra, ordenados en orden decreciente, los diez mejores resultados estadísticos y las características de las ecuaciones que los originaron para las diferentes calibraciones con 120 muestras de carne de cordero lechal. Se utilizó la regresión multivariante de cuadrados mínimos parciales modificados (MPLS), sin y con corrección de dispersión, utilizando en este caso, el método de corrección espectral combinado de la varianza normal estándar (SNV) y el "Detrend" (D) siguiendo las recomendaciones de Infracsoft International (1992).

Cuadro 6. Resultado de las 10 mejores ecuaciones obtenidas para el componente humedad en carne de cordero lechal.

Ec.	1-VR	SECV (%)	R ²	SEC (%)	N	PROM (%)	d.e. (%)	<u>d.e</u> SECV	T.M
1	0,948	1,084	0,961	0,925	112	65,03	4,660	4,30	2.8.8 ^{NONE}
2	0,947	1,109	0,964	0,887	111	65,02	4,681	4,22	2.15.5 ^{NONE}
3	0,946	1,126	0,967	0,850	110	65,08	4,665	4,14	2.15.10 ^{NONE}
4	0,946	1,126	0,967	0,844	110	65,08	4,665	4,14	2.15.8 ^{NONE}
5	0,946	1,090	0,963	0,903	111	65,06	4,669	4,28	2.10.8 ^{SNV-D}
6	0,946	1,111	0,963	0,894	112	65,03	4,660	4,19	2.10.8 ^{NONE}
7	0,946	1,088	0,963	0,904	111	65,06	4,669	4,29	2.10.10 ^{SNV-D}
8	0,945	1,131	0,960	0,927	112	65,03	4,660	4,12	2.10.5 ^{NONE}
9	0,945	1,126	0,956	0,973	112	65,03	4,660	4,14	2.20.20 ^{NONE}
10	0,945	1,128	0,963	0,900	111	65,02	4,681	4,15	3.15.15 ^{NONE}

1-VR : Coeficiente de determinación de la validación cruzada

SECV: error estándar de la validación cruzada

R²: coeficiente de determinación de la calibración

SEC: error estándar de calibración.

N : número de muestras usadas en la calibración

Prom: composición química promedio de las muestras

d.e.: desviación estándar

TM: Tratamiento matemático

Los valores de 1-VR y R^2 son todos muy semejantes, no produciéndose ningún fenómeno de mejora o empeoramiento con el uso de corrección de dispersión y tratamiento matemático.

Los coeficientes de determinación de la validación cruzada (1-VR) son en todas las ecuaciones superiores a 0,94, y los coeficientes de determinación de la calibración mayores a 0,95, ambos considerados como de precisión buena (Williams, 2001). De acuerdo con Shenk y Westerhaus (1996), las calibraciones con valores de R^2 mayores a 0,9 poseen una excelente capacidad para predicciones cuantitativas, ya que existe una alta correlación entre las características químicas y físicas de las muestras analizadas y el espectro infrarrojo con su perfil de absorción.

La primera ecuación de calibración para el parámetro analítico humedad, muestra una buena precisión y confiabilidad, con coeficientes de determinación que indican que las ecuaciones explican el 94,8% de la variación en contenido de humedad del total de muestras utilizadas para la calibración; el 5,2% restante de variación puede ser atribuido a otros factores, tales como preparación de las muestras y análisis de referencia (Williams, 2001).

La aceptación de un modelo de calibración se clasifica de acuerdo a la relación entre el error en el análisis quimiométrico y la amplitud en la composición química (desviación estándar) de las muestras. Cuando el error excede un tercio de la desviación estándar de la población, la ecuación de regresión puede considerarse poco confiable (Kennedy et al., 1996, Cozzolino et al., 2000).

En el mismo cuadro se muestra el error estándar de la validación cruzada y de la calibración para cada una de las ecuaciones, con un valor de 10,84 g/kg base peso fresco y 9,25 g/kg base peso fresco, para la primera ecuación de calibración. En general todas las ecuaciones de calibración presentan un bajo error estándar de la validación cruzada (SECV) y de la calibración (SEC), no siendo significativamente diferentes entre si, por presentar diferencias entre ellas menores a un

20% (Delgado, 2003). La relación entre la desviación estándar (d.e.) de los valores de referencia y el error estándar de la validación cruzada (SECV) para las diez mejores ecuaciones de calibración, están siempre sobre 4,0, siendo de 4,3 para la primera mejor ecuación, todos valores superiores al límite mínimo para ser consideradas como aceptable, que es igual a 3 (Kennedy *et al.*, 1996). Williams (2001) indica que ecuaciones con cocientes entre 3,1 y 4,9 son ecuaciones clasificadas como aceptables y pueden ser aplicadas en "screening" o barrido.

En referencia a los tratamientos matemáticos utilizados para el cálculo de la ecuación de calibración, se observó que el 90% de las 10 ecuaciones seleccionadas, utilizan diferenciación o sustracción de segundo orden, lo que concuerda con Lanza (1983) y Mitsumoto *et al.* (1991), los cuales encontraron que el segundo orden de diferenciación había entregado mejores coeficientes de correlación (r) que el primer orden. Estos últimos autores indican que, de acuerdo a recomendaciones del manual de operación para el Compscan System del año 1985, es preferible utilizar un segundo orden de diferenciación cuando se está trabajando con productos no homogéneos.

Los altos valores de los coeficientes de determinación obtenidos en las ecuaciones de calibración de este ensayo, para el componente humedad, difieren con los obtenidos por Cozzolino *et al.* (2000), quienes trabajando en un equipo monocromador NirSystems 6500 con muestras de carne de cordero de diferentes músculos, en dos presentaciones (enteras y picadas en trozos y homogeneizadas) obtuvieron valores de coeficiente de determinación de la calibración (R^2) de 0,56 (SECV: 15,5 g/kg) para muestras enteras y 0,76 (SECV: 10,4 g/kg) para muestras picadas y homogeneizadas.

Cozzolino *et al.* (2002) determinando la composición química de muestras de carne bovina a través de la técnica NIRS, obtuvieron valores de coeficientes de determinación de la calibración con muestras enteras y picadas-homogeneizadas de 0,1 base peso fresco y 0,41 base peso fresco, respectivamente.

Alomar *et al.*(2003), al desarrollar calibraciones para predecir la composición química de carne bovina, obtuvieron para la ecuación de calibración de la fracción materia seca, un coeficiente de determinación de la calibración (R^2) de 0,77 y un error estándar de la validación cruzada (SECV) de 0,58%.

Cozzolino y Murray (2002) informan valores de R^2 de 0,98 y 0,99 para las ecuaciones de calibración utilizadas en la determinación de humedad en muestras de carne bovina y de pollo, picadas y homogeneizadas, respectivamente. Sin embargo, los autores informan que la ecuación de calibración desarrollada para el componente humedad en carne bovina presentaba una baja confiabilidad, con una relación SECV/DS mayor a 0,3.

Coefficientes de determinación similares fueron obtenidos por Kruggel *et al.*(1981), que trabajando en un equipo InfraAlyzer, con 6 filtros, y carne de cordero fresca y molida, lograron un coeficiente de determinación de 0,72. Los mismos autores trabajando con carne bovina emulsionada y el mismo espectrofotómetro, obtuvieron un coeficiente de determinación de la calibración de 0,88.

Lo contrario ocurre en el trabajo de Bartholomew y Osuala (1988), que utilizando un equipo InfraAlyzer con 19 filtros y muestras molidas de carne de carnero, encontraron coeficientes de correlación de 0,992 para la fracción humedad, es decir un coeficiente de determinación de la calibración (R^2) de 0,98, coeficiente que supera en 3 unidades porcentuales al encontrado en este ensayo.

Esos mismos resultados obtuvieron Czarnik-Matusiewicz y Korniewicz (1998), al realizar calibraciones en un equipo InfraAlyzer 260, con 19 filtros, con muestras de carne de cerdo molida, alcanzando un coeficiente de determinación (R^2) de 0,97 y un error estándar de la calibración (SEC) de 0,16%.

Cozzolino *et al.*(1996) obtuvieron coeficiente de determinación (R^2) de 0,99 y un error estándar de la calibración (SEC) de 2,4 g/kg, al

desarrollar modelos de calibración para determinar humedad en carne de pollo picada, utilizando un equipo Nirsystems 6500 en un equipo Infratec.

Solis *et al.* (2001) obtuvieron ecuaciones con una excelente precisión y confiabilidad en la determinación de humedad, con un coeficiente de determinación (R^2) de 0,98 y una relación desviación estándar/error estándar de la validación cruzada (DS/SECV) de 7,22, al desarrollar ecuaciones de calibración NIRS para predecir la composición química de muestras de lomo (*longissimus dorsi*) de cerdo ibérico, homogeneizadas mediante picadora de cuchilla horizontal.

Mitsumoto *et al.* (1991) evaluando la técnica NIRS en modo de reflectancia, transmitancia y fibra óptica como medio para determinar las características físicas y químicas de carne bovina, obtuvieron para la fracción humedad, coeficientes de determinación (y SEC) de 0,89 (1,41), 0,88 (1,44) y 0,80 (1,89) para el modo reflectancia, transmitancia y fibra óptica, respectivamente.

Iwamoto *et al.* (1981) informaron coeficientes de determinación (R^2) de 0,94 para el componente humedad, en carne de cerdo, usando reflectancia en el infrarrojo cercano.

Como se puede observar para la determinación del componente humedad, el porcentaje de variabilidad explicada en las concentraciones modeladas por las ecuaciones de regresión, expresado por el valor del coeficiente de determinación, es muy variable en los diferentes trabajos publicados. Existiendo muy buenos resultados, con valores superiores a 0,9 y resultados muy pobres, con valores de 0,1 y 0,4.

De acuerdo con Cozzolino *et al.* (2002), los malos resultados en los parámetros estadísticos de la calibración del componente humedad, podrían atribuirse a factores críticos como temperatura del horno de secado, tiempo de secado, homogenización de la muestra, vaporización de sustancias diferentes al agua y algunas reacciones químicas. También la falta de control en el almacenamiento de las muestras sin examinar

temperatura y humedad. Otro factor importante es pesar las muestras que irán al análisis tradicional inmediatamente después de ser escaneadas, para evitar pérdidas por evaporación.

De acuerdo con Murray (1993), los buenos resultados obtenidos con el método NIRS en la predicción de humedad, se deberían a la intensidad con que absorbe el agua en la región NIR del espectro. Esto lo reafirma Infrasoftware International (1992), indicando que gracias a la intensidad de las bandas O-H que involucran una amplia región del espectro NIR, es factible medir humedad con alto grado de exactitud.

En el gráfico 6 se muestra la relación entre los valores químicos de referencia entregados por el laboratorio y los valores predichos por la mejor ecuación de predicción NIR para humedad.

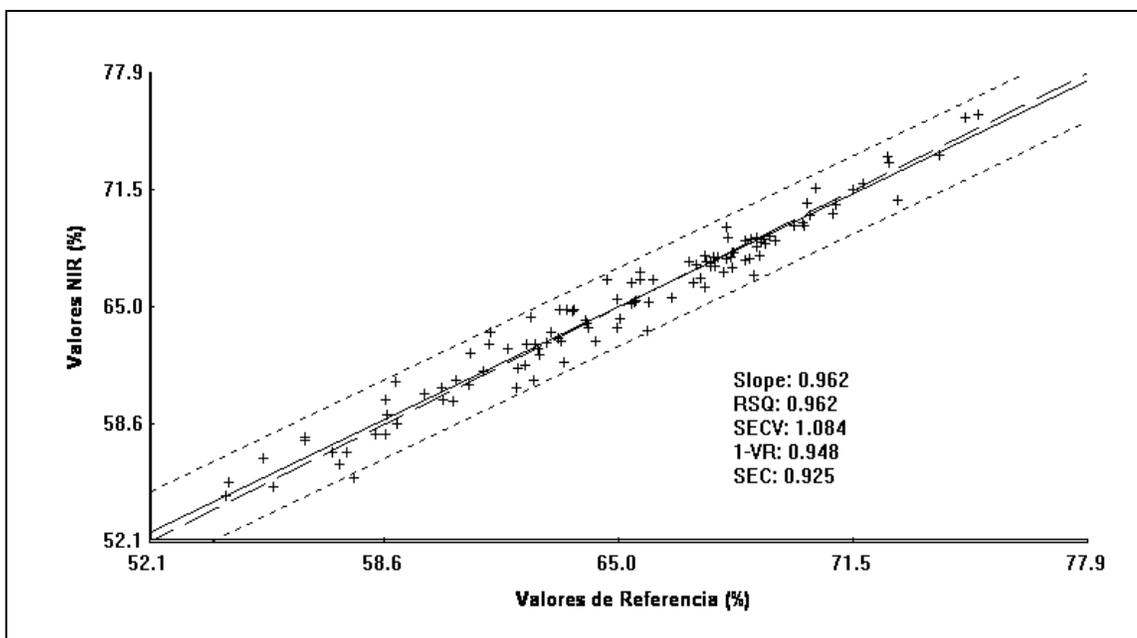


Gráfico 6. Relación entre los valores de referencia y su predicción mediante NIRS para la fracción humedad en carne de cordero lechal

Se observa que la distribución de las muestras alrededor de la línea de regresión, dada por la mejor ecuación, es relativamente homogénea presentándose una igual cantidad de puntos bajo y sobre esta línea. Esto es reflejado en el alto coeficiente de determinación para este

componente. La ubicación de los puntos cerca de la línea de paridad reflejan la excelente habilidad predictiva para este componente obtenida en este trabajo.

4.1.3.1.2 Segunda etapa de calibración y validación externa. Las características composicionales para el componente humedad de las 90 muestras de carne de cordero lechal seleccionadas por el programa WINISI se muestran en el cuadro 7, expresadas base peso fresco, que es la misma forma como las muestras fueron escaneadas por el equipo NIRS.

Cuadro 7. Estadísticas básicas de la humedad de las muestras de carne de cordero lechal utilizadas para la calibración. (% del peso fresco)

Componente	N° de muestras	Rango	Promedio ± d.e.
Humedad (%)	90	54,18 - 74,90	64,29 ± 5,10

En el cuadro 8 se indican los parámetros estadísticos obtenidos en la calibración y validación externa con el set de 90 y 30 muestras, respectivamente, utilizando el método de regresión de los cuadrados mínimos parciales modificados (MPLS), con el tratamiento matemático 2.8.8.1 sin método de corrección espectral, correspondiente a la ecuación que originó los mejores resultados estadísticos en la primera etapa y aquellos obtenidos con el set de 90 muestras y la mejor ecuación de calibración después de haber probado varios tratamientos matemáticos. Además se muestran los resultados de predicción al validar externamente estas dos ecuaciones.

Cuadro 8. Estadística de la validación cruzada y validación externa de la ecuación seleccionada para predecir contenido de humedad.

T.M.	Calibración n=90					Validación n=30		
	1-VR	SECV (%)	R ²	SEC (%)	<u>d.e</u> SECV	SEP (%)	R ² P	Sesgo
2.8.8.1 ^{none}	0,917	1,448	0,946	1,174	3,52	0,897	0,912	0,174
2.15.8.1 ^{SNV-D}	0,953	1,117	0,965	0,953	4,57	0,975	0,894	0,133

T.M. : Tratamiento matemático

1-VR : Coeficiente de determinación de la validación cruzada

SECV : error estándar de la validación cruzada

R² : coeficiente de determinación de la calibración

SEC : error estándar de calibración.

SEP : error estándar de predicción

R²P : coeficiente de determinación de la predicción

None : sin método de corrección espectral

SNV-D : Varianza normal estándar + "Detrend"

Se puede observar, que al disminuir el número de muestras de 120 a 90, los valores del coeficiente de determinación de la validación cruzada y de la calibración para el tratamiento matemático utilizado en la primera etapa, son inferiores, con un valor de 0,917 y 0,946, respectivamente, comparado con el valor de 1-VR igual a 0,948 y R^2 de 0,961 obtenido en la primera etapa. Sin embargo, con el tratamiento matemático 2.15.8.1 con método de corrección espectral (SND-D), los coeficientes de determinación son muy similares a los de la primera etapa con valores de 0,953 para la validación cruzada y 0,965 para la calibración. También se observa una disminución en la relación desviación estándar (d.e.) de los valores de referencia y el error estándar de la validación cruzada (SECV) para la ecuación con tratamiento matemático 2.8.8.1^{none}, con un valor de 3,52, en comparación al valor de 4,66 obtenido con las 120 muestras. Para la ecuación con tratamiento matemático 2.15.8.1^{snv-d}, la relación es muy semejante a la obtenida en la primera etapa, con un valor de 4,56. Ambas relaciones son superiores al límite que Murray (1993) y Kennedy *et al.*, (1996) indican como adecuado para considerar que una ecuación tiene un alto poder de predicción.

Los coeficientes de determinación de la predicción (R^2P) para ambas ecuaciones son muy similares, con valores de 0,912 para la ecuación con tratamiento matemático 2.8.8.1^{None}, y de 0,894 para aquella con tratamiento matemático 2.15.8.1^{snv-d}. El valor de coeficiente de determinación de predicción utilizando el modelo de regresión con tratamiento matemático 2.8.8.1^{none} fue superior al obtenido con la ecuación con tratamiento matemático 2.15.8.1^{snv-d}. Sin embargo, en ninguno de los casos el valor de R^2P superó al coeficiente de determinación de la validación cruzada (1-VR).

Llama la atención que aunque el modelo de regresión que utilizó el tratamiento matemático 2.8.8.1^{None} tiene un menor coeficiente de determinación de la validación cruzada (1-VR) (0,917) en comparación al otro modelo indicado, con un valor de 0,953, el coeficiente de determinación de la predicción para este modelo es mayor (0,912 vs 0,894). Esto se explicaría principalmente por un mayor ajuste de la

población de muestras de validación externa al modelo de regresión generado con el tratamiento matemático 2.8.8.1^{None}.

Con respecto al sesgo, en ambas ecuaciones de predicción éste es positivo; indicando que los valores de laboratorio son en promedio mayores a los valores predichos por NIRS y los puntos están bajo la diagonal en los gráficos 7 y 8. Además ambos valores no exceden el 60% del error estándar de la validación cruzada, el que es considerado el límite para el sesgo, como evaluación de las ecuaciones en la validación externa (Shenk and Westerhaus, 1996).

En los gráficos 7 y 8 se muestra el ajuste que tuvieron las muestras de validación externa a las ecuaciones MPLS, 2.8.8.1^{none} y 2.15.8.1^{snv-d}, respectivamente. Se observan comportamientos similares en ambos gráficos, con un mejor ajuste de las muestras de validación externa, al modelo con tratamiento matemático 2.8.8.1^{None}.

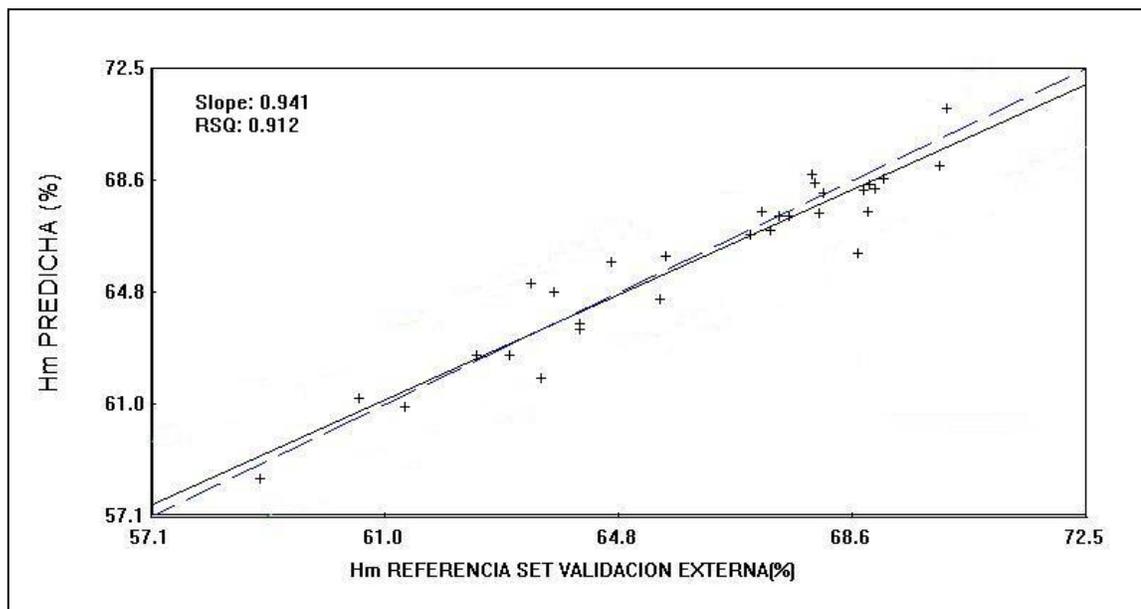


Gráfico 7. Predicción del grupo de muestras de validación externa para el componente humedad, utilizando la ecuación con tratamiento matemático 2.8.8.1^{None}.

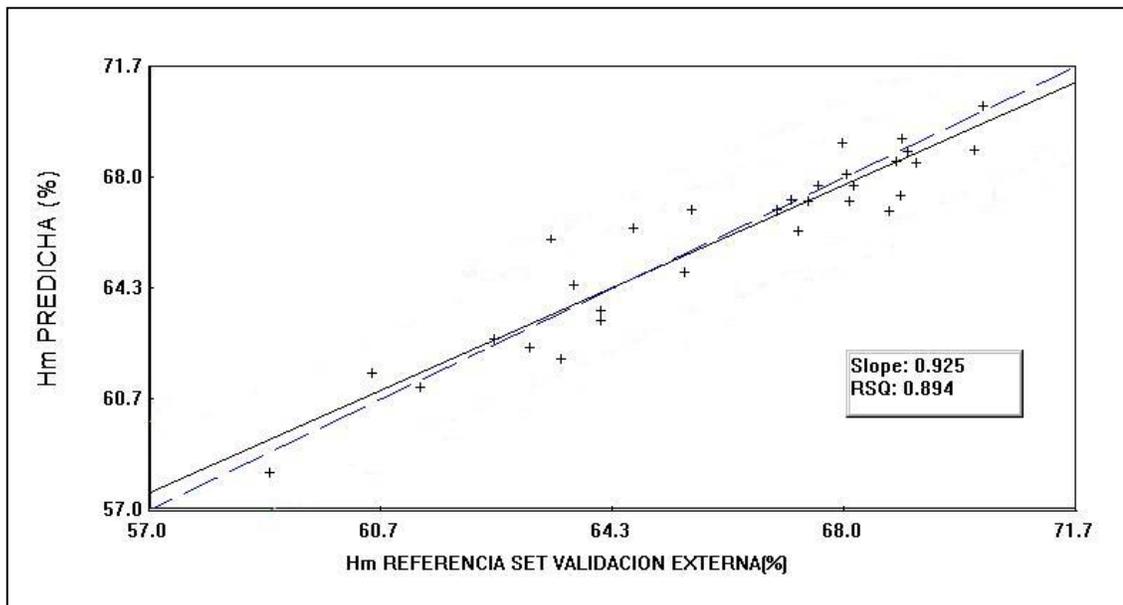


Gráfico 8. Predicción del grupo de muestras de validación externa para el componente humedad, utilizando la ecuación con tratamiento matemático 2.15.8.1^{snv-d}.

4.1.3.2 Proteína bruta.

4.1.3.2.1 Primera etapa de calibración de proteína bruta. A continuación se presentan los resultados obtenidos en la primera etapa de calibración para el componente proteína bruta en carne de cordero lechal.

En el cuadro 9 se presentan, ordenados en orden decreciente, los diez mejores resultados estadísticos y las características de las ecuaciones que los originaron. Para las calibraciones se empleó el método de regresión de los cuadrados mínimos parciales modificados (MPLS), sin y con corrección de dispersión, utilizando en este caso, el método de corrección espectral combinado de la varianza normal estándar (SNV) y el "Detrend" según lo que aconseja Infracsoft International (1992).

Cuadro 9. Resultado de las 10 mejores ecuaciones obtenidas para proteína bruta

Ec.	1-VR	SECV (%)	R ²	SEC (%)	N	PROM (%)	d.e. (%)	d.e./SECV (RPD)	T.M
1	0,807	0,492	0,869	0,407	113	18,391	1,124	2,28	2.10.8 ^{SNV-D}
2	0,806	0,494	0,884	0,383	112	18,399	1,126	2,28	2.8.8 ^{SNV-D}
3	0,804	0,496	0,871	0,403	113	18,391	1,124	2,27	2.10.5 ^{SNV-D}
4	0,803	0,498	0,865	0,412	113	18,391	1,124	2,26	2.10.10 ^{SNV-D}
5	0,786	0,508	0,897	0,354	113	18,366	1,101	2,17	2.15.10 ^{SNV-D}
6	0,786	0,519	0,894	0,367	113	18,391	1,124	2,17	2.15.10 ^{NONE}
7	0,785	0,520	0,900	0,355	113	18,391	1,124	2,16	2.15.5 ^{NONE}
8	0,781	0,525	0,897	0,361	113	18,391	1,124	2,14	2.15.8 ^{NONE}
9	0,779	0,525	0,883	0,384	114	18,388	1,120	2,13	2.15.15 ^{NONE}
10	0,776	0,528	0,901	0,353	114	18,388	1,120	2,12	1.8.8 ^{NONE}

1-VR : Coeficiente de determinación de la validación cruzada

SECV : error estándar de la validación cruzada

R² : coeficiente de determinación de la calibración

SEC : error estándar de calibración.

N : número de muestras usadas en la calibración

Prom. : composición química promedio de las muestras

d.e. : desviación estándar

Los valores de coeficientes de determinación de la validación cruzada (1-VR) de las diez mejores ecuaciones de calibración, presentan valores superiores a 0,77, con un valor máximo de 0,807 para el mejor modelo de regresión con tratamiento matemático 2.10.8.1^{SNV-D}, de acuerdo a los parámetros estadísticos de selección. El coeficiente de determinación de la calibración (R²) para esta ecuación fue 0,87, es decir que el 87% de la variación de este componente químico es explicado por esta ecuación y con ello revela una estrecha relación del espectro con su composición proteica, el cual representa una buena información cuantitativa (Shenk y Westerhaus, 1996).

Los valores de error estándar para la validación cruzada y la calibración para las diez ecuaciones varían de 0,492 a 0,528% para SECV y de 0,407 a 0,353% para SEC. De acuerdo con Delgado (2003), estos rangos de error no son significativamente diferentes, ya que se considera que los valores de SEC o SECV de dos ecuaciones, son significativamente diferentes, cuando se diferencian en más del 20%.

El bajo valor de RPD (d.e./SECV=2,28) en las mejores ecuaciones, las clasifica como muy pobres y no se recomienda su aplicación como ecuaciones de predicción (William, 2001), aunque expliquen el 87% de la

variación en la composición en dicho parámetro analítico. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Alomar *et al.* (2003), en carne bovina, donde se obtuvo un buen coeficiente de determinación de la validación cruzada ($1-VR=0,82$), pero el error estándar de la validación cruzada (SECV) fue superior al tercio de la desviación estándar ($SECV/DS=0,48$).

Las nueve mejores calibraciones para proteína fueron obtenidas utilizando un segundo orden de diferenciación, que fue el orden de diferenciación utilizado por Alomar *et al.*, (2003), Delgado (2003), Cozzolino *et al.* (2002) y Lanza (1983) para obtener las mejores ecuaciones de calibración para proteína en carne. Las cinco primeras ecuaciones utilizan un método de corrección de dispersión espectral.

Los resultados estadísticos de las mejores ecuaciones de calibración para proteína obtenidos en este ensayo son levemente mejores a los obtenidos por Cozzolino *et al.* (2000) utilizando muestras compuestas de seis músculos de carne de cordero (*Longissimus dorsi*, *Infraspinatus*, *Supraspinatus*, *Semimembranosus*, *Semitendinosus* y *Rectus femoris*), picados en trozos, con valores de 0,788 para $1-VR$ y 0,83 para R^2 , con valores de SECV y SEC de 5,5 g/kg y 5,0 g/kg, respectivamente. Sin embargo, cuando estos mismos autores realizaron calibraciones para cada músculo independiente, los resultados estadísticos para la proteína fueron pocos satisfactorios, con un rango de valores de 0,039 a 0,457 para $1-VR$, 7,84 a 10,14 g/kg para SECV, 0,196 a 0,84 para R^2 y 3,78 a 7,95 g/kg para SEC, sugiriendo estos autores que el modelo de calibración se afecta con el tipo de músculo, explicado esto por la diferente orientación que tienen las fibras musculares, las que juegan un rol importante en la obtención de una buena correspondencia entre composición química y los valores de predicción del instrumento.

Bartholomew y Osuala (1988) utilizando un equipo InfraAlyzer con 19 filtros y muestras molidas de carne de carnero, obtuvieron un valor de coeficiente de determinación de la calibración (R^2) de 0,83, inferior al encontrado en este ensayo. Tampoco fueron satisfactorios los valores de coeficiente de determinación (R^2) obtenidos para proteína por

Kruggel *et al.* (1981), quienes utilizando un equipo InfraAlyzer de 6 filtros fijos y muestras molidas de carne de cordero, reportaron valores muy inferiores a los obtenidos en este ensayo (R^2 de entre 0,52 y 0,59), lo cual de acuerdo con Shenk y Westerhaus (1996) sólo permitiría hacer una separación entre muestras de alto, medio y bajo contenido de este componente analítico.

Cozzolino *et al.* (2002) obtuvieron un coeficiente de determinación de la calibración (R^2) de 0,71 en la mejor ecuación de calibración para proteína en carne bovina, considerado bueno, pero la confiabilidad predictiva de la ecuación era baja por el alto valor de SECV (20,5 g/kg base peso fresco).

Mitsumoto *et al.* (1991) evaluando NIRS en modo de reflectancia, transmitancia y fibra óptica como medio para determinar contenido de proteína en carne bovina, obtienen coeficientes de determinación y SEC de 0,82 (0,58), 0,73 (0,71) y 0,68 (0,78) para el modo reflectancia, transmitancia y fibra óptica, respectivamente.

Cozzolino *et al.* (1996) obtuvieron altos coeficientes de determinación en calibraciones para proteína en carne de pollo picada y homogeneizada, superiores a 0,9 y bajos valores de error estándar en la validación cruzada.

En el grafico 9 se muestra la relación entre los valores químicos de referencia entregados por el laboratorio y los valores predichos por la mejor ecuación de predicción en NIRS para proteína bruta.

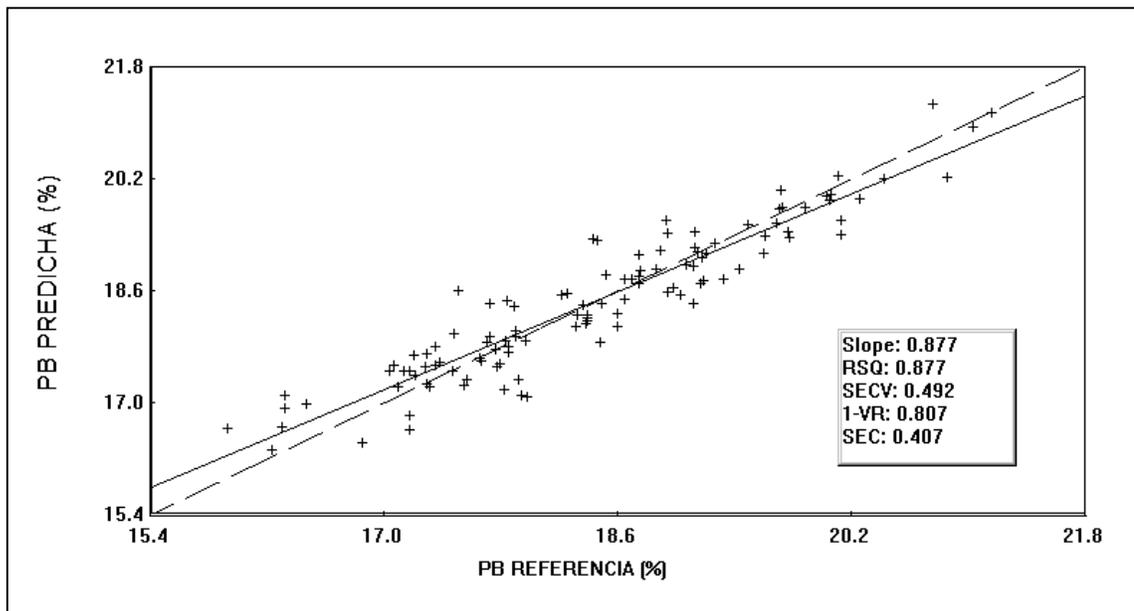


Gráfico 9. Relación entre los valores de referencia y su predicción mediante NIRS para el componente proteína bruta.

El diagrama de dispersión del gráfico 9 muestra una línea de regresión con pendiente menor a 45° , esto indicaría una tendencia de la técnica NIRS a subestimar la composición proteica a partir de valores mayores a la media y a sobrestimarlos cuando se encuentran bajo la media. De acuerdo con Windham *et al.* (1989), esto se debe a una pérdida de exactitud producida cuando los términos de la ecuación no permiten realizar estimaciones confiables de los valores de referencia, o puede deberse a que los datos de referencia son inexactos.

En general la capacidad predictiva de las ecuaciones generadas a través de la técnica NIRS para la fracción proteína es menor que para los componentes humedad y grasa, en carne y productos cárnicos (Alomar *et al.*, 2003; Cozzolino y Murray, 2002; Kruggel *et al.*, 1981; Lanza, 1983; Mitsumoto *et al.*, 1991). Esto puede deberse, según Solís *et al.* (2001), en parte, a los mayores errores del método de referencia de proteína bruta. De hecho no conviene olvidar que la técnica NIRS y el método de referencia miden características diferentes, así mientras el análisis Kjeldahl mide N orgánico total, el método NIRS mide la absorción debida a enlaces o bandas proteicas (Garrido *et al.*, 1996), por otra parte, la PB es el resultado de multiplicar el N total por un

factor de conversión que es correspondiente al contenido medio en N de una composición media de aminoácidos (Osborne *et al.*, 1993).

4.1.3.2.2. Segunda etapa de calibración y validación externa. Las características composicionales para el componente proteína bruta de las 88 muestras de carne de cordero lechal seleccionadas por el programa WINISI se muestran en el cuadro 10, expresadas base peso fresco, que es la misma forma como las muestras fueron escaneadas por el equipo NIRS.

Cuadro 10. Estadísticas básicas de la composición química de las muestras de carne de cordero lechal utilizadas para la calibración (% del peso fresco).

Componente	N° de muestras	Rango	Promedio ± d.e.
Proteína Bruta (%)	88	21,11 - 15,88	18,36 ± 1,15

En el cuadro 11 se indican los valores estadísticos obtenidos en la calibración y validación externa con el set de 88 muestras y 30 muestras respectivamente, utilizando el método de regresión de los cuadrados mínimos parciales con el tratamiento matemático 2.10.8.1 con el método de corrección espectral de la varianza normal estándar (SNV) más "Detrend" (d), correspondiente a la ecuación que originó los mejores resultados estadísticos en la primera etapa y aquellos obtenidos con el mejor tratamiento matemático después de haber realizado diferentes combinaciones. Además se muestran los resultados de predicción al validar externamente este grupo de muestras, con las dos ecuaciones.

Cuadro 11. Estadística de la validación cruzada y validación externa de la ecuación seleccionada para predecir contenido de proteína.

Calibración n=88						Validación n=30		
T.M.	1-VR	SECV (%)	R ²	SEC (%)	$\frac{d.e}{SECV}$	SEP (%)	R ² P	Sesgo
2.10.8.1 ^{SNV-D}	0,76	0,57	0,86	0,43	2,0	0,672	0,744	0,108
2.8.4.1 ^{SNV-D}	0,78	0,54	0,87	0,41	2,1	0,687	0,728	0,084

1-VR : Coeficiente de determinación de la validación cruzada

SECV: error estándar de la validación cruzada

R²: coeficiente de determinación de la calibración

SEC: error estándar de calibración.

SEP: error estándar de predicción

R²P: coeficiente de determinación de la predicción

Se puede observar que al disminuir el número de muestras utilizadas en la calibración con el mismo tratamiento matemático, los índices estadísticos se modifican, disminuyendo el coeficiente de determinación de la validación cruzada (1-VR) de 0,807 a 0,76 y aumentando los errores estándar de la validación cruzada (SECV) y de la calibración (SEC) de 0,49 a 0,57 y de 0,41 a 0,43, respectivamente. Sin embargo, el valor de R^2 es muy similar al obtenido en la primera etapa. Lo mismo sucede cuando se hace la calibración utilizando el tratamiento matemático 2.8.4.1^{SNV-d}.

El mayor error estándar de la validación cruzada (SECV) hace que la relación entre la desviación estándar y SECV sea menor a la lograda en la primera etapa, siendo de todas formas menor a 3 que es lo recomendando por Kennedy *et al.*(1996) y Cozzolino *et al.*(2000) como índice adecuado para considerar una ecuación confiable en la predicción.

Los coeficientes de determinación de la predicción (R^2P) son menores a los valores de 1-VR y R^2 de la calibración, lo que en este caso se explicaría por la presencia de muestras lejanas a la línea de regresión dentro del grupo de validación externa, lo que reduce su valor de predicción (gráfico 10 y 11).

Los valores de error estándar de la predicción son mayores a los errores estándares de la validación cruzada para las dos ecuaciones (SECV). De acuerdo con Delgado (2003), para que una ecuación de predicción se considere válida, es necesario que el error estándar de predicción (SEP) no se diferencie del error estándar de validación cruzada (SECV) en más de un 20%, en este caso la diferencia es de un 18 y 14% para la ecuación con tratamiento matemático 2.10.8.1^{SNV-d} y 2.8.4.1^{SNV-d}, respectivamente.

Con respecto al sesgo, se observa que éste es positivo para ambas ecuaciones, indicando que los valores de laboratorio son en promedio mayores a los valores predichos por NIRS y los puntos están bajo la diagonal de los gráficos 10 y 11. Además, ambos valores no exceden el

60% del error estándar de la validación cruzada, que es considerado el límite para el sesgo, como evaluación de las ecuaciones en la validación externa (Shenk y Westerhaus, 1996).

En los gráficos 10 y 11 se muestra el ajuste que tuvieron las muestras de validación externa a las ecuaciones MPLS, 2.10.8.1^{snv-d} y 2.8.4.1^{snv-d}, respectivamente.

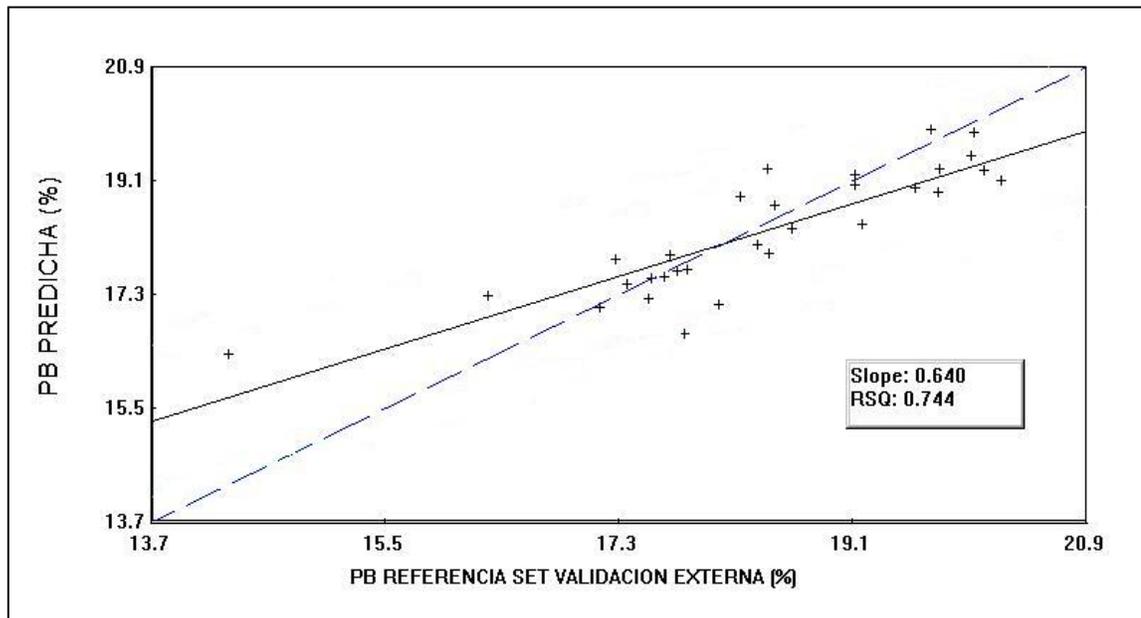


Gráfico 10. Regresión de la predicción del grupo de muestras de validación externa para el componente proteína bruta (%), utilizando la ecuación con tratamiento matemático 2.10.8.1^{snv-d}.

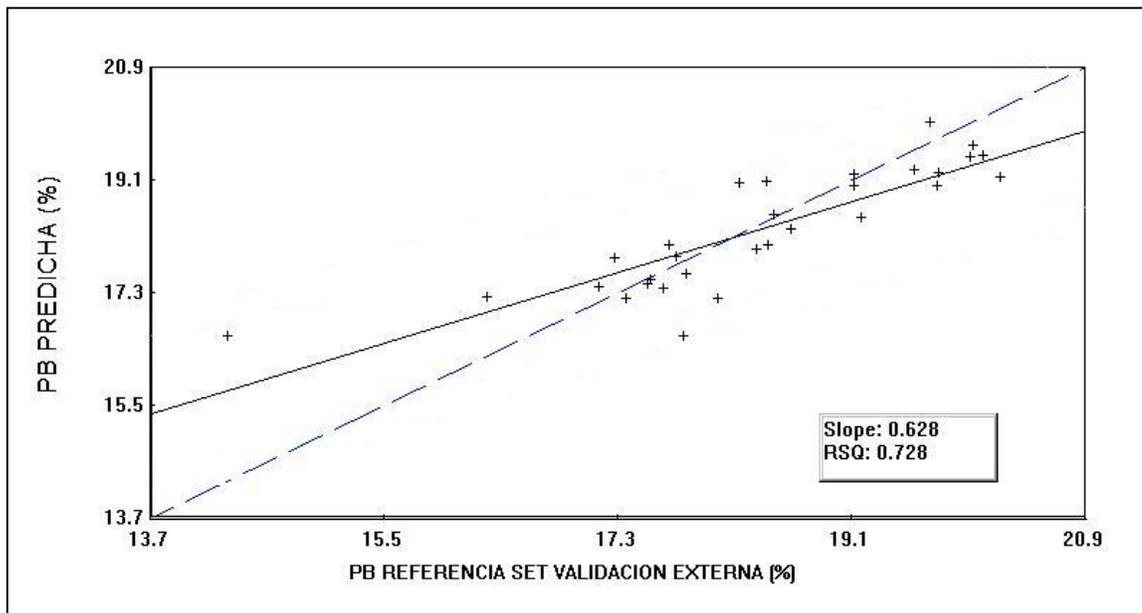


Gráfico 11. Regresión de la predicción del grupo de muestras de validación externa para el componente proteína bruta, utilizando la ecuación con tratamiento matemático 2.8.4.1^{SNV-D}.

Se observan ajustes similares en ambos gráficos. Se muestra una diferencia entre la línea de tendencia y la línea de 45°, quedando una mayoría de puntos bajo esta línea, lo que indicaría una subestimación del contenido de proteína bruta en las muestras por el método NIRS.

4.1.3.3 Grasa.

4.1.3.3.1 Primera etapa de calibración para grasa. A continuación se presentan los resultados obtenidos en la primera etapa de calibración para el componente grasa en carne de cordero lechal.

En el cuadro 12 se presentan, ordenados en orden decreciente, los diez mejores resultados estadísticos y las características de las ecuaciones que los originaron, con las calibraciones realizadas para esta fracción. Al igual que en los componentes anteriores, se utilizó el método de los cuadrados mínimos parciales modificados, sin y con métodos de corrección de dispersión, utilizando en este caso la combinación de la varianza normal estándar (SNV) y el "Detrend" de acuerdo a recomendaciones sugeridas por Infrasoft International (1992).

Cuadro 12. Resultado de las 10 mejores ecuaciones de calibración obtenidas para el componente grasa en carne de cordero lechal.

Ec.	1-VR	SECV (%)	R ²	SEC (%)	N	PROM (%)	d.e. (%)	d.e./SECV	T.M
1	0,985	0,607	0,990	0,502	112	14,639	4,921	8,11	2.8.8 ^{SNV-D}
2	0,985	0,616	0,989	0,522	111	14,669	4,933	8,01	2.20.10 ^{SNV-D}
3	0,985	0,619	0,988	0,531	112	14,639	4,921	7,95	2.15.15 ^{SNV-D}
4	0,985	0,621	0,989	0,527	111	14,669	4,933	7,94	2.20.15 ^{SNV-D}
5	0,985	0,622	0,989	0,509	110	14,598	4,819	7,75	1.20.20 ^{SNV-D}
6	0,984	0,625	0,988	0,532	111	14,669	4,933	7,89	2.20.20 ^{SNV-D}
7	0,984	0,629	0,989	0,510	112	14,639	4,921	7,82	2.10.8 ^{SNV-D}
8	0,984	0,632	0,990	0,497	113	14,705	4,949	7,83	2.4.4 ^{SNV-D}
9	0,984	0,632	0,989	0,515	112	14,639	4,921	7,79	2.10.10 ^{SNV-D}
10	0,984	0,635	0,988	0,538	114	14,715	4,931	7,77	1.20.20 ^{NONE}

1-VR : Coeficiente de determinación de la validación cruzada

SECV : error estándar de la validación cruzada

R² : coeficiente de determinación de la calibración

SEC : error estándar de calibración.

N : número de muestras usadas en la calibración

Prom. : composición química promedio de las muestras

d.e. : desviación estándar

En el cuadro 12 se muestran los parámetros estadísticos de las 10 mejores ecuaciones ordenadas de acuerdo a su mayor 1-VR y menor SECV. Los resultados obtenidos en las calibraciones hechas para determinar el componente grasa de la carne de cordero lechal, muestran excelentes resultados, esto es reflejado en los altos coeficientes de determinación de la validación cruzada y de la calibración, que superan el 0,98, mostrando una estrecha relación entre las variables químicas y las espectrales. De acuerdo con Shenk and Westerhaus (1996), ecuaciones que presentan coeficientes de determinación mayores a 0,9 producen una excelente predicción cuantitativa.

Las ecuaciones presentan bajos errores estándares de la validación cruzada (SECV), entre 0,607 y 0,635% siendo este estadístico el que mejor estima la capacidad de predicción de la ecuación.

De acuerdo con Delgado (2003), no existirían diferencias significativas entre las ecuaciones, ya que entre los mejores y peores valores de SECV no existen diferencias mayores a un 20%.

Si se relaciona esta información con la desviación estándar de los datos de referencia, se puede indicar que los modelos de calibración para grasa son considerados buenos, pudiendo ser aplicados en procesos de control (Williams, 2001), ya que superan en más de 4 puntos el índice límite de 3 (Kennedy *et al.*,1996; Cozzolino *et al.*,2000), con un cociente (d.e/SECV) de 8,11 para el mejor modelo de calibración y de 7,77 para la ecuación menos aceptable estadísticamente.

Todos los tratamientos seleccionados incluyen algún grado de diferenciación, utilizando en su mayoría un segundo orden de sustracción, el que entrega los mejores resultados estadísticos en la calibración, lo que concuerda con lo obtenido por Alomar *et al.* (2003) y Cozzolino *et al.* (2002), en calibraciones para grasa en carne bovina.

En el 90 por ciento de las mejores ecuaciones se utilizó el método combinado de corrección espectral, varianza normal estándar (SNV) más "Detrend"(d).

Bartholomew y Osuala (1988), en su trabajo utilizando un equipo InfraAlyzer con 19 filtros para predecir el análisis proximal de carne de carnero, obtuvieron un coeficiente de determinación de la calibración de 0,99, valor igual al obtenido en este estudio. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Lanza (1983) con un R^2 de 0,99, en carne bovina y de cerdo. En cambio, Kruggel *et al.*(1981), utilizando el mismo equipo, pero con sólo 6 filtros, en muestras de carne de cordero molidas, obtuvieron ecuaciones de calibración con valores de R^2 de 0,69 a 0,72, bastante inferiores a los valores obtenidos en este ensayo.

Cozzolino *et al.* (2002), utilizando un equipo monocromador NIRSystems 6500, en el desarrollo de ecuaciones de calibración para determinar grasa en carne bovina, obtuvieron coeficientes de determinación de la calibración (R^2) de 0,92 y 0,89 y un SECV de 46,9 y 43,4, en g/kg base peso fresco, en carne escaneada entera y picada, respectivamente. Aunque los estadísticos de calibración fueron buenos, la confiabilidad de predicción de las ecuaciones no lo fue, por los

altos errores estándares de la validación cruzada, respecto a la desviación estándar de las muestras de referencia, lo que es diferente a lo que se observa en este ensayo.

En otros estudios, realizados en carne bovina, por Alomar *et al.* (2003) encontraron un R^2 de la calibración para grasa de 0,82, indicando una buena relación entre la composición y el espectro, con buena información cuantitativa, pero el alto SECV de 0,44, los llevó a concluir que la ecuación sólo ayudaría a estimar contenidos aproximados, no presentando una buena precisión en la predicción de grasa en carne bovina.

En el gráfico 12 se muestra la relación entre los valores químicos de referencia entregados por el laboratorio y los valores predichos por la mejor ecuación NIRS para grasa.

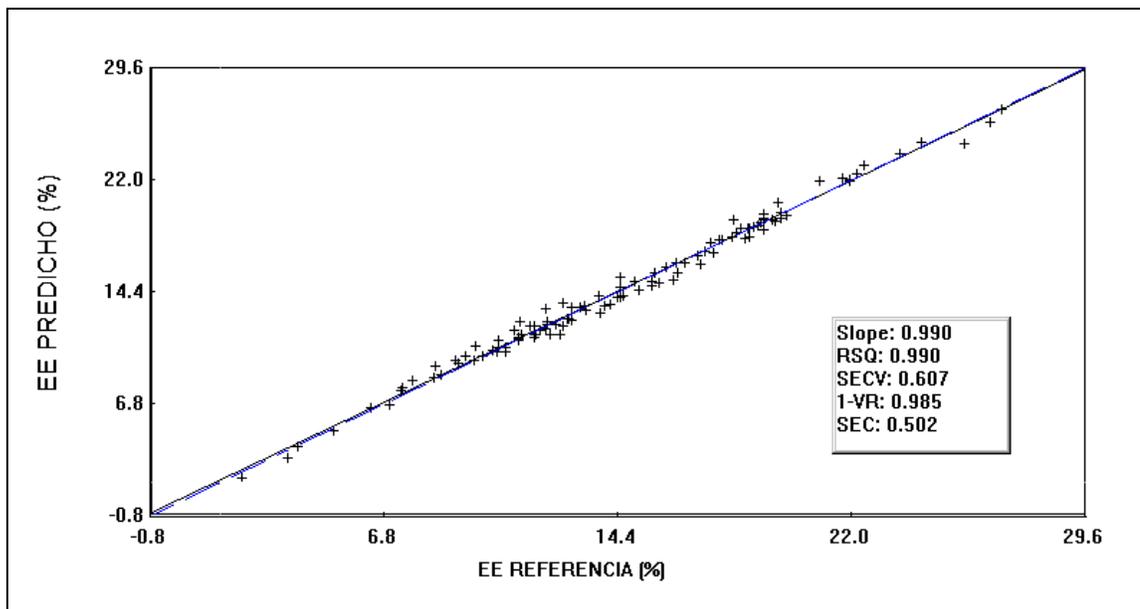


Gráfico 12. Relación entre los valores de referencia y su predicción mediante NIRS para la variable grasa

En el gráfico 12 se muestra la distribución de las muestras alrededor de la línea de regresión, dada por la mejor ecuación MPLS 2.8.8.1^{SNV-D}. Se observa la homogeneidad en la distribución de los puntos y la cercanía a la línea de paridad, lo que está reflejado en el

alto coeficiente de determinación de la calibración (R^2). Esto sugiere que el espectro cambia de acuerdo a la composición y que con un apropiado manejo quimiométrico, se puede predecir el contenido de grasa.

4.1.3.3.2 Segunda etapa de calibración y validación externa. Las características composicionales para el componente extracto etéreo de las 90 muestras de carne de cordero lechal seleccionadas por el programa WINISI se muestran en el cuadro 13, expresadas base peso fresco, que es la misma forma como las muestras fueron escaneadas por el equipo NIRS.

Cuadro 13. Estadísticas básicas de la composición química de las muestras de carne de cordero lechal utilizadas para la calibración. (% del peso fresco).

Componente	N° de muestras	Rango	Promedio \pm d.e.
Extracto Etéreo (%)	90	2,22 - 26,99	15,26 \pm 5,38

En el cuadro 14 se indican los valores estadísticos obtenidos en la calibración y validación externa con el set de 90 muestras y 30 muestras respectivamente, utilizando el método de regresión de los cuadrados mínimos parciales con el tratamiento matemático 2.8.8.1 con el método de corrección espectral de la varianza normal estándar (SNV) más "Detrend" (d), correspondiente a la ecuación que originó los mejores resultados estadísticos en la primera etapa y aquellos obtenidos con el mejor tratamiento matemático después de haber realizado diferentes combinaciones. Además se muestran los resultados de predicción al validar externamente este grupo de muestras, con las dos ecuaciones.

Cuadro 14. Estadística de la validación cruzada y validación externa de la ecuación seleccionada para predecir contenido de grasa.

Calibración n=90						validación n=30		
T.M.	1-VR	SECV (%)	R ²	SEC (%)	$\frac{d.e}{SECV}$	SEP (%)	R ² P	Sesgo
2.8.8.1 ^{SNV-D}	0,981	0,728	0,991	0,506	7,4	0,796	0,957	-0,223
1.8.4.1 ^{SNV-D}	0,988	0,582	0,994	0,426	9,2	0,882	0,948	-0,279

1-VR : Coeficiente de determinación de la validación cruzada

SECV: error estándar de la validación cruzada

R²: coeficiente de determinación de la calibración

SEC: error estándar de calibración.

SEP: error estándar de predicción

R²P: coeficiente de determinación de la predicción

En el cuadro 14 se observa que al disminuir el número de muestras utilizadas en la calibración empleando el mismo tratamiento matemático de la primera etapa, los coeficientes de determinación de la validación cruzada (1-VR) son muy similares al obtenido en la mejor ecuación de la primera etapa (0,98), aumentando el error estándar de la validación cruzada (SECV) en un 19% en la ecuación con tratamiento matemático 2.8.8.1^{SNV-d} y disminuyendo un 4% en la ecuación con tratamiento matemático 1.8.4.1^{SNV-d}. El valor de R² fue similar al obtenido en la primera etapa, en ambas ecuaciones.

Ambos errores estándares de la validación cruzada (SECV) para las ecuaciones generadas en la segunda etapa hacen que la relación entre la desviación estándar y SECV sea mayor a 3, que es lo recomendando por Kennedy *et al.*(1996) y Cozzolino *et al.*(2000) como cociente adecuado para considerar una ecuación confiable en la predicción.

Los coeficientes de determinación de la predicción (R²P) son menores a los valores de 1-VR y R² de la calibración, lo que se ve reflejado en los gráficos 13 y 14, con una menor cercanía de los puntos del grupo de validación externa a la línea de paridad, lo que reduce su valor de predicción.

Los valores de error estándar de la predicción son mayores a los errores estándares de la validación cruzada (SECV) para las dos ecuaciones. De acuerdo con Delgado (2003), para que una ecuación de predicción se considere válida, es necesario que el error estándar de

predicción (SEP) no se diferencie del error estándar de validación cruzada (SECV) en más de un 20%, en este caso la diferencia es de un 9 y 51% para la ecuación con tratamiento matemático 2.8.8.1^{snv-d} y 1.8.4.1^{snv-d}, respectivamente, lo que indicaría que la segunda ecuación de predicción no sería precisa para predecir la composición de grasa en carne.

Con respecto al sesgo, se observa que éste es negativo para ambas ecuaciones, indicando que los valores de laboratorio son en promedio menores a los valores predichos por NIRS y los puntos están sobre la diagonal del gráfico 13 y 14. Ambos valores no exceden el 60% del error estándar de la validación cruzada, que es considerado el límite para el sesgo, como evaluación de las ecuaciones en la validación externa (Shenk y Westerhaus, 1996).

En los gráficos 13 y 14 se muestra el ajuste que tuvieron las muestras de validación externa a las ecuaciones MPLS, 2.8.8.1^{snv-d} y 1.8.4.1^{snv-d}, respectivamente.

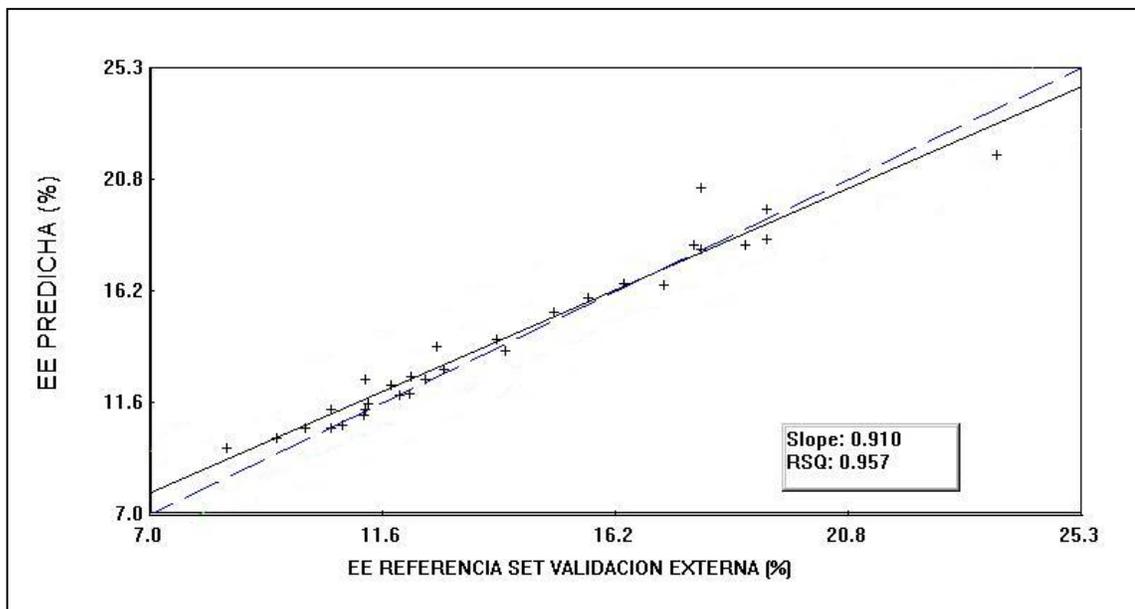


Gráfico 13. Grafico de dispersión del grupo de muestras de validación externa para el componente extracto etéreo, utilizando la ecuación con tratamiento matemático 2.8.8.1^{snv-d}.

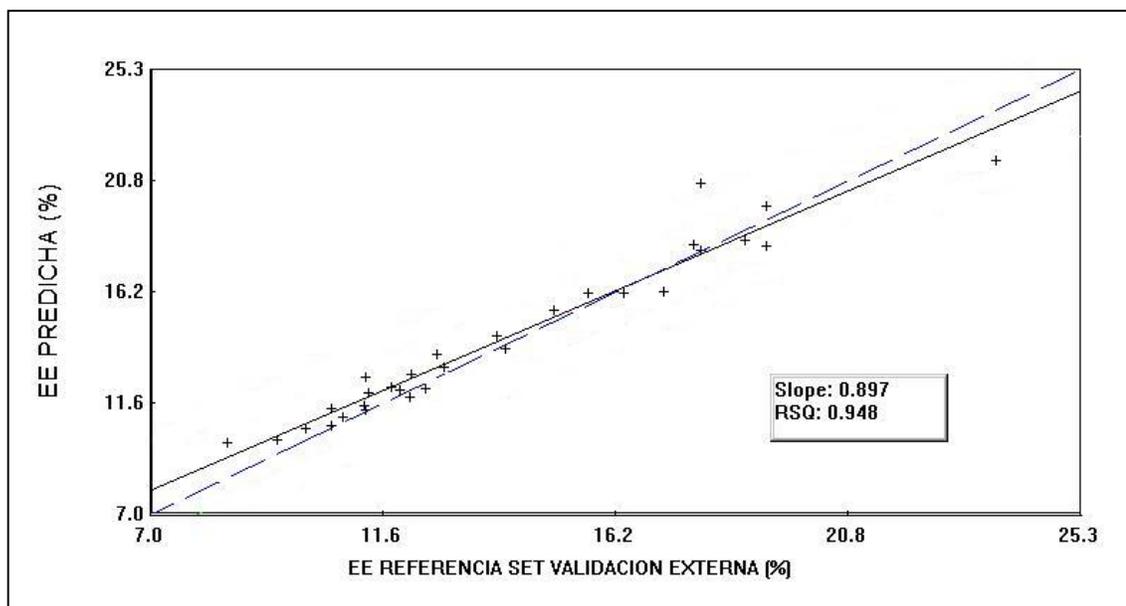


Gráfico 14. Grafico de dispersión del grupo de muestras de validación externa para el componente extracto etéreo, utilizando la ecuación con tratamiento matemático 1.8.4.1^{SNV-D}.

Se observan ajustes similares en ambos gráficos, mostrando poca diferencia entre la línea de tendencia y la línea de paridad, quedando una mayoría de puntos sobre esta línea, lo que indica una sobreestimación del contenido de grasa en las muestras por el método NIRS.

4.1.3.4 CENIZAS TOTALES.

4.1.3.4.1 Primera etapa de calibración para cenizas totales. A continuación se presentan los resultados obtenidos en la primera etapa de calibración para el componente cenizas totales en carne de cordero lechal.

En el cuadro 15 se presentan en orden decreciente los diez mejores resultados estadísticos y las características de las ecuaciones obtenidas para cenizas totales, en orden de mayor a menor coeficiente de determinación de la validación cruzada (1-VR). En las calibraciones, se usó el método MPLS, con y sin métodos de corrección espectral.

Cuadro 15. Resultados estadísticos de las 10 mejores ecuaciones de calibración obtenidas para el componente cenizas totales en carne de cordero lechal.

Ec.	1-VR	SECV (%)	R ²	SEC (%)	N	PROM (%)	d.e. (%)	d.e./SECV	T.M
1	0,537	0,091	0,763	0,065	113	1,109	0,133	1,46	3.4.4 ^{NONE}
2	0,518	0,095	0,721	0,071	115	1,112	0,135	1,42	3.4.4 ^{SNV-D}
3	0,497	0,098	0,647	0,081	115	1,117	0,137	1,40	2.10.8 ^{SNV-D}
4	0,479	0,099	0,615	0,079	113	1,105	0,128	1,29	3.5.5 ^{SNV-D}
5	0,479	0,100	0,683	0,078	116	1,115	0,138	1,38	2.5.5 ^{SNV-D}
6	0,468	0,101	0,642	0,083	116	1,115	0,138	1,37	2.8.8 ^{SNV-D}
7	0,461	0,102	0,658	0,081	116	1,115	0,138	1,35	3.8.8 ^{SNV-D}
8	0,461	0,102	0,650	0,081	115	1,117	0,137	1,34	2.10.5 ^{SNV-D}
9	0,454	0,099	0,534	0,083	111	1,099	0,121	1,22	3.5.5 ^{NONE}
10	0,454	0,103	0,612	0,087	116	1,117	0,139	1,35	2.20.20 ^{NONE}

1-VR : Coeficiente de determinación de la validación cruzada

SECV : error estándar de la validación cruzada

R² : coeficiente de determinación de la calibración

SEC : error estándar de calibración.

N : número de muestras usadas en la calibración

Prom. : composición química promedio de las muestras

d.e. : desviación estándar

Para cenizas totales el coeficiente de determinación de la validación cruzada para la mejor ecuación de calibración fue 0,54, inferior al valor de 0,66, obtenido por Alomar *et al.*(2003) en ecuaciones de calibración para predecir cenizas totales en carne bovina. Los valores de error estándar de la validación cruzada (SECV) y de la calibración (SEC) fueron superiores a 0,091 y 0,065, respectivamente. La relación entre la desviación estándar (d.e.) y el error estándar de la validación cruzada (SECV) fue 1,46, valor muy inferior al limite considerado como aceptable por Kennedy *et al.* (1996) y por lo tanto se considera como un modelo de predicción muy pobre, no recomendado para ninguna aplicación de predicción (Williams, 2001).

Los valores de R² obtenidos con las mejores ecuaciones de calibración fueron 0,76 y 0,72, pero ambas ecuaciones fueron obtenidas con un tercer orden de diferenciación, que de acuerdo con Osborne *et al.* (1993), no es muy utilizado, por propender a deteriorar la señal espectral magnificando el ruido, tendiendo a hacer más complejo el

espectro. De acuerdo con Williams (2000)¹ no se recomienda el cuarto e incluso el tercer orden de diferenciación en ecuaciones de uso rutinario, ya que tienden a ser menos estables en el largo plazo, además de ser a menudo más sensitivas a las características de las muestras y más susceptibles al ruido.

De acuerdo a los parámetros estadísticos obtenidos, el presente modelo predictivo podría ser solamente utilizado para análisis discriminante (análisis cualitativo) determinando muestras con alto, medio y bajo contenido de cenizas totales (Shenk and Westerhaus, 1996).

Estos malos resultados estadísticos obtenidos en el desarrollo de ecuaciones de calibración NIR para cenizas totales, concuerdan con la información que indica que las sustancias inorgánicas y los minerales no poseen absorción en la región del infrarrojo. Sin embargo, los minerales y otros elementos inorgánicos pueden estar asociados a la estructura orgánica bajo la forma de óxidos, quelatos u otros complejos pudiendo indirectamente ser estimados por NIRS (Alomar *et al.*, 2003; Cozzolino, 2002).

Los resultados obtenidos en este trabajo para este componente, concuerdan con los obtenidos por Bartholomew y Osuala (1988), en carne de cordero, quienes informaron un valor de coeficiente de determinación de la calibración (R^2) de 0,65, que de acuerdo con Williams (2001), sólo permite hacer un "screening" grosero.

En el gráfico 15 se muestra la relación entre los valores químicos de referencia entregados por el laboratorio y los valores predichos por la mejor ecuación de predicción en NIR para cenizas totales.

¹ Comunicación personal

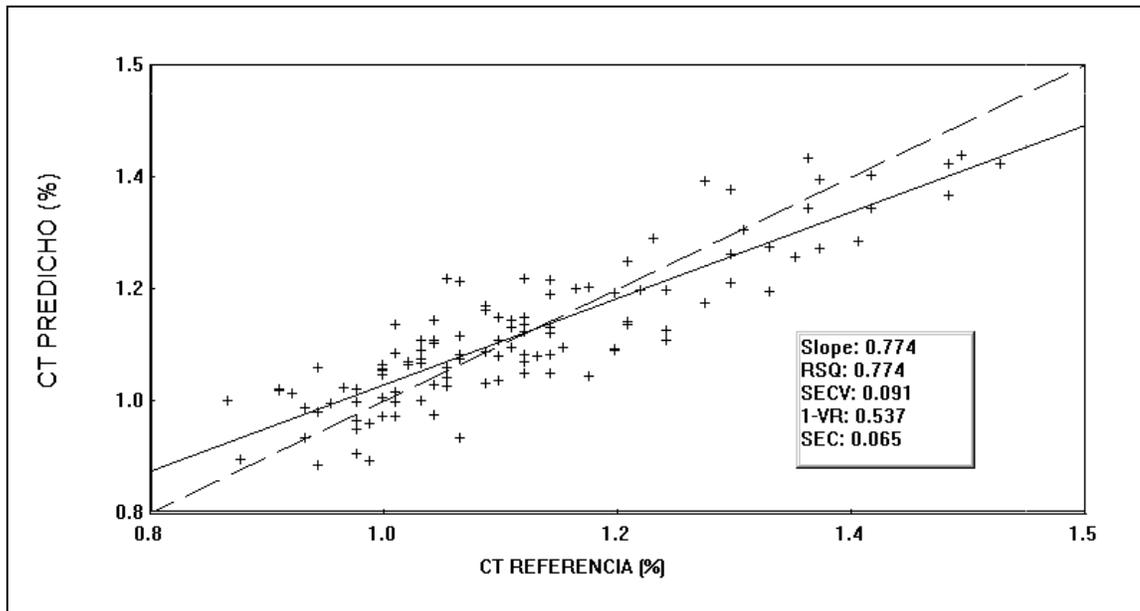


Gráfico 15. Relación entre los valores de referencia y su predicción mediante NIRS para el componente cenizas

El gráfico 15 presenta la distribución de las muestras alrededor de la línea de regresión formada por la relación entre los valores estimados mediante un método de laboratorio versus su valor predicho por NIRS. En general se observa una amplia dispersión en la distribución de las muestras.

4.1.3.4.2 Segunda etapa de calibración y validación externa. Las características composicionales para el componente cenizas totales de las 90 muestras de carne de cordero lechal seleccionadas por el programa WINISI se muestran en el cuadro 16, expresadas base peso fresco, que es la misma forma como las muestras fueron escaneadas por el equipo NIRS.

Cuadro 16. Estadísticas básicas de la composición química de las muestras de carne de cordero lechal utilizadas para la calibración (% del peso fresco).

Componente	Nº de muestras	Rango	Promedio ± d.e.
Cenizas Totales (%)	90	0,88 - 1,79	1,14 ± 0,17

En el cuadro 17 se indican los valores estadísticos obtenidos en la calibración y validación externa con el set de 90 muestras y 30 muestras respectivamente, utilizando el método de regresión de los

cuadrados mínimos parciales con el tratamiento matemático 3.4.4.1 sin método de corrección espectral, correspondiente a la ecuación que originó los mejores resultados estadísticos en la primera etapa y aquellos obtenidos con el mejor tratamiento matemático después de haber realizado diferentes combinaciones, además se muestran los resultados de predicción al validar externamente este grupo de muestras, con las dos ecuaciones.

Cuadro 17. Estadística de la validación cruzada y validación externa de la ecuación seleccionada para predecir contenido de cenizas.

T.M.	Calibración n=90					Validación n=30		
	1-VR	SECV (%)	R ²	SEC (%)	$\frac{d.e}{SECV}$	SEP (%)	R ² P	Sesgo
3.4.4.1 ^{NONE}	0,36	0,11	0,533	0,089	1,45	0,106	0,451	-0,018
2.10.10.1 ^{NONE}	0,46	0,103	0,789	0,064	1,55	0,116	0,344	0,020

1-VR : Coeficiente de determinación de la validación cruzada

SECV: error estándar de la validación cruzada

R²: coeficiente de determinación de la calibración

SEC: error estándar de calibración.

SEP: error estándar de predicción

R²P: coeficiente de determinación de la predicción

En el cuadro 17, se observa que al disminuir el número de muestras utilizadas en la calibración, los coeficiente de determinación de la validación cruzada (1-VR) disminuyen, aumentando el error estándar de la validación cruzada (SECV) en ambas ecuaciones. El valor de R² es un 30% menor en la primera ecuación al valor de coeficiente de determinación de la calibración obtenido en la primera etapa. En la segunda ecuación el R² es muy similar al de la primera etapa.

Ambos errores estándares de la validación cruzada (SECV) para las ecuaciones generadas en la segunda etapa hacen que la relación entre la desviación estándar y SECV sean menor a 3 por lo que se mantiene lo planteado en la primera etapa de calibración para cenizas totales.

Los valores de error estándar de la predicción son muy semejantes a los errores estándares de la validación cruzada (SECV) para las dos ecuaciones.

Con respecto al sesgo, se observa que éste es negativo para la primera ecuación, indicando que los valores de laboratorio son en promedio menores a los valores predichos por NIRS y los puntos están sobre la diagonal de regresión (gráfico 16). En el caso de la segunda ecuación, el sesgo es positivo, indicando que los valores de laboratorio en promedio son mayores a los valores que predice NIRS, ubicándose los puntos bajo la línea de paridad (gráfico 17).

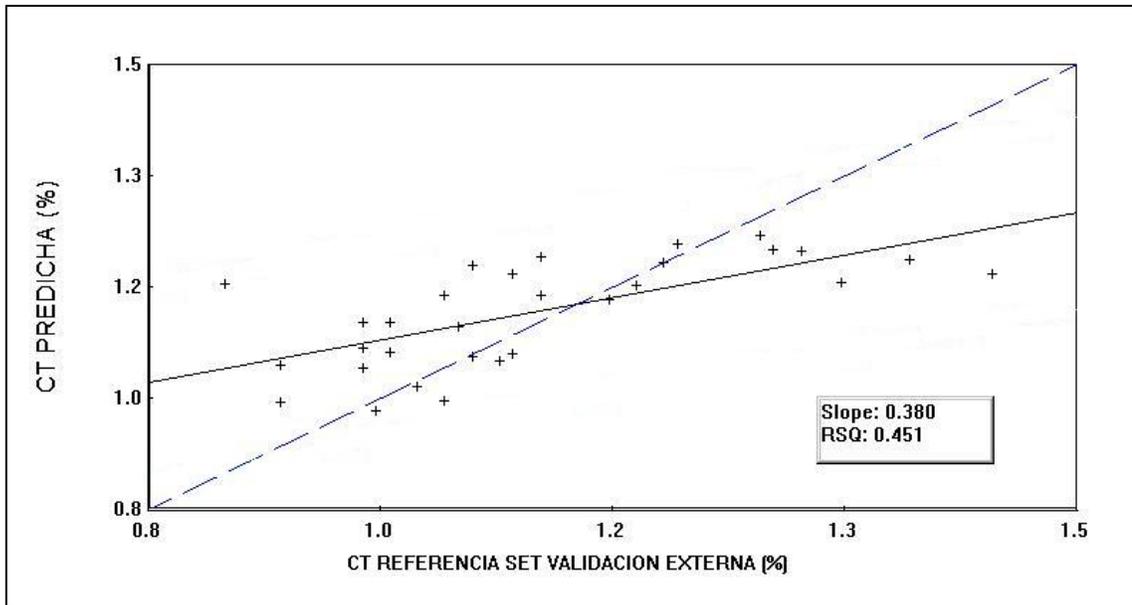


Gráfico 16. Grafico de dispersión del grupo de muestras de validación externa para el componente cenizas totales, utilizando la ecuación con tratamiento matemático 3.4.4.1^{NONE}.

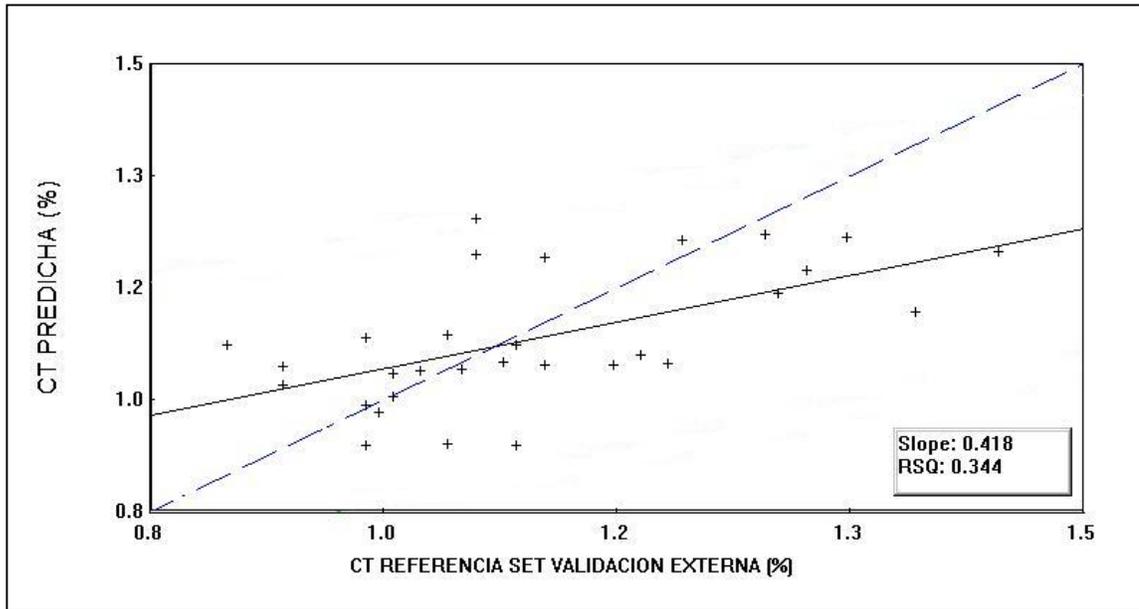


Gráfico 17. Grafico de dispersión del grupo de muestras de validación externa para el componente cenizas totales, utilizando la ecuación con tratamiento matemático 2.10.10.1^{NONE}.

4.2 Análisis cualitativo de carne de cordero (segundo ensayo)

4.2.1 Caracterización espectral. Los gráficos 18 y 19 muestran los espectros promedio NIRS para las muestras de carne refrigerada y congelada-descongelada (1100-2500 nm) colectadas para los músculos *quadriceps femoris* y *semimembranosus*. Se puede observar que para ambos músculos, los espectros promedio presentan bandas de absorción similares, con picos de absorción característicos de la grasa (1202-1204 nm, 1724-1762 nm, 2312-2358 nm) y del agua (1458 nm y 1932 nm) (Ding et al., 1999; Osborne et al., 1993, Cozzolino y Murray, 2004).

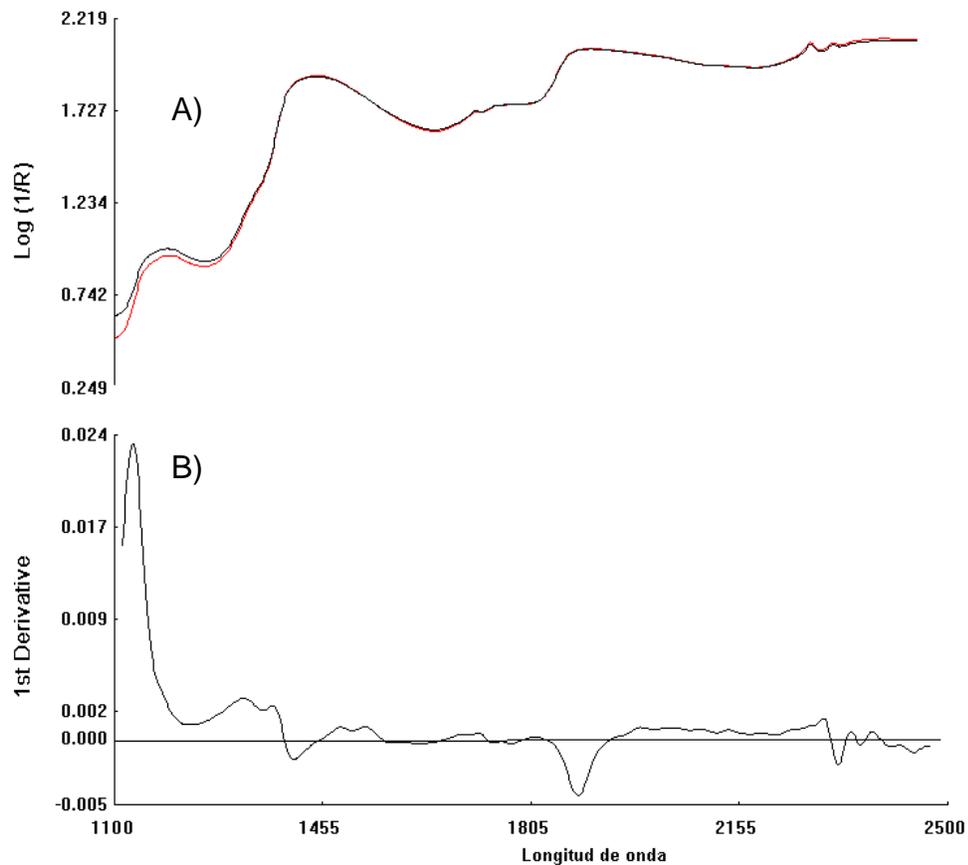


Gráfico 18. Espectros NIR promedio, como $\log (1/R)$ de muestras de carne de cordero refrigerada (-) y congelada-descongelada (-) (A) y su diferencia espectral (B) para el músculo *quadriceps femoris*.

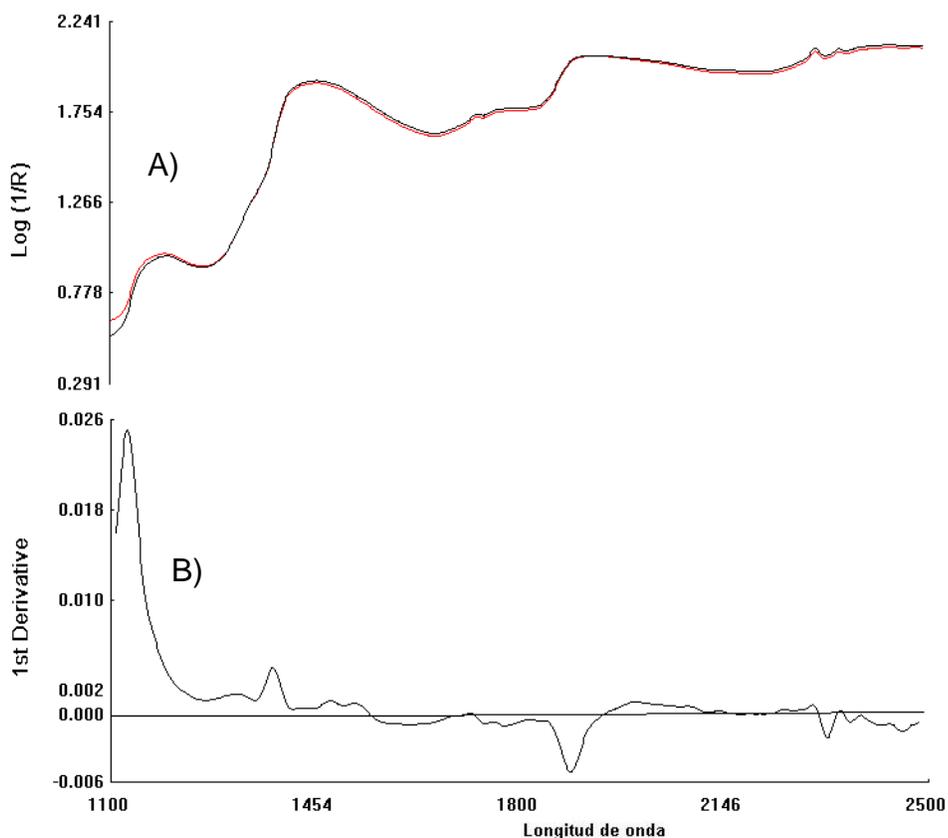


Gráfico 19. Espectros NIR promedio, como $\log (1/R)$ de muestras de carne de cordero refrigerada (-) y congelada-descongelada (-) (A) y su diferencia espectral (B) para el músculo *semimembranosus*.

Se observa que aunque los patrones y bandas de absorción que muestran ambos músculos en sus espectros promedios ($\log (1/R)$) son muy similares, se puede observar que al realizar la sustracción utilizando una primera derivada, se presentan picos que muestran pequeñas diferencias de absorción en algunos segmentos de longitud de onda, principalmente en los que están relacionados con lípidos y agua.

De acuerdo con Cozzolino y Murray (2004), la mayor parte de la información espectral utilizada para el análisis discriminante está contenida en la región NIR a partir de los 1400 nm, principalmente por las características existentes en la carne (grasa intramuscular, ácidos grasos y humedad).

Los picos de absorción destacados en los espectros promedio ($\log (1/R)$), para ambos músculos, concuerdan con los picos de absorción

obtenidos por Cozzolino *et al.*, (2000; 2002) en muestras de carne de cordero y vacuno, respectivamente, escaneadas enteras y picadas por un equipo monocromador Nirsystems 6500 y los obtenidos por Fumière *et al.* (2000) en muestras de carne de pollo picada colectados por el mismo tipo de equipo.

4.2.2 Análisis quimiométrico. En el desarrollo de las calibraciones, se aplicaron diferentes tratamientos matemáticos, generando ecuaciones con diferentes resultados en la clasificación de las muestras espectrales. En los cuadros 18 y 19 se muestran los 10 mejores tratamientos matemáticos aplicados a la ecuación, de acuerdo al porcentaje de muestras espectrales clasificadas correctamente y a sus parámetros estadísticos, para los músculos *semimembranosus* y *quadriceps femoris*, respectivamente.

Cuadro 18. Tratamiento matemático, clasificación correcta de las muestras espectrales y parámetros estadísticos para las diez mejores ecuaciones obtenidas sobre un universo de 240 muestras espectrales, para el músculo *semimembranosus*.

T.M.	Nº factores PLS2	Nº muestras clasificadas correctamente	1-VR	SECV	R ²	SEC
2.15.10.1 ^{NONE}	9	233	0,90	0,16	0,93	0,13
1.8.8.1 ^{NONE}	5	233	0,89	0,17	0,91	0,16
1.10.10.1 ^{NONE}	5	233	0,89	0,17	0,90	0,16
1.15.15.1 ^{NONE}	5	233	0,88	0,17	0,89	0,16
1.20.15.1 ^{NONE}	5	233	0,88	0,18	0,89	0,17
1.20.20.1 ^{NONE}	5	233	0,87	0,18	0,89	0,17
1.15.10.1 ^{NONE}	5	232	0,89	0,17	0,90	0,16
2.15.15.1 ^{NONE}	9	231	0,89	0,16	0,93	0,14
2.8.8.1 ^{SNV-D}	7	231	0,90	0,16	0,94	0,13
2.15.10.1 ^{SNV-D}	8	231	0,90	0,16	0,93	0,14

T.M. : Tratamiento matemático.

1-VR : Coeficiente de determinación de la validación cruzada.

SECV : error estándar de la validación cruzada.

R² : coeficiente de determinación de la calibración.

SEC : error estándar de calibración.

Cuadro 19. Tratamiento matemático, clasificación correcta de las muestras espectrales y parámetros estadísticos para las diez mejores ecuaciones obtenidas sobre un universo de 240 muestras espectrales, para el músculo *quadriceps femoris*.

T.M.	Nº factores PLS2	Nº muestras clasificadas correctamente	1-VR	SECV	R ²	SEC
1.10.10.1 ^{NONE}	14	227	0,88	0,17	0,94	0,12
1.15.15.1 ^{NONE}	13	226	0,88	0,17	0,92	0,14
1.15.10.1 ^{NONE}	14	225	0,89	0,17	0,93	0,13
1.10.8.1 ^{NONE}	14	225	0,88	0,17	0,94	0,12
1.8.8.1 ^{NONE}	14	224	0,88	0,17	0,94	0,12
1.15.15.1 ^{SNV-D}	14	224	0,87	0,18	0,92	0,14
1.15.10.1 ^{SNV-D}	14	219	0,87	0,18	0,92	0,14
0.0.1.1 ^{SNV-D}	12	219	0,87	0,18	0,91	0,15
0.5.1.1 ^{SNV-D}	12	219	0,87	0,18	0,91	0,15
1.10.8.1 ^{SNV-D}	13	218	0,86	0,18	0,93	0,13

T.M. : Tratamiento matemático

1-VR : Coeficiente de determinación de la validación cruzada.

SECV : error estándar de la validación cruzada.

R² : coeficiente de determinación de la calibración.

SEC : error estándar de calibración.

Considerando el mejor tratamiento matemático, de acuerdo al número de muestras clasificadas correctamente y a sus parámetros estadísticos, para cada uno de los músculos utilizados se obtienen los resultados que se muestran en el cuadro 20.

Cuadro 20. Resultados de la clasificación por las ecuaciones discriminantes NIRS para los músculos *semimembranosus* y *quadriceps femoris*.

T.M.	Nº factores PLS 2	Perteneiente a:		Correctamente Clasificadas		
		n	n	n	%	
2.15.10.1 ^{NONE}	9	Músculo				
		<i>semimembranosus</i>	240	233	97,08	
1.10.10.1 ^{NONE}	14	<i>quadriceps femoris</i>		240	227	94,58

Los modelos desarrollados para discriminar entre carne refrigerada y carne congelada-descongelada fueron capaces de identificar la mayoría de las muestras espectrales, para ambos músculos, con porcentajes de identificación en forma correcta superiores al 94%. Para el músculo *semimembranosus* el mejor modelo incluye un segundo orden de derivación en el tratamiento matemático, con un intervalo de sustracción de 15 puntos de datos y un segmento de suavización de 10 puntos de datos. Para el caso del músculo *quadriceps femoris*, el mejor modelo fue hecho

con un primer orden de diferenciación y un intervalo de sustracción igual a 10 puntos, con 10 puntos de datos como segmento de suavización. Ninguno de los modelos utilizó algún tratamiento de corrección de dispersión al espectro.

De acuerdo con Garrido et al. (2000), la precisión y fiabilidad de los modelos discriminantes se juzgan por diferentes estadísticos, entre los que se encuentran como más generalizados, el error de clasificación, que corresponde al porcentaje de muestras incorrectamente clasificadas por el modelo. En este ensayo, para ambos músculos, no existieron muestras espectrales clasificadas incorrectamente, sólo siete muestras fueron clasificadas como inciertas por el modelo, para el músculo *semimembranosus* y trece muestras para el músculo *quadriceps femoris*, por lo que los modelos desarrollados no presentan error de clasificación. Otros estadísticos utilizados, son la sensibilidad y la especificidad del modelo, referida la primera, a la proporción de muestras, que perteneciendo a la categoría, son reconocidas correctamente y la segunda, a la proporción de muestras que no perteneciendo a la categoría, son reconocidas como tales por el modelo. De acuerdo a los resultados obtenidos con los dos modelos originados, se puede decir que poseen una alta sensibilidad y especificidad, sin muestras espectrales mal clasificadas, por lo que según el criterio expuesto por Garrido et al. (2000) estos modelos serían precisos y fiables para discriminar muestras de carne refrigerada, de aquellas que han sido congeladas-descongeladas.

4.3 Análisis cualitativo de jugos de carne (Tercer ensayo)

4.3.1 Caracterización espectral

El gráfico 20 muestra los espectros promedio NIRS (1100-2500 nm) para las muestras de jugos de carne de cordero, refrigerada y congelada-descongelada, colectados de los músculos *Biceps femoris* y *Glutaeus medius*. Se puede observar que para ambos tipos de muestras y músculos, los espectros presentan bandas de absorción similares, pero de distinta intensidad, con picos de absorción dominantes característicos de las proteínas (Díaz-Carrillo et al., 1993; Yamashita et al., 1994). En

forma particular, los picos en las longitudes de onda de 1698 nm, 1734 nm, 2058 nm, 2174 nm, 2298 nm y 2344 nm han sido informados en el espectro de la hemoglobina (Kuenstner and Norris, 1994). Se observan diferencias en el contenido de humedad entre los espectros promedio, expresados en las longitudes de onda de los 1190-1210 nm y los 1942-1944 nm. (Downey and Beauchêne, 1997; Osborne et al., 1993).

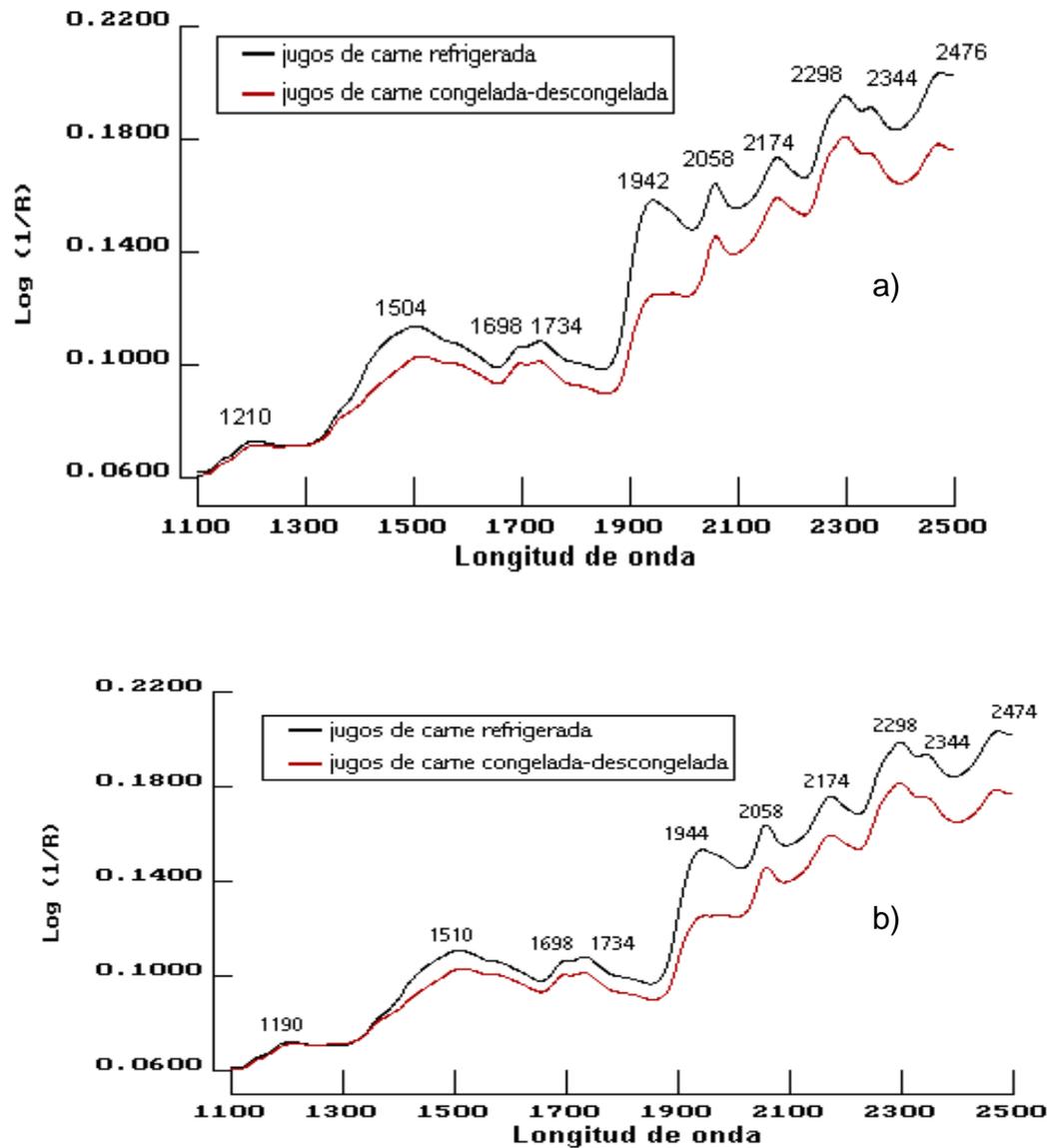


Gráfico 20. Espectro promedio en la región NIR, como $\log(1/R)$, para muestras de jugos de carne de cordero refrigerada (línea superior) y congelada-descongelada (línea inferior) para a) el músculo *Biceps femoris* y b) el músculo *Glutaeus medius*.

Se observa que aunque los patrones y bandas de absorción en ambos músculos son muy similares, existía una menor absorbancia en aquellas muestras de jugo de carne que fueron congeladas y descongeladas, principalmente a partir de los 1350 nm de longitud de onda (gráfico 19). Sin embargo, de acuerdo a Downey y Beauchêne (1997), las principales diferencias entre los espectros están influenciadas por un cambio en la línea base y pueden deberse a una variación en el contenido de materia seca depositada en cada uno de los filtros, al no hacerse ninguna corrección de la cantidad de gotas de jugo a un contenido de sólidos estándar para cada filtro.

Los picos de absorción destacados en el gráfico 19 concuerdan con los picos de absorción obtenidos por Downey y Beauchêne (1997) en los espectros de las muestras de jugos de carne de vacuno refrigerada y congelada-descongelada, utilizando el mismo tipo de filtro Whatman® de microfibra de vidrio, y colectados con un equipo monocromador Nirsystems 6500.

Aunque se observan diferencias entre los grupos espectrales promedios de los jugos de carne refrigeradas y carne congeladas-descongeladas, se consideró necesario recurrir a métodos quimiométricos que permitan obtener una mayor información asociada a los tipos de muestras que se están utilizando.

4.3.2 Análisis quimiométrico. En el desarrollo de las calibraciones, se aplicaron diferentes tratamientos matemáticos, generando las sendas ecuaciones con diferentes resultados en la clasificación de las muestras espectrales. En los cuadros 21 y 22 se muestran los 10 mejores tratamientos matemáticos, de acuerdo al porcentaje de muestras espectrales clasificadas correctamente, para los músculos *Biceps femoris* y *Glutaeus medius*, respectivamente.

Cuadro 21. Tratamiento matemático, clasificación correcta de las muestras espectrales y parámetros estadísticos para las diez mejores ecuaciones obtenidas sobre un universo de 120 muestras espectrales, para el músculo *Biceps femoris*.

T.M.	Nº factores PLS	Nº muestras clasificadas correctamente	1-VR	SECV	R ²	SEC
2.8.8.1 ^{SNV-D}	3	120	0,92	0,14	0,92	0,14
3.8.8.1 ^{NONE}	3	120	0,92	0,14	0,92	0,14
2.10.8.1 ^{SNV-D}	3	120	0,91	0,15	0,92	0,14
2.10.10.1 ^{SNV-D}	3	120	0,91	0,15	0,92	0,15
3.4.4.1 ^{SNV-D}	1	120	0,88	0,17	0,89	0,17
1.20.20.1 ^{SNV-D}	4	119	0,89	0,17	0,89	0,16
2.4.4.1 ^{NONE}	3	119	0,92	0,14	0,93	0,14
1.4.4.1 ^{SNV-D}	3	119	0,88	0,18	0,88	0,17
2.4.4.1 ^{SNV-D}	2	119	0,89	0,16	0,90	0,16
3.4.4.1 ^{NONE}	2	119	0,90	0,16	0,91	0,15

T.M. : Tratamiento matemático

1-VR : Coeficiente de determinación de la validación cruzada.

SECV : error estándar de la validación cruzada.

R² : coeficiente de determinación de la calibración.

SEC : error estándar de calibración.

Cuadro 22. Tratamiento matemático, clasificación correcta de las muestras espectrales y parámetros estadísticos para las diez mejores ecuaciones obtenidas sobre un universo de 120 muestras espectrales, para el músculo *Glutaeus medius*.

T.M.	Nº factores PLS	Nº muestras clasificadas correctamente	1-VR	SECV	R ²	SEC
2.8.4.1 ^{SNV-D}	3	120	0,90	0,16	0,92	0,14
2.8.8.1 ^{SNV-D}	3	120	0,90	0,16	0,92	0,15
2.8.5.1 ^{SNV-D}	3	120	0,90	0,16	0,92	0,15
2.10.8.1 ^{SNV-D}	3	119	0,90	0,16	0,91	0,15
2.4.4.1 ^{NONE}	3	119	0,87	0,18	0,91	0,15
2.10.10.1 ^{SNV-D}	3	119	0,89	0,16	0,91	0,15
3.10.8.1 ^{NONE}	3	119	0,88	0,18	0,90	0,16
3.10.8.1 ^{SNV-D}	3	119	0,91	0,15	0,92	0,14
3.4.4.1 ^{NONE}	2	118	0,89	0,16	0,91	0,15
2.4.1.1 ^{SNV-D}	2	117	0,90	0,16	0,91	0,15

T.M. : Tratamiento matemático

1-VR : Coeficiente de determinación de la validación cruzada.

SECV : error estándar de la validación cruzada.

R² : coeficiente de determinación de la calibración.

SEC : error estándar de calibración.

Considerando el mejor tratamiento matemático, para cada uno de los músculos utilizados, se obtienen los resultados que se muestran en el cuadro 23.

Cuadro 23. Resultados de la clasificación por las ecuaciones discriminantes NIRS para los músculos de cordero *Biceps femoris* y *Glutaeus medius*.

T.M.	N° factores PLS 2	Perteneiente a:		Correctamente Clasificadas	
			n	n	%
		Músculo			
2.8.8.1 ^{SNV-D}	3	<i>Biceps femoris</i>	120	120	100
2.8.4.1 ^{SNV-D}	3	<i>Glutaeus medius</i>	120	120	100

Como se puede observar en el cuadro anterior, ambos modelos clasifican correctamente el 100% de las muestras espectrales para cada uno de los grupos analizados.

Ambos modelos incluyen un segundo orden de derivación o sustracción en el tratamiento matemático, con un intervalo de sustracción de 8 puntos de datos, para ambos músculos y 8 y 4 puntos de segmento de suavización para los músculos *Biceps femoris* y *Glutaeus medius*, respectivamente.

De acuerdo a lo planteado en el segundo ensayo, se pueden considerar ambos modelos precisos y fiables, sin presentar error de clasificación y una alta sensibilidad y especificidad.

5 CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados y bajo las condiciones experimentales de este trabajo, se puede concluir lo siguiente:

La técnica NIRS mostró ser un buen método para predecir con precisión los contenidos de humedad y grasa de carne de cordero lechal.

La técnica podría llegar a separar categorías por contenido de proteína y cenizas, pero la predicción de los contenidos de proteína y cenizas totales, de acuerdo a los resultados, no sería confiable.

Es factible diferenciar carne de cordero refrigerada de carne de cordero congelada-descongelada, a través de la técnica de espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS), utilizando sólo los datos espectrales de las muestras y la técnica de regresión con variables ficticias (dummy).

La técnica NIRS permite discriminar entre carne de cordero refrigerada y carne de cordero congelada-descongelada, a través del análisis de los jugos de dichas carnes, utilizando los valores espectrales del extracto seco (DESIR) y una técnica de regresión con variables ficticias (dummy)

6 RESUMEN

El objetivo general de esta investigación fue evaluar el potencial de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) para predecir la composición química de carne de cordero y discriminar entre carnes de cordero que han sido o no sometidas a congelamiento. Los objetivos específicos fueron: desarrollar y evaluar ecuaciones de calibración para predecir contenido de humedad, proteína cruda, grasa y cenizas de carne de cordero lechal (primer ensayo); evaluar NIRS como herramienta discriminante entre carne de cordero sometida o no a congelación (segundo ensayo) y evaluar la técnica de espectroscopía del extracto seco por reflectancia infrarroja (DESIR) como método discriminante entre carne de cordero sometida a congelación y nunca congelada, sólo utilizando sus jugos respectivos (tercer ensayo). Los ensayos se realizaron en el Laboratorio de Nutrición Animal del Instituto de Producción Animal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile entre septiembre de 1999 y enero de 2000. Para todos los ensayos se utilizó un equipo monocromador NIRSystems 6500, un computador personal y el programa NIRS 3.0 y WinIsi II versión 1.02A de Infracsoft International. En el primer ensayo se utilizaron 120 muestras de carne congelada de cordero lechal, las cuales fueron descongeladas, molidas, homogeneizadas y analizadas espectralmente y luego químicamente a través de los métodos oficiales AOAC. Se desarrollaron ecuaciones de regresión (MPLS) probando diferentes tratamientos matemáticos, bajo dos metodologías: utilizando las 120 muestras, donde se obtuvo la mejor ecuación para cada componente a través de calibraciones consecutivas y utilizando 90 muestras del total como set de calibración dejando las 30 restantes para hacer una validación externa de las mejores ecuaciones. Se generaron dos ecuaciones de regresión para cada componente. Una de ellas, mediante el mismo tratamiento matemático que originó la mejor ecuación con el total de muestras. La otra mediante calibraciones sucesivas variando los tratamientos matemáticos, con el fin de obtener una nueva ecuación. Se realizó una validación externa para las dos mejores ecuaciones de regresión. En cada fracción se seleccionó las ecuaciones de calibración con el coeficiente de determinación de la validación cruzada (1-VR) más alto y en coincidencia con el error estándar de la validación cruzada (SECV) más bajo. El segundo ensayo utilizó 20 músculos de pierna de cordero, *Semimembranosus* y *Quadriceps femoris* refrigerados. Cada uno,

molido y dividido en 2 muestras, se tomó el espectro a una de ellas, la otra muestra fue congelada por 28 días a -20°C , para luego ser descongelada y tomado su espectro. El método de análisis estableció una matriz de calibración, asignándoles variables ficticias con un valor 1, si el espectro pertenece a un grupo en particular, o un valor 0 si no pertenece a ese grupo. La calibración se realizó con los datos espectrales utilizando los valores de referencia (0 y 1). Se utilizó validación cruzada para comprobar la precisión de la calibración. Se utilizó el programa WinIsi II para generar las ecuaciones discriminantes. El tercer ensayo utilizó 20 músculos de pierna de cordero, *Bíceps femoris* y *Glutaeus medius* refrigerados, trozados en cubos y dividido en 2 muestras. A una de ellas, se le extrajo su jugo por centrifugación. Se colectó 0,3 ml de jugo y se aplicó sobre un filtro circular de microfibra de vidrio, en cuatro repeticiones, tomando luego sus espectros. La otra muestra fue congelada por 28 días a -20°C , para luego realizar el mismo procedimiento anteriormente descrito. Se realizó un análisis discriminante, igual que en el segundo ensayo. De acuerdo a los resultados se concluyó que la técnica NIRS es un buen método para predecir con precisión los contenidos de humedad y grasa de la carne de cordero lechal y separar categorías por contenido de proteína y cenizas. Permite diferenciar, a través de los datos espectrales de las muestras y del extracto seco de los jugos de carne (DESIR), carne de cordero refrigerada y congelada-descongelada.

7 SUMMARY

The general objective of this investigation was to evaluate the potential of the near infrared spectroscopy (NIRS) to predict the chemical composition of lamb meat and to discriminate between lamb meat that has or has not been subjected to freezing. The specific objectives were: to develop and evaluate calibration equations to predict humidity, crude protein, fat and total ash content of suckling lamb meat (first trial); to evaluate NIRS as a discriminative tool between lamb meat submitted to freezing or never frozen (second trial) and to evaluate dry extract spectroscopy by infrared reflection (DESIR) as a discriminative method, between lamb meat submitted to freezing or never frozen, through the use of meat juice (third trial). The trials were performed in the Animal Nutrition Laboratory of the Animal Production Institute, Agricultural Sciences Faculty, Universidad Austral of Chile between September of 1999 and January of 2000. For all the experiments a NIRSystems 6500 scanning monochromator device, a personal computer and the software NIRS 3.0 and WinIsi II Version 1.02A were used. In the first trial, 120 samples of frozen suckling lamb meat were used, which were thawed, ground, homogenized and analyzed spectrally and chemically through official AOAC methods. The regression equations (MPLS) were developed testing different mathematical treatments under two methodologies: using the 120 samples, where the best equation for each component was obtained through consecutive calibrations, and using 90 samples as a calibration set leaving the other 30 to perform an external validation of the best equations. Two regression equations were generated for each characteristic. One of these was generated via the same mathematical treatment that produced the best equation with all of the samples. The other equation was generated via successive calibrations varying the mathematical treatments, with the aim of obtaining a new equation. An external validation was performed for the two best regression equations. In each moiety the calibration equations with the highest coefficient of determination of cross validation (1-VR) and the coinciding lowest standard error of cross validation (SECV) were selected. In the second trial, 20 muscles from lamb's legs, refrigerated *Semimembranosus* and *Quadriceps femoris*, were utilized. Each one was ground and divided into 2 samples, a spectrum was taken of one of them, and the other was frozen for 28 days at -20°C , to be later thawed and have its spectrum taken. The

analysis method established a calibration matrix, assigning dummy variables with a value of 1, if the spectrum belonged to a particular group, or a value of 0 if it did not belong to that group. The calibration was conducted with the spectral data using the reference values (0 and 1). Cross validation was utilized to confirm the precision of the calibration. The WinIsi II program was used to generate the discriminating equations. The third trial used 15 lamb leg muscles, refrigerated *Biceps femoris* and *Glutaeus medius*, chopped in cubes and divided in two samples. From one of them, juice was extracted by centrifugation. A total of 0.3 ml of juice was collected and applied on a glass microfiber filter, with four repetitions, later taking their spectra. The other sample was frozen for 28 days at -20°C, to later undergo the same procedure described above. A discriminative analysis was performed, equal to that of the second trial. According to the results, it is concluded that the NIRS technique is a good method to predict with precision the humidity and fat contents of suckling lamb meat and to separate categories by protein and ash content. It permits differentiation, through spectral data of the samples and dry extract (DESIR) between refrigerated and frozen-unfrozen lamb meat.

8 BIBLIOGRAFIA

- Alomar D. y R. Fuchslocher, 1998. Fundamentos de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) como método de análisis de forrajes. *Agro Sur* 26(1):88-104.
- Alomar D., C. Gallo, M. Castañeda y R. Fuchslocher. 2003. Chemical and discriminant analysis of bovine meat by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). *Meat Science* 63:441-450.
- Association of official Agricultural chemists (AOAC), 1995. Meat and Meat Products. En: Official methods of analysis of AOAC Institution. Cap. 39. pp.1-23. 16th ed. Published by AOAC.
- Bandman E. 1994. Química de los tejidos animales. Parte 1 - Proteínas. En: Ciencia de la carne y de los productos carnicos. pp. 57-92. J. Price y B.S. Schweigert (eds) Editorial Acribia S.A.
- Bartholomew D.T. and C.I. Osuala. 1988. Use of the InfraAnalyzer in Proximate Analysis of Mutton. *Journal of Food Science* 53(2):379-382.
- Batten G.D. 1998. Plant analysis using near infrared reflectance spectroscopy: the potential and the limitations. *Australian Journal of experimental Agriculture* 38:697-706.
- Benedict R.C and R.L. Ellis. 1987. Symposium on critical analysis of analytical methods for meat foods. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 70(1):69
- Berg H. and K. Kolar. 1991. Rapid method. Evaluation of rapid moisture, fat, protein and hydroxyproline determination in beef and pork using the Infratec Food and Feed Analyzer. *Fleischwirtsch* 71(7):787-789.
- Bertrand D., 2002. La spectroscopie proche infrarouge et ses applications dans les industries de l'alimentation animale. *INRA Productions Animales* 15(3):209-219.
- Bokobza L. 1998. Near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 6(1-4):3-17.
- Carballo B., G. López de Torre y A. Madrid. 2001. Bioquímica de la carne (primera parte). En: Tecnología de la carne y de los productos cárnicos. Pp. 321. Primera Edición. Ediciones Mundi-Prensa.
- Clark D.H. and R.E. Short. 1994. Comparison of AOAC and light spectroscopy analyses of uncooked, ground beef. *Journal of Animal Science* 72:925-931.

- Cozzolino D., I. Murray, J.R. Scaife and R. Paterson. 2000. Study of dissected lamb muscles by visible and near infrared reflectance spectroscopy for composition assessment. *Animal Science* 70: 417-423.
- Cozzolino D., I. Murray and R. Paterson. 1996. Visible and near infrared reflectance spectroscopy for the determination of moisture, fat and protein in chicken breast and thigh muscle. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 4:213-223.
- Cozzolino D. and I. Murray. 2002. Effect of sample presentation and animal muscle species on the analysis of meat by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 10:37-44
- Cozzolino D., D. De Mattos and D. Vaz Martins. 2002. Visible/near infrared reflectance spectroscopy for predicting composition and tracing system of production of beef muscle. *Animal Science* 74: 477-484.
- Czarnik-Matusiewicz H. W. and A. Korniewicz. 1996. Near infrared reflectance spectroscopic determination of water, protein and fat in pork liver. En: "Near Infrared Spectroscopy: The future Waves." Pp. 617-619. Ed. A.M.C. Davies and Phil Williams.
- Czarnik-Matusiewicz H. W. and A. Korniewicz. 1998. The use of the InfraLyzer 260 Whole Grain for water and fat determination in pork meat. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 6:83-86.
- Chen Y.R. and D.R. Massie. 1993. Visible/Near infrared reflectance and interactance spectroscopy for detection of abnormal poultry carcasses. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers* 36(3):863-869.
- Chen, Y.R., W.R. Hruschka, and H. Early. 2000. A chicken carcass inspection system using visible/near-infrared reflectance: in plant trials. *Journal of Food Process Engineering* 23(2):89-99.
- Davis A. and A. Grant. 1987. Near infrared analysis of food. *International Journal of Food Science and Technology* 22:191-207.
- Delgado E. 2003. Caracterización cuantitativa y cualitativa de lomo curado de cerdo ibérico, mediante análisis espectral en el infrarrojo cercano (NIRS). Trabajo profesional fin de carrera. E.T.S de Ingenieros Agrónomos y de Montes. Universidad de Córdoba. España.
- De Pedro E.; A. Garrido; L. M. Martínez; F. Angulo y J. García. 1997. Espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS) en el análisis cuantitativo y cualitativo de productos derivados del cerdo Ibérico. *ITEA* 18:661-663.

- Díaz-Carrillo E. A. Muñoz-Serrano, A. Alonso-Moraga and J.M. Serradilla-Manrique. 1993. Near infrared calibration for goat`s milk components: protein, total casein, α -s, β - and κ -caseins, fat and lactose. Journal of Near Infrared Spectroscopy 1:141-146
- Ding H., R. Xu and D. KO Chan. 1999. Identification of broiler chicken meat using a visible/near-infrared spectroscopic technique. Journal of the Science of Food and Agriculture 79:1382-1388.
- Ding H. and R. Xu. 1999. Differentiation of beef and Kangaroo meat by visible/near infrared reflectance spectroscopy. Journal of Food Science 64: 814-817.
- Downey G. 1996. Authentication of food and food ingredients by near infrared spectroscopy. Journal of Near Infrared Spectroscopy, 4: 47-61.
- Downey G. and D. Beauchêne. 1997. Authentication of fresh vs. Frozen-then-thawed beef by near infrared reflectance spectroscopy of dried drip juice. Lebensmittel-Wissenschaft und - Technologie 30(7):721-726.
- Downey G. 1999. Near Infrared Spectroscopy in the food industry: a tool for quality management. Research Report N°14. The National Food Centre.
- Dugan J. L. 1994. Química de los tejidos animales. Parte 2 - Grasas. En: Ciencia de la carne y de los productos carnicos. pp 93-101. J. Price y B.S. Schweigert (eds). Editorial Acribia S.A.
- Ellekjaer M., T. Isaksson and R. Solheim. 1994. Assessment of sensory quality of meat sausages using near-infrared spectroscopy. Journal of Food Science 59:456-464.
- Fumière O., G. Sinnaeve et P. Dardenne. 2000. L' authentication rapide des poulet de chair sous label: distinction entre poulet issus de souches à croissance lente ou rapide par la spectrométrie dans la proche infrarouge. Biotechnology, Agronomy, Society and Environment 4(4):214-220.
- Fundación Chile. 2000. Cadenas Agrolimentarias. Carne de Cordero. Producción y Comercialización de carne de cordero de calidad de origen Magallánico. Junio 2000. pp 37-44
- García-Lagombra G., L.H. Harbers, J. Velazco, J.L. Morrill, B.B. Maziya and C.A.Z. Harbers. 2001. Utilization of near infrared reflectance spectroscopy for prediction of the nutritional composition of beef and pork samples. Cattlemen`s day 1991. <http://www.oznet.ksu.edu/library/lvstk2/srp623.pdf> (octubre 2004)

- Garrido A., A. Gómez, J.E. Guerrero y V. Fernández. 1996. NIRS: una tecnología de apoyo para un servicio integral en alimentación animal. En: Avances en Nutrición y Alimentación animal. Pp. 275-303. P.G. Rebollar, C. de Blas y G.G. Mateos (Coords). Ed. Fira de Barcelona. Barcelona. España.
- Garrido A., J. García-Olmo y E. De Pedro. 2000. Espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS). Una metodología para implementar en sistemas de aseguramiento de la calidad y trazabilidad de productos derivados del cerdo ibérico. Sólo Cerdo Ibérico 4:39-44.
- Geladi P. 1996. An overview of multivariate spectral data analysis. En: "Near Infrared Spectroscopy: The future Waves." pp. 165- 173. Ed. A.M.C. Davies and Phil Williams.
- Givens D.I, J. L. De Boever and E.R. Deaville. 1997. The principles, practices and some future applications of near infrared spectroscopy for predicting the nutritive value of foods for animals and humans. Nutrition Research Reviews 10:83-114.
- Givens D.I and R. Deaville. 1999. The current and future role of near infrared reflectance spectroscopy in animal nutrition: a review. Australian Journal of Agricultural Research 50:1131-1145.
- Hildrum K.I., B.N. Nilsen. M. Mielnik and T. Naes. 1994. Prediction of sensory characteristics of beef by Near-infrared spectroscopy. Meat Science 38:67-80.
- Instituto Nacional de Estadística (Chile). 2003. Evolución, situación actual y perspectivas de la producción pecuaria nacional. Periodo 1997-2002. pp 13-15.
- Instituto Nacional de Estadística (Chile). 2005. Archivo de Noticias. <http://www.ine.cl/ine/canales/actualidad/noticias/2005/may/not110505.php> (consulta marzo 2006).
- Infrasoft International. 1992. NIRS 3 version 3.00. Routine Operation, calibration and Network System Management Software for Near Infrared Instruments. Sylver Spring, MD. 328p.
- Hruschka R. W. 2001. Data Analysis: Wavelength Selection Methods. En: Near Infrared Technology in the agricultural and food industries. Pp. 39-58. Ed. Phil Williams and Karl Norris.
- Isaksson T. and T. Naes. 1990. Selection of samples for calibration in near infrared spectroscopy. Part II: selection based on spectral measurement. Applied Spectroscopy 44:1152-1158.
- Isaksson T., B.N. Nilsen, G. Togersen, R.P. Hammond and K.I. Hildrum. 1996. On-line, proximate analysis of ground beef directly at a meat grinder outlet. Meat Science 43(3-4):245-253.

- Kennedy C.A., J.A. Shelford and P.C. Williams. 1996. Near infrared spectroscopy analysis of intact grass silage and fresh grass for dry matter, crude protein and acid detergent fiber. En: "Near Infrared Spectroscopy: The future Waves." Pp. 524-530. Ed. A.M.C. Davies and Phil Williams.
- Kim Y.B. and I.J. Yoo. 1995. Non-destructive measurement of protein and moisture content of beef by NIR spectroscopy. En: "Leaping Ahead with near infrared spectroscopy." Pp. 296-299. Ed. G.D. Batten, P.C. Flinn, L.A. Welsh and A.B. Blakeney
- King-Brink M., Z. DeFreitas and J. G. Sebranek. 1996. Use of near infrared transmission for rapid analysis of meat composition. En: Near Infrared Spectroscopy: The future waves. NIR publications. Pp 142-147. A.M.C Davies and P. Williams (eds)..
- Kruggel W. G., R. A. Field, M. L. Riley, H. D. Radloff and K. M. Horton. 1981. Near-infrared reflectance determination of fat, protein and moisture in fresh meat. Journal of the Association of Official Analytical Chemists 44(3):692-696.
- Kuenstner, J.T. and K.H. Norris. 1994. Spectrophotometry of human haemoglobin in the near infrared region from 1000 to 2500 nm. Journal of Near Infrared Spectroscopy 2:59-65.
- Lanza E. 1983. Determination of moisture, protein, fat, and calories in raw pork and beef by near infrared spectroscopy. Journal of food science 48:471-474.
- Lawrie R.A. 1998. Conversi3n del m3sculo en carne. En: Ciencia de la carne. Cap. 5. Pp. 111-136. 3ª Ed. Editorial Acribia. 1998
- Mark H. 1992. Qualitative Discriminant Analysis. En: "Handbook of Near Infrared Analysis." pp.329-363. Ed. Donald A. Burns y Emil W. Ciurczak. Marcel Dekker, Inc. New York.
- McElhinney J., G. Downey and T. Fearn. 1999. Chemometric processing of visible and near infrared reflectance spectra for species identification in selected raw homogenized meats. Journal of Near Infrared Spectroscopy 7:145-154.
- Mitsumoto M., S. Maeda, T. Mitsuhashi and S. Ozawa. 1991. Near-Infrared spectroscopy determination of physical and chemical characteristics in beef cuts. Journal of Food Science. 56(6):1493-1496.
- Murray I. 1986. Near infrared reflectance an3lisis of forages. En: Recent advances in animal nutrition. Pp 141-156. W. Heresign and D. J A. Cole Eds. London: Butterworths.

- Naes T., T. Isaksson, T. Fearn and T. Davies. 2002. A User-Friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification. NIR Publications, Chichester, UK. 344 p.
- Naes T. and T. Isaksson. 1989. Selection of samples for near infrared spectroscopy. Part I: General principles illustrated by examples. Applied Spectroscopy 43:328-335.
- Naes T. and K. I. Hildrum. 1997. Comparison of multivariate calibration and discriminant analysis in evaluating NIR spectroscopy for determination of meat tenderness. Applied Spectroscopy 51(3).
- Narbona, C. 1995. Estudio sobre la conducta del consumidor y sus cambios como consecuencia de la aplicación de la tipificación de la carne bovina. Discriminación por calidad. Tesis Ing. Alim. Universidad Austral de Chile. Escuela de Ingeniería en Alimentos, Valdivia, Chile
- Norris, K.H., R.F. Barnes, J.E. Moore and J.S. Shenk. 1976. Producing forage quality by infrared reflectance spectroscopy. Journal Of Animal Science 43:889-897.
- Odepa, 2000. Temporada Agrícola Publicación N°16, segundo semestre de 2000 I.S.S.N. 0717-0386. Oficina de estudios y Políticas Agrarias - Odepa. Ministerio de Agricultura. Gobierno de Chile
- Osborne B.G., T. Fearn and P.H. Hindle. 1993. Practical NIR spectroscopy with applications in food and beverage analysis. 227 p. 2ªEd. Longman Singapore Publishers.
- Peldoza A. C. 1999. Desarrollo de ecuaciones de calibración para predecir la composición nutricional de ensilaje de pradera mediante espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS). Tesis Lic. Agr. Valdivia, Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias.
- Prändl O., A. Fischer T. Schmidhofer and H. Sinell. 1994. Tecnología e higiene de la carne. 854p. Editorial Acribia S.A.
- Ripoche A. and A.S. Guillard. 2001. Determination of fatty acid composition of pork fat by Fourier transform infrared spectroscopy. Meat Science 58(3):229-304.
- Rodriguez-Otero J.L., M- Hermida. and J. Centeno. 1997. Analysis of Dairy Products by Near-Infrared Spectroscopy: A Review. Journal of Agricultural and Food Chemistry 45(8):2815-2819
- Rodriguez-Otero J.L., M.J. Veida, L. Castaño, J.A. Centeno and M- Hermida. 1998. Application and performance of the Meatspec for cheese analysis. Milchwissenschaft 53(9):503-505

- Rosenthal B. 1996. The near infrared paradigm: will 25 years of research/knowledge hinder near infrared's future?. En: Near Infrared Spectroscopy: The future waves. NIR publications. pp 1-5. A.M.C Davies and P. Williams (eds).
- Schweigert B.S. 1994. Contenido en nutrientes y valor nutritivo de la carne y los productos cárnicos. En: Ciencia de la carne y de los productos carnicos. pp 249-277. J. F. Price y B.S. Schweigert (eds). Ed. Acribia, S.A..
- Shenk J., J. Workman and M.O. Westerhaus. 1992. Application of NIR Spectroscopy to Agricultural Products. En: "Handbook of Near Infrared Analysis." pp.383-431. Ed. Donald A. Burns y Emil W. Ciurczak. Marcel Dekker, Inc. New York
- Shenk J. and M.O. Westerhaus. 1993. Analysis of agricultural and food products by near infrared reflectance spectroscopy. Monograph. Infrasoftware International, Port Matilda, PA.
- Shenk J. and M.O. Westerhaus. 1994. The application of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to forage analysis. En: Forage Quality, evaluation and utilization. pp. 406-448. G. Fahey Ed. National Conference of forage quality, evaluation and utilization. Univ. of Nebraska.
- Shenk J. and M.O. Westerhaus. 1996. Calibration the ISI way. En: "Near Infrared Spectroscopy: The future Waves." pp. 198-202. Ed. A.M.C. Davies and Phil Williams.
- Solberg Ch. 1996. Use of near infrared transmittance in quality analysis of fish. En: "Near Infrared Spectroscopy: The future Waves." pp. 591-595. Ed. A.M.C. Davies and Phil Williams.
- Solís M., E. De Pedro, A. Garrido, J. García, L. Silió, C. Rodríguez y J. Rodríguez. 2001. Evaluación de la composición del lomo de cerdo ibérico mediante la tecnología NIRS. ITEA 22(2):613-615.
- Swatland H. J. 1986. Post-mortem spectrophotometry of color intensity of pork and beef using quartz optical fibres. Meat Science 17:97-106
- Swatland H.J. 1999. Photometric relationship between path length and transmittance through pork measured by fiber optics. Food Research International 32:305-312.
- Thyholt K. and T. Isaksson. 1997. Differentiation of frozen and unfrozen beef using near- infrared spectroscopy. Journal of the Science of Food and Agriculture 73:525-532.
- Thyholt K., U. G. Indahl, K. I. Hildrum, M. R. Ellekjaer and T. Isaksson. 1997. Meat speciation by near infrared reflectance spectroscopy on dry extract. Journal of Near Infrared Spectroscopy 5:195-208.

- Togersen G. , T. Isaksson, B.N. Nilsen, E.A. Bakker and K.I. Hildrum. 1999. On line NIR analysis of fat, water and protein in industrial scale ground meat batches. Meat Science 51:97-102.
- Valdés E.V. and J.D. Summers. 1986. Determination of crude protein and fat in carcass and breast muscle samples of poultry by near infrared reflectance spectroscopy. Poultry Science 65:485-490.
- Valdés E.V. ; J.L. Atkinson, J.W. Hilton and S. Leeson. 1989. Near infrared reflectance analysis of fat, protein and gross energy of chicken and rainbow trout carcasses. Canadian Journal of Animal Science 69:1087-1090.
- Ward E. C., T. Arnella and J.I. Hildebrand. 1995. Consumer perceptions of lamb compared with other meats. Sheep & Goat Research Journal 11(2):64-70.
- Westerhaus, M.O. 1989. Interpretation of regression statistics. En: Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS): analysis of forage quality. Pp 39-40. G.C. Marten, J.S. Shenk, and F.E. Barton II, (eds).. USDA, Agric. Handbook N°643
- Williams P. and D. Sobering. 1996. How do we do it: a brief summary of the methods we use in developing near infrared calibrations. En: "Near Infrared Spectroscopy: The future Waves." Pp. 185 188 Ed. A.M.C. Davies and Phil Williams.
- Williams P. 2001. Implementation of near-infrared technology. En: Near Infrared Technology in the agricultural and food industries. Pp. 145-169. Ed. Phil Williams and Karl Norris.
- Windham W.R., F.E. Barton II and K.C. Lawrence.1995. Influence of sample preparation and sampling on NIT analysis of fat and moisture in ground beef. En: "Leaping Ahead with near infrared spectroscopy." pp.287-290. Ed. G.D. Batten, P.C. Flinn, L.A. Welsh and A.B. Blakeney.
- Windham W.R., F.E. Barton II, B.G. Lyon and C.E. Lyon. 1996. Classification of prior temperature history of chilled chicken breasts by near infrared spectroscopy. En: "Near Infrared Spectroscopy: The future Waves." Pp. 596-600. Ed. A.M.C. Davies and Phil Williams.
- Windham W.R., Martens D.R. y F.E. Barton. 1989. Protocols for NIRS calibration: sample selection equation development and validation. En: Near Infrared spectroscopy (NIRS): Analysis of forage quality. Ed. USDA ARS. Agriculture Handbook. 643: 96-103
- Wisner-Pedersen J. 1994. Química de los tejidos animales. Parte 5 - Agua. En: Ciencia de la carne y de los productos carnicos. pp 125-138. J. Price y B.S. Schweigert (eds). Editorial Acribia S.A..

Workman J., 1992. NIR Spectroscopy Calibration Basics. En "Handbook of Near Infrared Analysis." pp.247-279. Ed. Donald A. Burns y Emil W. Ciurczak. Marcel Dekker, Inc. New York

Wrigley C.W. 1999. Potential methodologies and strategies for the rapid assessment of feed-grain quality. Australian Journal of Agricultural Research 50:789-805.

Yamashita, H., H. Takamura and T. Matoba. 1994. Effect of non-peptide and non-protein nitrogen compounds for the determination of protein content by near infrared spectroscopy. Journal of Near infrared Spectroscopy 2:145-151.