

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

**“Implantación de la tecnología NIRS en
aplicaciones in-situ como herramienta de
apoyo a las decisiones en el sector primario”**

**TRABAJO FIN DE MASTER
POR**

Cristina Casal Martínez

Julio, 2013





Master en Biotecnología Alimentaria
Universidad de Oviedo
C/Julán Clavería s/n. 33071 Oviedo. España



PROFESOR TUTOR:

Dra. Dña. Begoña de la Roza Delgado (SERIDA)

Dra. Dña. Ana Soldado Cabezuelo (SERIDA)

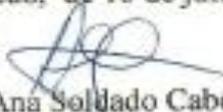
CERTIFICA:

Que Dña. Cristina Casal Martínez ha realizado bajo mi dirección el Trabajo Fin de Master al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Master Universitario en Biotecnología Alimentaria, 7ª promoción curso 2012-2013.


Dña. Begoña de la Roza Delgado



Oviedo, de 16 de julio 2013


Dña. Ana Soldado Cabezuelo

VºBº



Mario Díaz Fernández

Coordinador del Master en Biotecnología Alimentaria

AGRADECIMIENTOS

A Begoña de la Roza y Ana Belén Soldado, por todo lo enseñado, el tiempo dedicado, preocupación y ayuda continua en el desarrollo de este trabajo.

A Adela y Sagrario por ayudarme en los momentos de obcecación.

A Isa y a Cris por su taza de té diaria y por hacerme desconectar todos los días un rato.

A todo el Área de Nutrición, Pastos y Forrajes del SERIDA por el trato recibido.

A todos mis compañeros del Máster por hacer cada día más ameno este año de intenso estudio y dedicación.

A todos los profesores del Máster por compartir sus conocimientos con nosotros.

A mi familia por apoyarme siempre y animarme cuando la duda y el temor asoman.

A Héctor por estar siempre ahí.

A todos, GRACIAS

ÍNDICE

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABLAS	V
1 INTRODUCCIÓN	1
2 CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y/O EXPERIMENTALES	5
2.1 El ensilado	5
2.1.1 El ensilado de maíz forrajero	6
2.1.2 El proceso del ensilaje	7
2.1.3 Calidad de los ensilados	10
2.1.4 Análisis químico de los ensilados	12
2.1.5 Aplicación de la reflectancia en el infrarrojo cercano al análisis de los ensilados	13
2.2 Espectroscopía NIR	14
2.2.1 Introducción a la Espectroscopía NIR	14
2.2.2 Bases teóricas de la absorción NIR	16
2.2.3 Instrumentación y modos de análisis	19
2.2.4 Equipos NIR de reducido tamaño y portátiles	25
2.2.5 Quimiometría y su aplicación en la tecnología NIRS	29
2.2.6 Etapas del desarrollo de modelos de calibración multivariantes	30
2.2.7 Clonación / estandarización de instrumentos y transferencia de calibraciones	40
2.2.8 Espectroscopía NIR en el control de calidad de ensilados de maíz	44
3 MATERIAL Y MÉTODOS	46
3.1 Muestras y Análisis NIRS	46
3.2 Instrumentos y análisis NIRS	48
3.2.1 Equipo monocromador FOSS NIRSystem 6500 SY-II	48

3.2.2	Corona 45 VisNIR 1.7 de red de diodos Ingaes. Equipo Satélite 1	49
3.2.3	Phazir 1624 Handheld NIR. Equipo Satélite 2	51
3.3	Análisis Químico de referencia	52
3.4	Desarrollo y evaluación de calibraciones NIRS	54
3.4.1	Tratamiento quimiométrico de los datos	55
3.5	Clonación / Estandarización de instrumentos y transferencia de calibraciones	62
3.5.1	Transferencia de Ecuaciones de calibración NIRS	62
3.5.2	Muestras empleadas en la estandarización	63
4	RESULTADOS EXPERIMENTALES	67
4.1	Desarrollo y evaluación de las ecuaciones de calibración existentes	67
4.1.1	Predicción del colectivo de Validación externa	69
4.2	Desarrollo de nuevos modelos de calibración	71
4.2.1	Validación de las ecuaciones de predicción desarrolladas	76
4.3	Clonación / estandarización de instrumentos y transferencia de calibraciones	78
4.3.1	Selección de los colectivos de estandarización	78
4.3.2	Estandarización / Clonación	80
4.3.3	Predicción de los colectivos de validación tras la estandarización	81
5	ESTUDIO ECONÓMICO	91
5.1	Equipamiento científico técnico necesario	91
5.1.1	Corona 45 VisNIR 1.7	91
5.1.2	Phazir 1624 Handheld NIR	92
5.2	Desarrollo del Modelo de Calibración	92
5.3	Análisis NIRS vs Análisis Químico	92
6	CONCLUSIONES	94
7	SÍMBOLOS	96
8	BIBLIOGRAFÍA	99

RESUMEN

El presente trabajo fin de Máster, trata de poner en valor el trasvase de conocimientos y tecnologías que implementen valor añadido en las producciones y sus comercializaciones, mediante la puesta a punto de una sistemática para la estimación “*on-line/on-site*” y en tiempo real de los parámetros nutritivos de los ensilados de maíz. Para ello se parte de las bibliotecas espectrales existentes en el SERIDA fruto de muchos años de trabajo de investigación y su principal objetivo es la implantación de la tecnología NIRS en las aplicaciones “*on-line, on-site o in-situ*”, como herramienta de apoyo a las decisiones en el sector primario. Para ello, se han utilizado tres instrumentos NIRS, un equipo de laboratorio (*at-line*: Foss-NIRSystems 6500), dos portátiles (*on-site*: Corona 45 VisNIR 1.7. y Phazir 1624 Handheld NIR) y un total de 322 muestras de ensilado de maíz en su forma intacta. Se han desarrollado modelos de calibración robustos, en rango de longitudes de onda adaptados a cada equipo Satélite: 1) 400-1098, 1100-1710 nm, 2) 1100-1710 nm, 3) 1596-2396 nm y 4) 1595-2090 nm, y se han evaluado diferentes tratamientos matemáticos en primera y segunda derivada con pre-tratamiento de corrección de *scattering Standard Normal Variate and Detrend* (SNVD). También se desarrollaron diferentes matrices de estandarización, basadas en el algoritmo de Shenk y Westerhaus, para la optimización de la transferencia de resultados existentes en las bases de datos espectrales existentes en equipos de laboratorio “*at-line*”, a equipos “*on-site*” y portátiles. Y finalmente se han evaluado las estrategias de transferencia, seleccionando las más adecuadas para el fin propuesto y confirmando el éxito del objetivo propuesto. El Phazir fue estandarizado con una matriz constituida por 60 muestras de ensilado de maíz, y para el equipo Corona Vis NIR 1.7, los mejores resultados se obtuvieron cuando la estandarización se realizó con 20 muestras.

ABSTRACT

Three instruments are involved in this study: a NIRS laboratory equipment (at-line: Foss-NIRSystems 6500), two portable NIRS (on-site: Corona 45 VisNIR 1.7., and Phazir 1624 Handheld NIR) and a total of 322 corn silage samples, all samples were analysed in fresh, without any treatment. It was necessary to developed robust calibration models in wavelength range reduced and adapted to each satellite instrument: 1) 400-1098, 1100-1710 nm, 2) 1100-1710 nm, 3) 1596-2396 nm and 4) 1595-2090 nm. Calibration models have been evaluated applying different mathematical treatments, first and second derivative, and using Standard Normal Variate and Detrend (SNVD) as pretreatment for scatter correction. Different matrices have been evaluated for standardization process, all of them based on Shenk and Westerhaus algorithm. Finally all transference strategies have been evaluated, selecting the most suitable for the purpose and confirming the success of the objective Phazir was standardized with a matrix consisting of 60 samples of corn silage, and the team Corona Vis NIR 1.7, the best results were obtained when the standardization was performed with 20 samples

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Espectro electromagnético	16
Figura 2.2. Vibraciones moleculares entre dos átomos con respecto a un átomo.	17
Figura 2.3. Bandas de absorción en la región NIR (Murray, 2004)	19
Figura 2.4. Esquema básico de un espectrofotómetro con sistema monocromador.....	21
Figura 2.5. Tipos de instrumentos NIRS	22
Figura 2.6. Esquema de modalidades de análisis NIRS de reflectancia, transmitancia y doble transmisión (adaptada de Shenk y Westerhaus, 1995a).	23
Figura 2.7. Esquema de modalidad de análisis NIRS de interactancia-reflectancia (reproducida de Slaughter, 1995).	24
Figura 2.8. Filtros basados en sistemas electromecánicos (MEMS)	27
Figura 2.9. Equipamientos NIRS portátiles disponibles en el mercado	27
Figura 2.10. Representación tridimensional de la población de muestras según la distancia de Mahalanobis global	36
Figura 3.1. Descripción de los colectivos muestrales empleados en el estudio.	48
Figura 3.2. Equipo FOSS-NIRSystems 6500 SY-II.....	49
Figura 3.3. Equipo Corona 45 VisNIR 1.7 en posición “up-view”	50
Figura 3.4. Equipo Corona 45 VisNIR 1.7 en posición "down-view"	51
Figura 3.5. Presentación de la muestra al Equipo Corona 45 VisNIR 1.7 (Carl Zeiss) en posición invertida o “down-view”.	51
Figura 3.6. Equipo Phazir 1624 Handheld NIR.....	52
Figura 3.7. Transferencia Master-Satélite	63
Figura 3.8. Colectivos de Estandarización y Validación.....	64
Figura 4.1. Representación gráfica de los espectros tomados por el equipo Master y el equipo Corona antes y después de estandarizar (Rango 1100-1710 nm).....	88
Figura 4.2. Representación gráfica de los espectros tomados por el equipo Master y por el equipo Corona tras ser estandarizado (Rango 1100-1710 nm).	88

Figura 4.3. Representación gráfica de los espectros tomados por el equipo Master y por el equipo Phazir antes y después de ser estandarizado (Rango 1596-2396 nm)... 89

Figura 4.4. Representación gráfica de los espectros tomados por el equipo Master y por el equipo Phazir antes y después de ser estandarizado (Rango 1596-2090 nm)... 89

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1. Valores nutricionales de ensilados de maíz en función del % MS	7
Tabla 2.2. Métodos de análisis de la fracción de hidratos de carbono.	13
Tabla 2.3. Detectores comúnmente empleados en equipos NIRS (Workman, 2004). ...	25
Tabla 2.4. Avances tecnológicos para la incorporación de partes no móviles en la selección de la longitud de onda espectral de equipos NIRS.....	26
Tabla 3.1. Ecuaciones de calibración desarrolladas	61
Tabla 3.2. Ficheros de estandarización desarrollados y colectivos de validación empleados.....	66
Tabla 4.1. Ecuaciones de calibración desarrolladas para el Rango 400-1098, 1100-2500 nm, rango del equipo Master.....	67
Tabla 4.2. Predicción de parámetros nutritivos por los Modelos de calibración desarrollados	68
Tabla 4.3. Predicción de parámetros nutritivos del colectivo de validación (Set 4) tras aplicar la ecuación 1_{Master}	70
Tabla 4.4. Predicción de parámetros nutritivos del colectivo de validación (Set 4) tras aplicar la ecuación 2_{Master}	70
Tabla 4.5. Predicción de parámetros nutritivos del colectivo de validación (Set 4) tras aplicar la ecuación 3_{Master}	70
Tabla 4.6. Estadísticos de predicción del colectivo de calibración para el Rango 400-1098, 1100- 1710 nm (Rango Corona Completo).....	73
Tabla 4.7. Estadísticos de predicción del colectivo de calibración para el Rango 1100-1710 nm (Rango Corona Trimado).....	74
Tabla 4.8. Estadísticos de predicción del colectivo de calibración para el Rango 1596-2396 nm (Rango Phazir Completo)	74
Tabla 4.9. Estadísticos de predicción del colectivo de calibración para el Rango 1596-2090 nm (Rango Phazir Trimado)	75
Tabla 4.10. Mejores ecuaciones para los distintos rangos.....	76
Tabla 4.11. Predicción del colectivo muestral del Set 2 recogido por el equipo Master, equipo Satélite 1 y equipo Satélite 2	77
Tabla 4.12 Predicción del colectivo muestral del Set 4 recogido por el equipo Master equipo Satélite 1 y equipo Satélite 2	78

Tabla 4.13. Evaluación de los métodos de homogeneización y posición del equipo mediante el estadístico RMS(C) para el Rango 400-1098,1100-1710 nm.....	79
Tabla 4.14. Evaluación de los métodos de homogeneización y posición del equipo mediante el estadístico RMS(C) para el Rango 1100-1710 nm.....	80
Tabla 4.15. Evaluación de los métodos de homogeneización y posición del equipo mediante el estadístico RMS(C) para el Rango 1596-2396 nm.....	80
Tabla 4.16. Evaluación de los métodos de homogeneización y posición del equipo mediante el estadístico RMS(C) para el Rango 1596-2090 nm.....	80
Tabla 4.17. Procesos de estandarización y algoritmos desarrollados.	81
Tabla 4.18. Predicción de los colectivos de validación Set 2 y Set 4 recogidos en el rango 400-1098, 1100-1710 nm, tras el proceso de estandarización A.	82
Tabla 4.19. Predicción de los colectivos de validación Set 2 y Set 4 recogidos en el rango 1100-1710 nm, tras el proceso de estandarización A.....	83
Tabla 4.20. Predicción de los colectivos de validación del Set 2 y del Set 4 recogidos en el rango 1596-2396 nm, tras el proceso de estandarización A.....	84
Tabla 4.21. Predicción del colectivo de validación del Set 4 en el rango 1100-1710 nm, tras el proceso de estandarización B.	85
Tabla 4.22. Predicción del colectivo de validación del Set 4 en el rango 1596-2396 nm, tras el proceso de estandarización B.	85
Tabla 4.23. Predicción del colectivo de validación del Set 4 en el rango 1596-2090 nm, tras el proceso de estandarización B.	85
Tabla 4.24. Predicción del colectivo de validación del Set 4 antes y después de la estandarización B.	86
Tabla 4.25. Estadísticos de validación externa obtenidos al predecir el Set 4 con el modelo de calibración 1,5,5,1. Equipo Corona (Rango 1100-1710 nm)	87
Tabla 4.26. Estadísticos de validación externa obtenidos al predecir el Set 4 con el modelo de calibración 1,5,5,1. Equipo Phazir (Rango 1596-2090 nm).....	87

1 INTRODUCCIÓN

La práctica de la alimentación animal basada en el conocimiento de las necesidades del animal y el valor nutritivo para una determinada producción es un concepto limitado, ya que el objetivo de alimentar animales debe ser abordado desde un punto de vista más amplio.

La calidad de la alimentación animal es esencial; influye de manera directa en las producciones de origen animal, y por lo tanto, en la salud humana. Es por ello que, desde hace algunos años, la nutrición animal se ha convertido en uno de los pilares básicos de la seguridad alimentaria, puesto que tanto la producción como la manipulación de alimentos que se suministran a los animales impacta de forma directa sobre la salud del ganado y en consecuencia, sobre las producciones animales. En definitiva, la seguridad de la alimentación animal es un requisito previo y esencial para la seguridad del alimento humano.

Los recursos forrajeros constituyen el fundamento de la producción en base a rumiantes. La producción de estos recursos depende de ciclos biológicos estacionales que determinan periodos deficitarios en su disponibilidad o calidad, lo que constituye un factor regulador de la productividad de los sistemas ganaderos (Argamentería *et al.*, 1997). Por ello, el conocimiento de la calidad de los forrajes en general y del ensilado en particular, de forma rápida y fiable es un tema relevante tanto para técnicos como productores.

En el siglo pasado (1859), en la estación experimental de Weende (Alemania), trabajaban los investigadores Hennenberg y Stohman. Su objetivo era diseñar un esquema de análisis de alimentos para animales. Basándose en las propiedades físicas y químicas de los alimentos, idearon unos estimadores de la composición nutritiva que denominarían principios nutritivos. Este sistema, habitualmente, es complementado en los alimentos forrajeros con un análisis específico de las fracciones menos digestibles del alimento, la fibra, con el análisis de Van Soest (1963). Este análisis permite hacer una diferenciación más exacta de cada uno de los componentes englobados en la fibra bruta en el análisis inmediato de los alimentos, logrando como resultado la fibra neutro y ácido detergente (FND y FAD). Sin embargo, estos métodos tradicionales de análisis

así como los realizados por la más moderna instrumentación demandan tiempo, mano de obra y son costosos.

La creciente demanda de la sociedad con respecto a los productos de origen animal, la tipificación de los mismos, las exigencias medio-ambientales y el bienestar animal, todas ellas plasmadas en numerosas reglamentaciones; unido al incremento de conocimientos científicos de la producción animal, la disponibilidad de nuevos alimentos y tecnología, las posibilidades de control y automatización de los procesos productivos, etc., hace cada vez más necesario, el trabajar intensamente en nuevos planteamientos que permitan cumplir con las mencionadas demandas (Garrido *et al.*, 1996).

Desde la década de los 70 del siglo pasado, emerge un nuevo concepto de análisis basado en las propiedades ópticas de los alimentos y en particular la aplicación de la espectroscopía de reflectancia en el Infrarrojo Cercano (NIRS), como alternativa a los métodos físico-químicos y biológicos tradicionales que permite obtener estimaciones seguras y muy rápidas de la composición nutricional de alimentos. La utilidad del NIRS para la caracterización de alimentos y productos de forma instantánea, hace que esta técnica tenga un enorme potencial para su implantación como sistema de control analítico en un Servicio Integral de Alimentación Animal. Así, entre las numerosas ventajas que presenta la espectroscopía NIR (Garbisu, 2005; de la Roza, 2009) frente a técnicas más convencionales habría que destacar los siguientes atributos:

- Es una técnica no invasiva y no destructiva de la muestra.
- Las necesidades de preparación de la muestra, previas a la analítica, son nulas o muy pequeñas.
- El mantenimiento del equipo es mínimo, se reduce a la sustitución de la fuente de iluminación una vez finalizada su vida útil.
- Alta velocidad de respuesta: una vez obtenida la ecuación de predicción, se puede llevar a cabo la determinación de todos aquellos parámetros analíticos para los que haya sido calibrado el equipo en aproximadamente 1 minuto.
- Capaz de producir información analítica sobre constituyentes de declaración obligatoria (p.ej. humedad, proteína, grasa, etc.) y no obligatoria, pero de interés nutricional (p.ej. factores antinutritivos, aminoácidos, valor energético, ingestibilidad, etc.).

- Bajo coste por muestra.
- No contaminante, ya que no utiliza reactivos químicos ni produce residuo alguno.
- Alta repetibilidad y reproducibilidad de los análisis NIRS, superiores a los obtenidos tradicionalmente en los análisis químicos y/o biológicos.
- Facilidad de uso en rutina.

A pesar de su rapidez y otras ventajas, la tecnología NIRS presenta una serie de limitaciones:

- Su uso más difundido es, como técnica indirecta (necesidad de calibración).
- Influenciada por factores no químicos (temperatura, humedad, tamaño de partícula, etc.).
- No bien conocida, incluso a nivel de la comunidad científica y académica.
- Alto coste de implantación (proyecto, instrumentación, formación, calibraciones, etc.).
- Generalmente, un proyecto de implantación es de 1,5 a 2 años y necesita asesoría científico-técnica especializada.
- Requiere trabajar con un elevado número de muestras y/o galerías espectrales.
- Necesita de la transferencia de ecuaciones entre equipos.
- En ocasiones, las muestras han de ser transportadas al laboratorio con el consecuente retraso en el muestreo y resultado analítico, lo que en muchas ocasiones no posibilita una respuesta inmediata de la calidad del producto (Soldado *et al.*, 2013).

Al inicio de la década de los 90, tras comenzar lo que se conoce como segunda generación de instrumentación NIRS, se abrieron enormes expectativas respecto a las posibilidades de incorporación de la tecnología NIRS *on-line*, dentro de los procesos de producción agroalimentaria. Sin embargo, estos sistemas tuvieron una casi nula penetración en el sector de alimentación animal, debido a las limitaciones de los propios equipos (Jensen, 1993, Garrido *et al.*, 1996).

El creciente interés, suscitado en los últimos tiempos, por el desarrollo de aplicaciones *on-line* y *on-site*, se debe en gran parte a los avances acaecidos en instrumentación, así como a las crecientes presiones de la industria y de la sociedad para incorporar sistemas ágiles de aseguramiento de la calidad y de trazabilidad a lo largo de

toda la cadena de producción alimentaria (desde la alimentación animal hasta el producto final para el consumo humano).

El desarrollo de equipos NIRS portátiles permite solventar las limitaciones de esta tecnología y ha posibilitado el análisis de las muestras *in-situ* sin necesidad de transportarlas al laboratorio. El desarrollo, evaluación e implantación de estas tecnologías NIRS *on-site* permitirá incrementar la eficacia de la evaluación de parámetros de interés y proporcionará información relevante para la toma de decisiones en tiempo real, como herramienta de apoyo.

Hasta la fecha, existe una amplia información sobre la utilización de equipos *at-line* para la cuantificación de parámetros nutritivos relativos a la calidad y seguridad alimentaria. Sin embargo, se hace necesaria una mayor profundización en el conocimiento de equipos *on-line* y *on-site*, así como en la posibilidad de extraer la información espectral de interés de las muestras a analizar.

En colaboración con el Área de Nutrición, Pastos y Forrajes del SERIDA (Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario del Principado de Asturias), el objetivo del presente trabajo fin de Máster ha consistido en evaluar la posibilidad de transferencia de ecuaciones de calibración desarrolladas en equipos *at-line* a instrumentos *on-site* para la evaluación de parámetros nutritivos y fermentativos *in-situ* de ensilados de maíz sin pretratamiento de la muestra, como estrategia de mejora en la toma de decisiones en las explotaciones ganaderas. Por lo que los objetivos específicos del presente trabajo son los siguientes:

- I. Evaluación de la transferencia de una biblioteca espectral de un equipo de laboratorio (*at-line*) (FossNIRSystems 6500) a equipos *on-site*, *in-situ/in field* (Corona 45 VisNIR 1.7 y Phazir 1624 Handheld NIR).
- II. Estandarización / clonación de los equipos *on-site* e *in-situ* (satélites) frente al equipo *at-line* (Master) para la evaluación de parámetros nutricionales y fermentativos en ensilados de maíz.
- III. Evaluar la viabilidad de los modelos quimiométricos desarrollados mediante validación externa.

2 CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y/O EXPERIMENTALES

2.1 EL ENSILADO

Forraje es un término de uso común, tanto a nivel ganadero como a nivel técnico y científico que encierra una amplia variabilidad conceptual. De hecho, no existe una definición ampliamente aceptada y hay una gran variación en la amplitud de alimentos que pueden ser considerados dentro de este término (Wilkins, 2000).

Según el *Forage and Grazing Terminology Committee* (1991), un forraje es toda parte comestible de la planta, distinta al grano separado, que puede proveer alimento a los animales en pastoreo o que puede ser cosechada para su alimentación. Según la clasificación de Barnes y Baylor (1995), el término forraje incluiría las siguientes clases: hierba, heno, ensilaje, las fracciones comestibles de especies arbustivas y arbóreas, así como la paja. En la actualidad, debido a su uso generalizado, habría que incluir las mezclas comúnmente empleadas en las explotaciones ganaderas, en las que el forraje interviene en una proporción importante (40-60%) (Ferret, 2003).

A través de los años el hombre ha buscado alternativas que le permitan hacer más eficientes los programas de alimentación y conservación de forrajes. El forraje fresco de gramíneas, leguminosas, o más en concreto, de cultivos como maíz, trigo y alfalfa, puede ser conservado por medio del ensilaje.

En muchos países los forrajes ensilados son muy apreciados como alimento animal. En Europa, los agricultores de países como Holanda, Alemania y Dinamarca, almacenan más del 90 % de sus forrajes como ensilaje. Incluso en países con buenas condiciones climáticas para la henificación como Francia e Italia, cerca de la mitad del forraje es ensilado (Wilkinson *et al.*, 1996).

El ensilado es un proceso de conservación de forraje u otros alimentos con elevado contenido en humedad, al abrigo del aire, la luz y la humedad exterior, mediante acidificación, que impide la continuidad de la vida vegetal y la actividad microbiana indeseable (Argamentería *et al.*, 1997). Esta acidificación, medible a partir del pH (a menor pH, más acidez), se consigue mediante fermentaciones que tienen lugar en el forraje segado.

El alimento prensado en el interior del silo experimenta una serie de transformaciones bioquímicas que permiten su conservación en el tiempo (Cañeque y Sancha, 1998). Éstas pueden ser debidas a la acción de los enzimas de la planta y/o bien a la acción de los microorganismos. Los enzimas de la planta están implicados en los procesos respiratorios y la descomposición de glúcidos y proteínas en el forraje segado. Mientras que los microorganismos serán los responsables de los procesos fermentativos del ensilado.

El fin esencial del ensilado es conservar los forrajes con un mínimo de pérdidas de materia seca y de nutrientes, manteniendo una buena apetecibilidad por el ganado y sin que se produzcan durante el proceso sustancias tóxicas para la salud animal. Pese a que el ensilaje tiene una serie de condicionantes y problemas, resulta preferible a otros métodos de conservación, ya que permite una mayor independencia ante condiciones meteorológicas adversas, pudiendo además emplearse en forrajes como el maíz u otros productos. Además, facilita la mecanización de las explotaciones, ya que el proceso de recolección, realización y distribución del ensilado, puede ser íntegramente mecanizado (de la Roza *et al.*, 1999b).

2.1.1 EL ENSILADO DE MAÍZ FORRAJERO

En muchas áreas geográficas se cultiva maíz forrajero para suministrarlo como alimento, bajo forma de ensilado. Esto se debe a que, en la actualidad, se impone utilizar forrajes que sean capaces de ofrecer una buena producción en un corto periodo de tiempo (Somarribas, 2007).

El maíz forrajero destaca por las elevadas producciones que alcanza. En condiciones normales de cultivo, se pueden obtener en torno a 15-16 toneladas de materia seca por hectárea en 3,5 - 4 meses a partir del mes de mayo (Martínez y Pedrol, 2006). Además, el maíz forrajero es la cosecha más apta para ensilar, puesto que se conserva muy bien sin adición de aditivos ni control de humedad, resultando un producto muy apetecido por el ganado (Domenech *et al.*, 1997; de la Roza *et al.*, 2012).

Para que el ensilado de maíz sea rico en energía, es necesario recolectarlo en un adecuado estado de desarrollo del grano ya que la mitad de la materia seca de la planta procede de éste, que a su vez es dos veces más rico en energía que el tallo y las hojas.

Desde el punto de vista nutritivo, el ensilado de maíz es un alimento de elevado valor energético, bajo valor proteico y bajo contenido en minerales. El contenido en almidón es elevado, no siendo un forraje que aporte un alto contenido en carbohidratos estructurales. Esto contribuye a reducir las raciones alimenticias, minimizando el consumo de pienso.

Los valores nutricionales habituales en un ensilado de maíz se recogen en la tabla que figura a continuación (Calsamiglia, 2004).

Tabla 2.1. Valores nutricionales de ensilados de maíz en función del % MS

MS (%)	pH	Cenizas	PB	NH4	EE	FB	FND	FAD	Almidón
<20	3,80	6,40	9,37	0,89	4,54	28,21	55,22	32,58	10,50
20-25	3,73	6,26	9,20	0,25	4,35	27,13	52,38	30,29	12,63
25-30	0,76	5,43	8,28	0,21	4,40	23,17	47,63	26,17	24,22
30-35	3,80	4,94	7,62	0,23	4,20	20,98	44,53	23,94	28,23
>35	3,89	4,80	7,58	0,23	3,76	19,71	41,38	22,66	33,30

MS: materia seca; PB: Proteína Bruta; EE: Extracto etéreo; FB: Fibra Bruta; FND: Fibra Neutro Detergente; FAD: Fibra Ácido Detergente

2.1.2 EL PROCESO DEL ENSILAJE

Una vez que el material fresco ha sido almacenado, compactado y cubierto en el silo con el fin de excluir el aire, el proceso del ensilaje se suele dividir en cuatro etapas (Weinberg y Muck, 1996; Merry *et al.*, 1997):

- Fase aeróbica: En esta fase, que sólo dura unas pocas horas, el oxígeno atmosférico presente en la masa vegetal disminuye rápidamente debido a la respiración de los materiales vegetales y a los microorganismos aerobios y anaerobios facultativos como las levaduras y las enterobacterias. Además hay una actividad importante de varios enzimas vegetales, como las proteasas, siempre y cuando el pH se mantenga en el rango normal para el jugo del forraje fresco (pH 6,5-6,0).
- Fase de fermentación: Esta fase tiene lugar en condiciones anaeróbicas. Dura desde varios días hasta semanas, dependiendo de las características del material ensilado y de las condiciones en el momento del ensilaje. Los principales procesos

fermentativos que acontecen durante el ensilado son los que a continuación se describen:

- Fermentación acética: Muertas las células vegetales (de la Roza, 2005), se desarrollan bacterias coliformes pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, que producen ácido acético a partir de ácido láctico. Su actividad requiere una temperatura óptima de 18-25 °C y desaparece al alcanzarse un pH de 4,2. Las bacterias coliformes solamente presentan actividad en la fase inicial del ensilado, siendo reemplazadas progresivamente por cocos lácticos (*Streptococcus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*).
- Fermentación láctica: Corre a cargo de bacterias lácticas que degradan los azúcares y otros carbohidratos solubles presentes en el forraje hasta ácido láctico. En este proceso, diversos cocos lácticos son sustituidos por *Lactobacillus*, a excepción de los *Pediococcus*, que son más tolerantes a las condiciones de acidez que los otros grupos. Las bacterias que llevan a cabo esta fermentación necesitan un pH comprendido entre 3 y 4, y condiciones de anaerobiosis. Finalmente, su acción es inhibida por escasez de azúcares solubles y acumulación de ácido láctico. Cuando esto ocurre, el forraje queda estabilizado y se ha convertido en ensilado.
- Fermentaciones secundarias: Se trata de procesos bacterianos no deseables y que es preciso minimizar. La más peligrosa es la fermentación butírica a cargo de bacterias del género *Clostridium*. Se desarrollan entre 20-40° C, en competencia con las bacterias lácticas, pero necesitan un pH superior a 4. Algunas especies proteolíticas degradan el nitrógeno proteico del forraje hasta ácido butírico y amoníaco. Otras (sacarolíticas), degradan los azúcares y el ácido láctico hasta ácido butírico, además de acético, propiónico, etanol, butanol y otros metabolitos en menor cantidad. El amoníaco producido, tiende a elevar el pH en el silo, lo que favorece la proliferación de especies del género *Bacillus*, que generan aún más amoníaco. Cuando el pH en el silo alcanza valores superiores a 5, se acelera el desarrollo de éstos y otros microorganismos también nocivos que realizan la putrefacción del forraje almacenado.
- Fermentación alcohólica: a cargo de levaduras, con producción de etanol y otros alcoholes. Hay que procurar reducirla todo lo posible favoreciendo la

anaerobiosis, pues aunque afecta poco al proceso de ensilado, puede alterar su conservación o incluso darse una excesiva formación de alcoholes, con peligro de toxicidad para el ganado.

Si la fermentación se desarrolla con éxito, la actividad de las BAL proliferará y se convertirá en la población predominante. A causa de la producción de ácido láctico y otros ácidos, el pH descenderá a valores entre 3,8 y 5,0.

- Fase estable: Mientras se mantenga el ambiente anaeróbico ocurren pocos cambios. La mayoría de los microorganismos presentes en la fase de fermentación reducen su presencia, mientras que algunos microorganismos acidófilos sobreviven este periodo en estado inactivo; y otros, como clostridios y bacilos, sobreviven en forma de esporas. Sólo algunos enzimas como las proteasas y carbohidrasas, además de microorganismos especializados como *Lactobacillus buchneri*, que toleran ambientes ácidos, continúan activos pero a menor ritmo.
- Fase de deterioro aeróbico: Esta fase comienza con la apertura del silo y la exposición del ensilaje al aire. Esto es inevitable cuando se requiere extraer y distribuir el ensilaje, pero puede ocurrir antes de iniciar la explotación por daño de cobertura del silo. Este periodo de deterioro puede dividirse en dos etapas. La primera se debe al inicio de la degradación de los ácidos orgánicos que conservan el ensilaje, por acción de las levaduras y ocasionalmente por bacterias que producen ácido acético. Esto induce un aumento en el valor de pH, lo que permite el inicio de la segunda etapa de deterioro, en la que se constata un aumento de la temperatura y actividad de microorganismos que deterioran el ensilaje, como algunos bacilos. En esta etapa, también influye la actividad de otros microorganismos anaerobios facultativos, como mohos y enterobacterias.

Para evitar fracasos durante el proceso del ensilaje, es importante controlar y optimizar al máximo cada fase. Generalizando, las condiciones básicas a potenciar para obtener un buen ensilado son las siguientes (de la Roza *et al.*, 1999).

- Ausencia de aire en el interior del silo
- Suficiente contenido en azúcares
- Bajada rápida del pH del forraje

Un mal ensilado puede producir resultados negativos, tales como pudrición, mermas en el rendimiento, baja palatabilidad y baja producción por parte del animal.

2.1.3 CALIDAD DE LOS ENSILADOS

La calidad de un ensilado depende por una parte de su valor nutritivo, que está ligado directamente a su composición química (fibra, materias nitrogenadas, minerales, hidratos de carbono, etc.) y por otra de la calidad de conservación, que viene definida por los productos finales de las fermentaciones que tienen lugar en el mismo.

La calidad, también puede ser evaluada visualmente, pues aunque esta información no es precisa, en conjunción con el análisis químico, factores como el olor, color o apariencia general puede suministrar una buena indicación del valor nutritivo esperado. También el aspecto y la composición química antes de ensilar nos pueden dar una idea de la futura calidad del ensilado (Cañete y Sancha, 1998).

Diversos componentes que tienen un sentido nutricional deben considerarse para efectuar la valoración energética y estabilidad del ensilado (Argamentería, *et al.*, 1997). El análisis químico del ensilado resulta más complejo que el de otros forrajes, ya que su valor nutritivo no solamente viene dado por su contenido en principios nutritivos y la digestibilidad de los mismos, sino que hay que evaluar si la fermentación ha sido correcta y si, por tanto, el ensilado va a ser estable.

- Indicadores de calidad nutritiva:

Para poder valorar un ensilado desde el punto de vista nutricional los parámetros a evaluar son pH, materia seca, cenizas, proteína bruta, fibra neutro detergente y estimación de la digestibilidad de la materia orgánica. En función de ellos, se puede efectuar la valoración energética y estabilidad del ensilado (Argamentería *et al.*, 1997).

- El pH de su jugo. Es un parámetro rápido e indicativo del tipo de fermentación que tuvo lugar y nos indica, por tanto, si disponemos de un alimento estable.
- La materia seca (MS) es el porcentaje del forraje que no es agua. Es importante de por sí y porque los demás componentes (excepto la digestibilidad) están expresados en función del porcentaje de materia seca.

- Las cenizas nos indican el contenido mineral. Si el porcentaje es alto, mayor del 15 % sobre MS, indica que hubo contaminación con tierra.
 - La proteína bruta (PB) es un parámetro importante debido a su influencia directa en la producción animal. Para ensilados de maíz planta entera, el contenido ha de estar comprendido entre 8 y 10 % sobre MS.
 - La fibra neutro detergente (FND) es la fracción del forraje que se corresponde a las paredes celulares y, está asociada, negativamente con la ingestión de materia seca. El porcentaje de FND se incrementa con el estado de madurez de los forrajes.
 - La digestibilidad define la proporción del alimento que es consumido y no es excretado en las heces y, por tanto, es digerido por el animal. Esta valoración se estima en el laboratorio, utilizando enzimas que simulan la digestión que tiene lugar con los microorganismos del rumen, ante la imposibilidad de que la medida sea realizada en el ganado.
- Indicadores de calidad fermentativa
- Estos parámetros fermentativos: nitrógeno amoniacal, nitrógeno soluble total, azúcares residuales, alcoholes, ácidos grasos volátiles y ácido láctico, aportan información sobre el proceso fermentativo que ha tenido lugar (Martínez *et al.*, 1998).
- N soluble y N amoniacal, como medida de la degradación proteica acontecida durante el proceso de ensilado.
 - Azúcares solubles residuales, cuya escasez en el jugo es indicativa de una correcta fermentación láctica.
 - Ácido láctico, como medida de la transformación de los azúcares presentes en el forraje y que contribuirá sustancialmente a la reducción de pH y a la estabilidad del ensilado.
 - Ácidos acético y butírico, deben estar ausentes o en cantidades despreciables. Son el resultado de fermentaciones inducidas por la presencia de bacterias coliformes que transforman el láctico en acético y de gérmenes butíricos, presentes en el estiércol, tierra y especies adventicias que degradan el nitrógeno

proteico del forraje en fermentación. En función de ellos, un ensilado se puede considerar bien fermentado cuando presenta las siguientes características, aunque hay diferentes baremos según países (INRA, 1981):

- ~ Alto contenido en ácido láctico: Superior al 1,5-3 %, referido a MS.
- ~ Contenido medio en ácido acético: 0,5-1 %, referido a MS.
- ~ Ausencia o trazas de ácido butírico.
- ~ Nitrógeno amoniacal respecto al nitrógeno total: Inferior al 5-10 %.
- ~ Nitrógeno soluble respecto al nitrógeno total: Inferior al 50 %.

2.1.4 ANÁLISIS QUÍMICO DE LOS ENSILADOS

Básicamente, el Sistema Weende o Análisis Inmediato de los alimentos, consiste en una estimación del fraccionamiento cuantitativo del material vegetal en: agua, materias minerales, proteínas más formas del nitrógeno no proteico, lípidos, carbohidratos estructurales más componentes orgánicos poco digestibles y carbohidratos de reserva más otros compuestos sin nitrógeno. Para ello se determinan en el laboratorio los siguientes principios nutritivos:

- Humedad
- Cenizas
- Proteína Bruta
- Extracto Etéreo o Grasa Bruta
- Fibra Bruta
- Materiales extractivos libres de Nitrógeno

Dadas las imprecisiones del esquema de Weende, Van Soest en 1963 desarrolló un modelo del fraccionamiento del material vegetal, con vistas a mejorar la predicción de la utilización digestiva. Para ello, consideró dos partes diferenciadas en la célula vegetal: el contenido celular o protoplasto, constituido por sustancias digestibles, y la pared celular, en la que se encuentran localizados los componentes menos digestibles y que pueden llegar incluso a dificultar la digestión de la celulosa (como la lignina). La separación de las dos fracciones se realiza mediante el uso de detergentes iónicos. Así, el contenido celular (constituido por sustancias hidrosolubles, lípidos, azúcares, ácidos orgánicos, pectinas, almidón, nitrógeno no proteico y proteínas) es soluble en detergente neutro, mientras que la fracción insoluble corresponde a los constituyentes de la pared

celular y se denomina fibra neutro detergente (FND). En esta fracción, a su vez, hay una parte soluble en detergente ácido (hemicelulosa y proteína) y otra fracción insoluble (celulosa, lignina, compuestos nitrogenados lignificados, cutina y la proteína alterada por el calor) que se denomina fibra ácido detergente (FAD). Los conceptos FND y FAD son valiosos de por sí y utilizados en la formulación de raciones para rumiantes, en que se precisa un nivel mínimo de ambos componentes.

Tabla 2.2. Métodos de análisis de la fracción de hidratos de carbono.

Weende	Principio Químico	Van Soest
Extractivos	AZÚCARES	CONTENIDOS CELULARES (Solubles)
Libres	ALMIDÓN	
Nitrógeno	PECTINAS	
	HEMICELULOSAS	FAD FND
	SOLUBLE	
	L I G N I N A En álcali	
Fibra	INSOLUBLE	
Bruta	CELULOSA	

2.1.5 APLICACIÓN DE LA REFLECTANCIA EN EL INFRARROJO CERCANO AL ANÁLISIS DE LOS ENSILADOS

El empleo de la espectrometría NIR para la determinación no destructiva de parámetros internos de calidad en alimentos está ampliamente extendido. Desde los años 60, con Karl Norris, como pionero de esta técnica para su uso en alimentos, numerosos han sido los artículos publicados en multitud de productos agroalimentarios.

Los alimentos representan muestras complejas que contienen agua, proteínas, grasas y carbohidratos como componentes mayoritarios. Por ello, la introducción de la reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) para el estudio y valoración de alimentos supuso un gran avance por su rapidez de respuesta y por ser una tecnología limpia que

no emplea reactivos ni genera residuo alguno, pudiendo alcanzar incluso una precisión superior a los métodos analíticos tradicionales (de la Roza *et al.*, 1999b y 2002). Este hecho pone de manifiesto la potencial aplicabilidad del NIRS como herramienta imprescindible en servicios analíticos a ganaderos.

Como se ha comentado, la calidad de un ensilado resulta de la interacción entre la naturaleza del material de origen, su composición química y el proceso de conservación, y viene dada por su contenido en principios nutritivos, la digestibilidad de los mismos y por su fermentación. Su caracterización por métodos tradicionales exige un proceso analítico largo y tedioso, por ello los atributos que aporta la tecnología NIRS, fundamentalmente el alto potencial de muestreo y su bajo coste de análisis, contribuyen a la implantación de un cambio radical en los procesos de análisis y control.

Sin duda, la técnica NIRS ha contribuido a la valoración rápida de los alimentos para el ganado permitiendo tomar decisiones rápidas, estratégicas y económicas que permiten decidir el tipo de suplementación más adecuada en cada momento (Deaville y Flinn, 2000).

2.2 ESPECTROSCOPIA NIR

2.2.1 INTRODUCCIÓN A LA ESPECTROSCOPIA NIR

El descubrimiento de la radiación en el infrarrojo cercano se debe a William Herschel (1800) cuando estudiaba el color responsable del calor de la luz solar, dentro del rango visible del espectro electromagnético. Para ello, equipado con un termómetro y un prisma con el que separar los colores de la luz solar, pudo apreciar un incremento de la temperatura al colocar el termómetro más allá de la región del color rojo del espectro visible. A esta radiación invisible la denominó radiación infrarroja (Herschel, 1800.)

Curiosamente, durante la primera mitad del siglo XX, apenas se prestó interés a la región del infrarrojo cercano del espectro electromagnético, debido principalmente a la presencia en sus espectros de absorción de bandas anchas, solapadas y de poca intensidad, que complicaban sobremanera la asignación de bandas a estructuras o grupos funcionales específicos.

No fue hasta la década de los 50, con la aparición de los primeros espectrofotómetros NIR, cuando se desarrollaron las primeras aplicaciones de esta región del espectro electromagnético. En 1954, W. Kaye asignó bandas espectrales de los correspondientes grupos funcionales en la región comprendida entre 700 y 3.500 nm, y mostró la posible aplicación analítica de la técnica en la determinación de agua y alcoholes, así como en el análisis de aminas e hidrocarburos (Kaye, 1954).

En los años 60, el grupo de investigación del Departamento de Agricultura de EEUU (USDA) dirigido por Karl Norris, utilizó la espectroscopía NIR para el estudio de muestras complejas de origen agroalimentario (Norris, 1964; Ben-Gera y Norris, 1968). Demostrando el gran potencial analítico de esta técnica, de gran aplicabilidad en multitud de sectores.

Gracias al desarrollo de nueva instrumentación con ópticas mejoradas, a partir de finales de los años 70 se hizo posible el registro de espectros de manera rápida y reproducible (Noble, 1995; Henry, 1999). Sin embargo, el auge de la espectroscopía NIR como técnica de análisis se ha dado en los años 80 y 90, impulsada por los grandes avances tecnológicos que acontecían y la expansión en el sector de la informática.

A diferencia de otras técnicas espectroscópicas, en el infrarrojo cercano no se generan picos aislados característicos de cada compuesto, sino que se da una superposición de bandas correspondientes a diferentes grupos funcionales. La incorporación de sistemas informáticos con mayor capacidad permitió obtener y almacenar gran cantidad de información espectral (Ciurczak, 2001; Mark, 1989). Todo ello, gracias a la posibilidad de extraer la información contenida en el espectro obtenido mediante técnicas quimiométricas de análisis multivariable.

Entre las múltiples aplicaciones de esta tecnología que se encuentran en la actualidad, se incluyen las relacionadas con los sectores agroalimentarios, la industria química, petroquímica y textil, medicina, farmacia, cosmética, biología y medio ambiente. En lo que respecta a industrias agrarias y alimentarias, la tecnología NIRS se ha venido utilizando desde hace tiempo para el análisis y control de numerosos productos tales como piensos y cereales, lácteos, aceites y grasas, productos cárnicos, frutas, vegetales, etc. (Davies y Grant, 1987; Nicolai *et al.*, 2007; Cen y He, 2007).

El desarrollo continuo de nuevas técnicas quimiométricas, la minituarización de componentes instrumentales, el desarrollo de la espectroscopía NIR de imagen, y la continua aplicación a nuevos campos, hacen que esta técnica esté en plena expansión, siendo la más importante de las técnicas espectroscópicas en el análisis a tiempo real y en el análisis de proceso (Workman *et al.*, 2003).

2.2.2 BASES TEÓRICAS DE LA ABSORCIÓN NIR

La región del infrarrojo (IR) es aquella región del espectro electromagnético comprendida entre el final de la región visible y la región de microondas. Dentro de dicha región, se pueden diferenciar distintas secciones en función del intervalo de longitudes de onda considerado, aunque las fronteras entre unas y otras son un tanto arbitrarias. Así, se denomina infrarrojo medio (MIR) y lejano (FIR) a la región espectral comprendida entre los 2500 nm y 1mm e infrarrojo cercano a la radiación infrarroja más cercana al visible (Burns y Ciurczak, 1992).

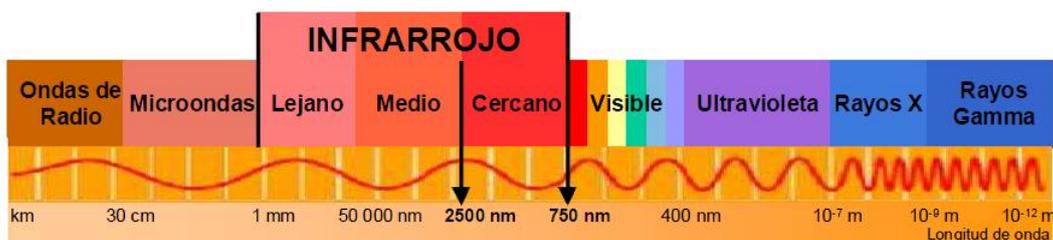


Figura 2.1. Espectro electromagnético

En concreto, la región NIR del espectro electromagnético se extiende desde los 750 a los 2.500 nm, expresado como longitud de onda, o lo que es igual desde 12.800 a 4.000 cm^{-1} , expresado en número de onda (Osborne y Fearn, 1986; Osborne *et al.*, 1993; Shenk y Westerhaus, 1995a; Naes *et al.*, 2002).

El fundamento de la tecnología NIRS se basa en la interacción que tiene lugar entre la radiación electromagnética infrarroja y la muestra, como consecuencia de la cual se producen cambios en el estado vibracional de las moléculas. El espectro vibracional de una molécula se considera una propiedad física única y por tanto, característica de esa molécula. Así, en función de los enlaces presentes en las moléculas (fundamentalmente del tipo $-\text{CH}$, $-\text{NH}$, $-\text{OH}$ y $-\text{CO}$), la absorción de radiación será variable para cada frecuencia del espectro infrarrojo (Burns y Ciurczak, 1992).

Para que una molécula absorba radiación infrarroja, la energía de radiación ha de coincidir con la diferencia de energía entre dos estados energéticos y debe producirse un cambio en el momento dipolar de la molécula debido a movimientos vibratorios. Los modos de vibración más importantes se suelen englobar en dos grandes grupos: vibraciones de tensión o estiramiento (*stretching*), tanto simétricas como asimétricas y las vibraciones de flexión (*bending*), ya sean en el mismo plano o fuera de él. En base a ello, las vibraciones en moléculas poliatómicas son mucho más complejas que en el caso de una molécula diatómica que sólo puede vibrar de un modo (*stretching*).

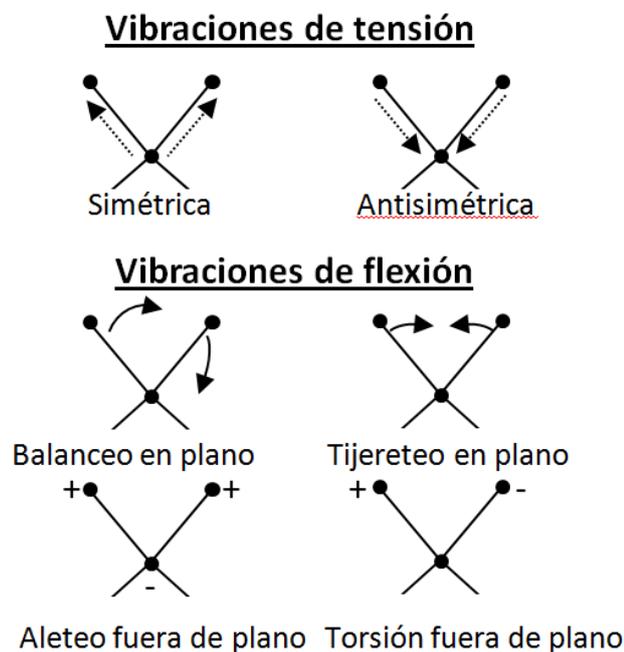


Figura 2.2. Vibraciones moleculares entre dos átomos con respecto a un átomo.

La energía absorbida incrementa la energía de los modos de vibración de las moléculas a través de mecanismos diferentes (Williams y Norris, 1987a; Burns y Ciurczak, 1992; Osborne *et al.*, 1993; Naes *et al.*, 2002):

- Sobretonos o armónicos de las vibraciones fundamentales existentes en la región del infrarrojo medio, los cuales son múltiplos aproximados de las vibraciones fundamentales.
- Combinación de dos o más vibraciones fundamentales del infrarrojo medio.
- Absorciones electrónicas, debidas al movimiento de electrones entre diferentes niveles energéticos.

La forma de cuantificar la absorción de energía en la región NIR mediante los mecanismos descritos anteriormente es a través de la medida de la energía reflejada o transmitida. La energía reflejada se expresa en unidades de absorbancia (A), definidas estas como $A = \log(1/R)$, donde R son los valores de reflectancia o cociente entre la radiación reflejada por la muestra y la radiación incidente sobre la muestra (Williams y Norris, 1987; Burns y Ciuczak, 1992; Osborne *et al.*, 1993; ASTM, 1994; Bertrand y Dufour, 2000).

La tecnología NIRS se basa en la ley de Lambert-Beer, según la cual la absorbancia resultante de una muestra que contenga una sustancia con capacidad de absorber radiación NIR es directamente proporcional a la concentración de la sustancia que absorba dicha radiación (Osborne y Fearn, 1986; Williams y Norris, 1987ab; Burns y Ciuczak, 1992; Osborne *et al.*, 1993; Shenk y Westerhaus, 1995a; Bertrand y Dufour, 2000). Por ello, los valores de absorbancia obtenidos a partir de una muestra se pueden relacionar con la concentración de determinadas sustancias presentes en la muestra, siempre y cuando absorban radiación NIR.

La representación de los valores de absorbancia obtenidos a las diferentes longitudes de onda del rango NIR da lugar a una curva denominada espectro NIR, el cual es resultado de los diferentes sobretonos, bandas de combinación y absorciones electrónicas de radiación de los grupos funcionales presentes en la muestra.

La principal consecuencia de los diferentes mecanismos anteriormente descritos es la gran complejidad que entraña la interpretación espectral de las bandas de absorción obtenidas de los espectros NIR, debido a que los compuestos orgánicos presentes en la muestras poseen muchos modos vibracionales que provocan que el espectro NIR sea complejo.

Además, la complejidad de la técnica aumenta en función de las características físicas del instrumento (compartimento para el análisis de la muestra, óptica del equipo, etc.), así como de la muestra (tamaño, forma y distribución de las partículas, índices de refracción, etc.) influyendo en el espectro de una determinada muestra.

Sin embargo, a pesar de la difícil interpretación de los espectros resultantes, el hecho de que varios enlaces moleculares estén implicados en los diferentes tipos de absorciones de la radiación NIRS comentados con anterioridad, significa que dichas

absorciones pueden ser utilizadas para aportar información analítica de los enlaces moleculares o de grupos funcionales específicos.

La Figura 2.3. muestra la correspondencia entre los enlaces principales químicos y sus correspondientes regiones espectrales de absorción NIRS.

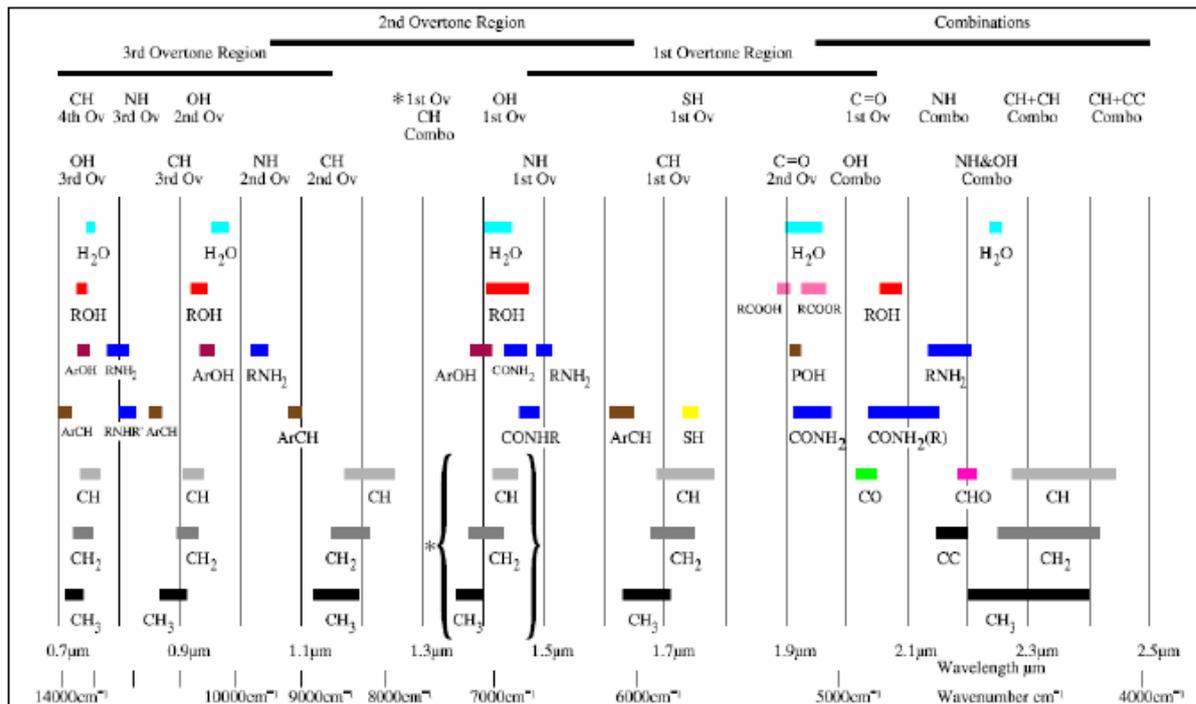


Figura 2.3. Bandas de absorción en la región NIR (Murray, 2004)

Para poder extraer dicha información a partir de los espectros NIR obtenidos se hace necesario el uso de métodos de análisis multivariante (Burns y Ciurczak, 1992; Osborne *et al.*, 1993; Naes *et al.*, 2002).

2.2.3 INSTRUMENTACIÓN Y MODOS DE ANÁLISIS

El esquema básico de un instrumento NIR no difiere de cualquier otro espectrofotómetro. Sin embargo, debido a la baja intensidad de las bandas NIR, el nivel de exigencia en términos de ruido y estabilidad instrumental es mayor que en otros espectrofotómetros. Los componentes básicos de un equipo NIR son: fuente de radiación, sistema de selección de longitudes de onda, un sistema de lentes para enfocar la radiación, compartimento para la presentación de la muestra, detector que convierte la energía radiante en una señal eléctrica y un procesador de señal. Dicha señal, amplificada y convertida en una señal digital mediante un convertidor analógico/digital

es finalmente transmitida a un ordenador para su almacenamiento o procesado (Shenk y Westerhaus, 1995a; Bertrand y Dufour, 2000).

1. Fuente de radiación: la más utilizada en espectroscopía NIR es la lámpara halógena de tungsteno, por su buen funcionamiento, robustez, coste y porque proporciona un espectro continuo en la región de 320 – 2.500 nm. Otras fuentes de radiación son los LEDs (*Light Emitting Diodes*), atractivos por su eficacia, pequeño tamaño y temperatura de operación, pero que sólo pueden emitir hasta los 1.600 nm.
2. Selector de longitudes de onda: Con excepción de los instrumentos que emplean LEDs como fuente de radiación, para el resto de instrumentos, es necesario disponer de un sistema de selección de longitudes de onda. Es decir, un sistema que descomponga la luz policromática en longitudes de onda discretas, proporcionando un ancho de banda estrecho y una elevada intensidad en todo el intervalo de longitudes de onda. En función del tipo de dispositivo empleado para la obtención de un conjunto de radiaciones monocromáticas, se pueden diferenciar dos grandes grupos de instrumentos NIRS: equipos de filtros e instrumentos monocromadores (Shenk y Westerhaus, 1995). Ambos tipos se diferencian por el número de longitudes de onda que son capaces de obtener a partir de la radiación emitida.

2.1. Filtros o codificadores de longitudes de onda: Los instrumentos de filtros seleccionan las longitudes de onda interponiendo entre la fuente y la muestra materiales que permiten el paso de determinadas longitudes de onda (Ciurczak, 2001). Los más sencillos son los filtros de absorción que transmiten longitudes de onda de forma selectiva según el material con el que están producidos, y los filtros de interferencia en los que las longitudes de onda transmitidas dependen del índice de refracción del material y del ángulo de incidencia de la radiación. Este tipo de filtros tienen un ancho de banda de 10 ± 2 nm y transmiten aproximadamente un 40% de la radiación (Stark y Luchter, 2004).

Mediante un filtro únicamente se pueden llegar a obtener un pequeño rango de longitudes de onda (p.ej.: entre 10 a 20 nm de amplitud) a partir de la radiación emitida por la lámpara. Por ello, los instrumentos que poseen este dispositivo de selección de longitudes de onda vienen equipados con un sistema compuesto de

un determinado número de filtros (entre 5 y 20), consiguiendo de esta forma que puedan cubrir un intervalo más amplio de medida espectral en la región NIR.

2.2. Sistema monocromador: Mediante el uso de un sistema monocromador, al contrario que los instrumentos de filtros, se puede conseguir un rango continuo de longitudes de onda a lo largo de toda la región NIRS. En la actualidad son los sistemas más utilizados ya que proporcionan una mayor información espectral que los equipos de filtros.

Los primeros instrumentos monocromadores, comercializados en la década de los 80, disponían como sistema monocromador de una red de difracción móvil. Las redes de difracción son dispositivos que descomponen la luz policromática en longitudes de onda monocromáticas. Cuando el haz de luz incide sobre la red de difracción, éste se separa en longitudes de onda discretas. La selección de la longitud de onda se basa en el ángulo de giro de la red de difracción, que permite que una sola longitud de onda atraviese la ranura de salida y llegue a la muestra.

A partir de la década de los 90, comienzan a desarrollarse instrumentos equipados con nuevos sistemas de selección de longitud de onda espectral, como los diodos emisores de luz infrarroja (IRED), los interferómetros de transformadas de Fourier, los filtros ópticos-acústicos modulables (AOTF) y aquellos equipados con red de diodos en fila.

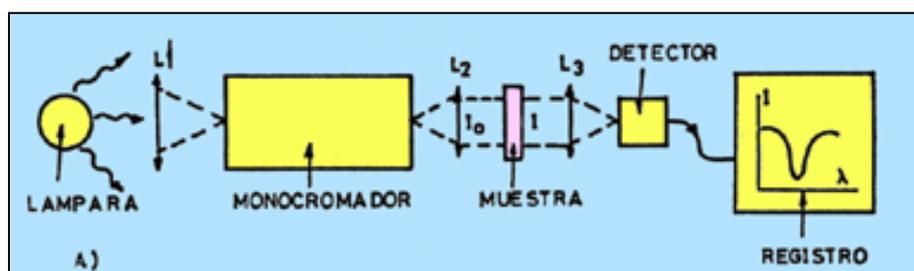


Figura 2.4. Esquema básico de un espectrofotómetro con sistema monocromador

3. Presentación de muestra: La espectroscopía NIR tiene una gran versatilidad y adaptabilidad para el análisis de muestras de diversa naturaleza, ya sean sólidas, líquidas o gaseosas, debido a la existencia de múltiples módulos de medida adaptados a cada tipo de muestra. Así, se pueden realizar medidas *at-line*, *on-line* y

on-site (Figura 2.5.) para múltiples tipos de muestras, variando el camino óptico y el sistema de medida según la necesidad, ya sea con compartimentos adaptados o mediante sondas de fibra óptica, con instrumentación portátil o fija, etc.

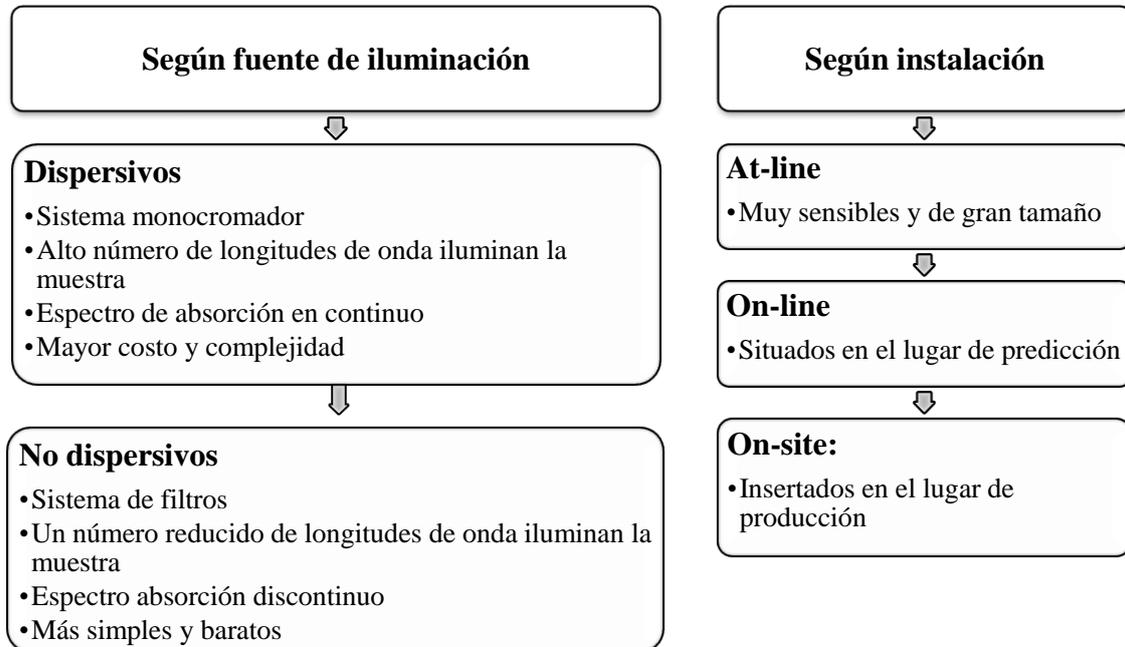


Figura 2.5. Tipos de instrumentos NIRS

En lo referente al modo de medida, existen tres sistemas de medida principal (Figura 2.6.). La más extendida junto con la reflectancia es la transmitancia. Dicha modalidad suele emplearse para muestras gaseosas, líquidas o semilíquidas, mientras que el modo reflectancia suele ser comúnmente empleado para sólidos. La transreflectancia, caso intermedio, suele ser empleado para muestras líquidas o semilíquidas. Finalmente, se encuentra la modalidad de interactancia, basada en una sonda de fibra óptica.

En medidas en modo transmitancia, la radiación NIRS atraviesa la muestra, interactuando en su camino con las moléculas que la componen y siendo en parte absorbida por ellas. La energía que no es absorbida, sigue su camino y es cuantificada por los detectores ubicados después de la muestra (Shenk y Westerhaus, 1995a).

En reflectancia cuando la muestra es iluminada, la radiación penetra en la misma (normalmente no más de 1 mm), interactuando con las partículas y siendo

selectivamente absorbida. La energía que no se absorbe es reflejada y puede ser cuantificada por detectores situados frente a la muestra.

La modalidad de transflectancia, también denominada doble transmitancia, se caracteriza porque integra una cápsula o cubeta portamuestras que permite la transmisión de la radiación NIR a lo largo de toda la muestra. Si bien, al final de dicha cápsula existe una superficie especular (normalmente de aluminio u oro) totalmente reflectante que provoca la reflexión de la radiación, y hace que la radiación vuelva a atravesar la muestra, para incidir finalmente sobre los detectores (Osborne *et al.*, 1993).

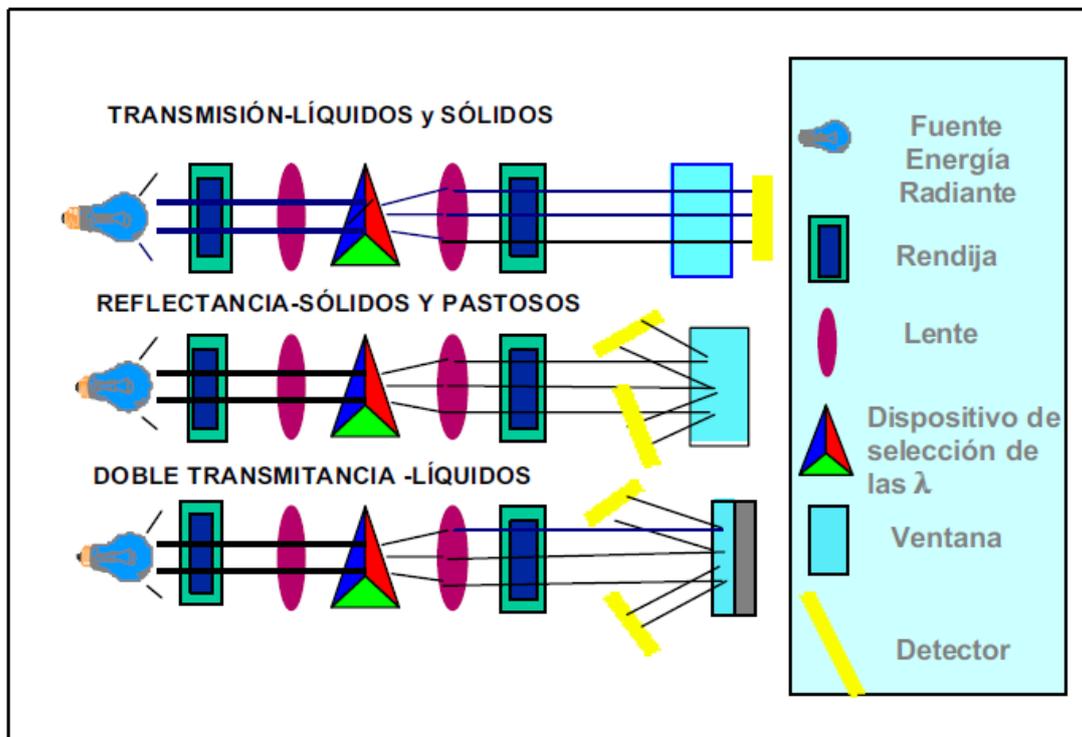


Figura 2.6. Esquema de modalidades de análisis NIRS de reflectancia, transmitancia y doble transmisión (adaptada de Shenk y Westerhaus, 1995a).

La modalidad de interactancia-reflectancia (Figura 2.7.) supone un cambio sustancial respecto a las modalidades comentadas anteriormente, ya que para el análisis de muestras no es necesario el llenado de las cápsulas o cubetas portamuestras. Así, es posible obtener los espectros de las muestras directamente sobre ellas, transmitiéndose a continuación la señal al instrumento mediante una sonda de fibra óptica (Osborne *et al.*,

1993). En este modo de análisis el detector está separado de la fuente de radiación, pero ambos en contacto directo con la superficie del producto.

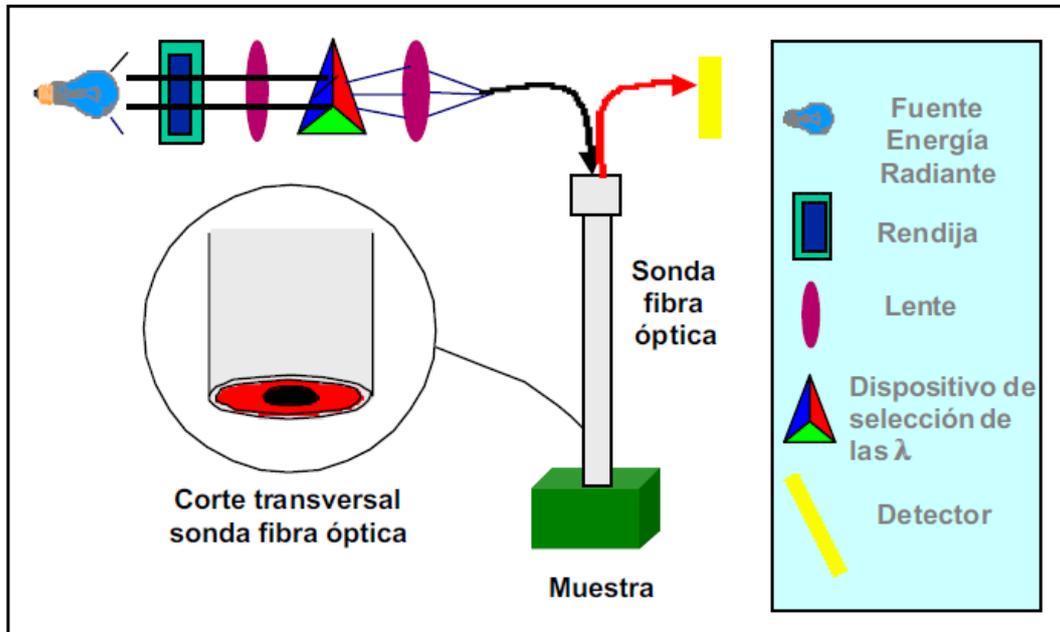


Figura 2.7. Esquema de modalidad de análisis NIRS de interactancia-reflectancia (reproducida de Slaughter, 1995).

4. Detectores: La mayoría de los espectrofotómetros usan un único detector, mientras otros se basan en redes de diodos lineales o multidimensionales para acoplar varios detectores, según el rango de longitudes de onda que se quieran detectar. Los detectores empleados en espectroscopía NIR son construidos con materiales semiconductores como InGaAs, InAs, InSb, PbS o Si. El material más utilizado en la región de 1.100 – 3.000 nm es el PbS, mientras que en la región más próxima al visible (300 – 1.100 nm) se emplea generalmente el silicio. Los detectores de InGaAs son buenas alternativas a los detectores de PbS ya que ofrecen mayor respuesta, pero con el inconveniente de que la temperatura de trabajo óptima es de aproximadamente -40°C . En la Tabla 2.3, que figura a continuación, se exponen los detectores más empleados en los equipos NIRS, en función de su rango espectral de detección.

Tabla 2.3. Detectores comúnmente empleados en equipos NIRS (Workman, 2004).

Detector	Rango espectral de detección (nm)
InAs (Arseniuro de Indio)	1700 – 5700
InGaAs (Arseniuro de Galio e Indio)	900 – 1700
InSb (Antimoniuro de Indio)	1800 – 6800
MCT (Teluro de Cadmio y Mercurio)	1000 – 17000
PbS (Sulfuro de Plomo)	1100 – 3000
PbSe (Seleniuro de Plomo)	1700 – 5500
PbTe (Teluro de Plomo)	1500 – 4500
Silicio	300 – 1100

2.2.4 EQUIPOS NIR DE REDUCIDO TAMAÑO Y PORTÁTILES

Como ya hemos comentado, los instrumentos NIRS tradicionales (*at-line*) son muy “sensibles” y requieren un control exhaustivo de las condiciones de temperatura, humedad, estabilidad, etc., lo que restringe su uso fuera de las condiciones de laboratorio. Una alternativa a estos equipos de laboratorio, que hace viable la inclusión de la instrumentación NIRS *on-line*, es el sistema de selección de longitud de onda basado en redes de diodos, sin partes mecánicas móviles, por tanto más robustos y mejor adaptados al uso *on-line*, incluso en condiciones agresivas (polvo, vibraciones, etc.). También existen otras alternativas que están basadas en la aparición en el mercado de diferentes tipos de sondas de fibra óptica, diseñadas para actuar como interfases entre el proceso o procesos de producción, minimizando o evitando la manipulación de muestra previamente al análisis y una proliferación de dispositivos electrónicos para la automatización de procesos (Fernández-Ahumada *et al.*, 2008).

Los sistemas portátiles miniaturizados de uso *on-site* son más recientes y surgen unidos a los recientes avances en otros campos como las telecomunicaciones, óptica y/o electrónica. Estos equipos portátiles son dispositivos con una configuración versátil, de relativo bajo coste, sin partes móviles, compactos, robustos, ergonómicos, de tamaño reducido y ligero. Las innovaciones más interesantes relacionadas con este tipo de instrumentación están relacionadas con la utilización de sistemas sin partes móviles para

la selección de la longitud de onda espectral. En la Tabla 2.4. se resumen los diferentes sistemas fijos de selección de la longitud de onda espectral.

Tabla 2.4. Avances tecnológicos para la incorporación de partes no móviles en la selección de la longitud de onda espectral de equipos NIRS.

FILTROS SINTONIZABLES ELÉCTRICAMENTE
<ul style="list-style-type: none"> - <u>Filtros acústico ópticos:</u> Combinan radio frecuencias y señales eléctricas para difractar la luz sin necesidad de partes móviles. Según la frecuencia que llega al cristal varía la longitud de onda que puede atravesarlo. (Limitación: Pequeñas variaciones en la temperatura pueden causar desplazamientos en las longitudes de onda alrededor de 0,025nm.) (Gat, 2000).
<ul style="list-style-type: none"> - <u>Filtros de líquido de cristal sintonizables:</u> Se componen de poralizadores y cristales birrefringentes líquidos, que según el voltaje aplicado dejan pasar una longitud de onda u otra.
<ul style="list-style-type: none"> - <u>Filtros basados en sistemas electromecánicos (MEMS):</u> Estos sistemas integran componentes mecánicos, electrónicos y eléctricos en un sustrato de silicio, cuyo tamaño puede variar entre milímetros y micrómetros. Hace uso de técnicas fotolitográficas que permiten implementar sensores en un chip (Middelhoek, 2000). Estos filtros son modulables eléctricamente.
FILTROS LINEALES VARIABLES
<p>Se basa en un filtro de banda cuyo sustrato está recubierto por distintas capas dispuestas intencionadamente en una dirección. Cada capa tiene unas características específicas para dejar atravesar unas longitudes de onda u otras, actuando, como un filtro (Dami <i>et al.</i> 2010).</p>

La incorporación de sistemas micro electro mecánicos (MEMS) ha sido la mejora más significativa en los últimos años, en cuanto al diseño de espectrofotómetros NIR portátiles, prácticos de bajo coste y robustos (Spectroscopy, 2010). Esta tecnología MEMS-NIRS (Figura 2.8.), tuvo sus primeras incursiones en el mundo del plástico y, más recientemente en la inspección de productos farmacéuticos. Y en la actualidad está

evaluándose en sus aplicaciones en la industria agroalimentaria (Pérez-Marín *et al.*, 2011; de la Roza-Delgado *et al.*, 2013).

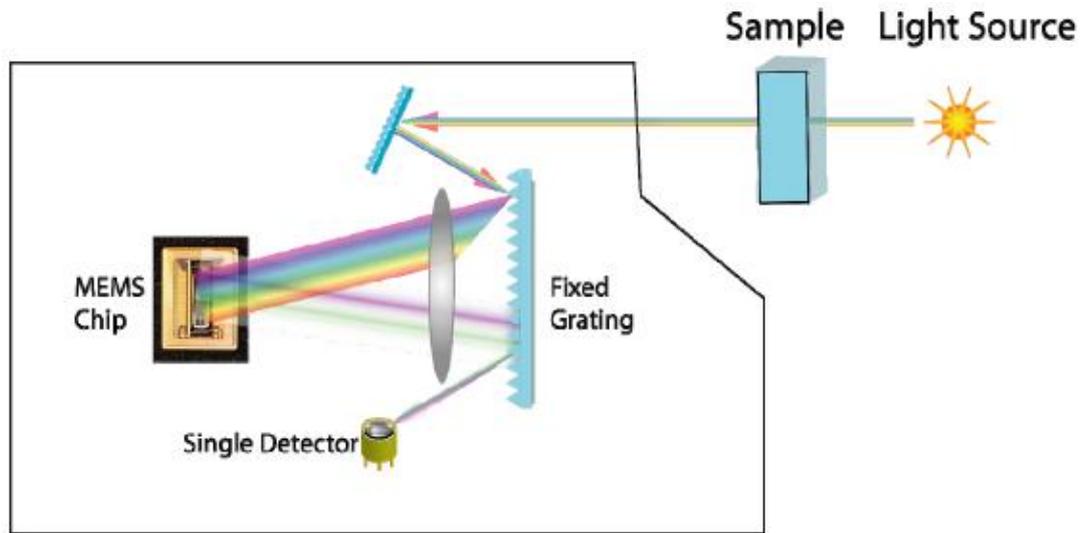


Figura 2.8. Filtros basados en sistemas electromecánicos (MEMS)

Los equipos basados en esta tecnología son los que más auge han tenido en los últimos tiempos. En la Figura 2.9., se muestran algunos de estos equipamientos disponibles en el mercado.



Figura 2.9. Equipamientos NIRS portátiles disponibles en el mercado

Aparte de estos equipos comerciales portátiles de reducido tamaño, existen también aquellos basados de red de diodos emisores (LEDs), especialmente interesantes

debido a sus características de bajo consumo energético, precio, reducido tamaño y larga duración. Estos dispositivos emplean para la dispersión de las longitudes de onda una red de difracción, si bien, en estos equipos, esta red es fija. El haz de luz incide en la red tras interactuar con la muestra y posteriormente, todas las longitudes de onda son detectadas por una matriz de detectores (fotodiodos) individuales (Figura 2.10). No obstante estas fuentes tienen limitaciones: cambios de intensidad de la radiación según la temperatura de trabajo, degradación gradual de la misma con el paso del tiempo, rango de longitudes de onda de emisión muy estrecho.

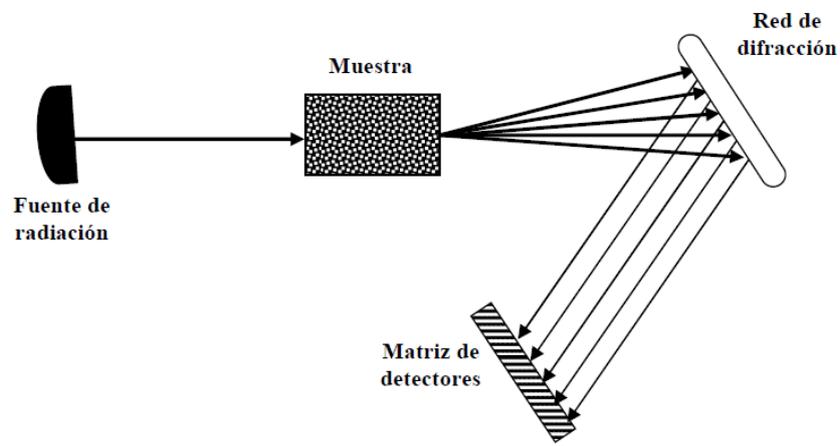


Figura 2.10. Esquema de un equipo de red de diodos (DA) (adaptada de Brimmer *et al.*, 2001).



Figura 2.11. Equipo NIR Corona 45 VisNIR 1.7 de red de diodos

Hay que tener en cuenta, que esta mejora en la selección de la longitud de onda espectral, debe ir asociada, a los avances en hardware y software, que permiten mejorar la rapidez y la precisión en la toma de datos espectrales y el tratamiento matemático de

los mismos. La miniaturización de los procesadores también ha permitido mayor independencia de los equipos así como el uso de tecnologías de la comunicación e información remota.

2.2.5 QUIMIOMETRÍA Y SU APLICACIÓN EN LA TECNOLOGÍA NIRS

El aumento progresivo en complejidad de la instrumentación analítica permite obtener cada vez mayor volumen de datos. La conversión de estos datos en información útil requiere el uso de herramientas matemáticas y estadísticas, que han dado lugar a una disciplina denominada Quimiometría.

El término Quimiometría fue introducido por World en 1972, para definir aquella disciplina de la química analítica que mediante el uso de métodos estadísticos, matemáticos y otros de lógica formal, diseña o selecciona procedimientos experimentales óptimos de medida y/o trata de obtener la máxima información química relevante a partir de los datos químicos analizados (Massart *et al.*, 1997; World y Sjöstrom, 1998).

Como se ha comentado previamente, la gran superposición de bandas de absorción de los diferentes constituyentes presentes en la muestra, la gran cantidad de datos existentes, la elevada información redundante (colinealidad) provocan una baja selectividad de los datos espectrales NIR. Cuando todo ello concurre, es difícil poder llegar a establecer una ecuación mediante la ley de Lambert-Beer, para estimar una propiedad físico-química de una muestra con el valor de absorbancia a una única longitud de onda. Por ello, la aproximación univariante que se emplea en el resto de técnicas espectroscópicas es muy poco útil en la tecnología NIRS (Burns y Ciurczak, 1992; Osborne, 1993; Naes *et al.*, 2002).

Por otro lado, la extracción de información relevante de los espectros NIR se complica debido a la existencia de múltiples fuentes de error que afectan al dato espectral. Dichas fuentes de error se pueden relacionar con cada uno de los siguientes aspectos:

- relacionadas con el instrumento (relación señal/ruido, exactitud, y precisión de la longitud de onda, linealidad de la señal, tipo y tamaño de la cápsula, etc.)

- relacionadas con la muestra (homogeneidad, densidad, textura, granulometría, estabilidad ante fluctuaciones de la temperatura, etc.)
- operacionales (preparación de la muestra, errores del analista, estrategias y procedimientos estadísticos empleados, etc.).

Como consecuencia de todo lo expuesto se hace necesario emplear herramientas quimiométricas complejas en el tratamiento de los datos espectrales con el fin de minimizar estos errores y obtener información relevante (Naes *et al.*, 2002). Entre tales herramientas quimiométricas cabe destacar los métodos de análisis multivariante.

El análisis multivariante podría definirse como los diferentes métodos estadísticos, matemáticos o gráficos, empleados en el análisis de datos, siempre y cuando se consideren varias variables de forma simultánea (Martens y Naes, 1989; Martens y Martens, 2000, Naes *et al.*, 2002). En el caso de la tecnología NIRS, el análisis multivariante se empleará para estimar cualquier propiedad de la muestra (físico-química, fundamentalmente) a partir de múltiples variables espectrales (valores de absorbancia a diferentes longitudes de onda).

Estas herramientas se consideran fundamentales hoy en día en la obtención de información relevante a partir de los datos espectrales, siendo el desarrollo y la evolución de la tecnología NIRS paralelos a los avances registrados en dichos campos y particularmente en el terreno de la quimiometría (Shenk y Westerhaus, 1995a; Kaffka y Giamarti, 1995; Geladi, 1996).

2.2.6 ETAPAS DEL DESARROLLO DE MODELOS DE CALIBRACIÓN MULTIVARIABLES

Un modelo de calibración multivariable cuantitativo relaciona N variables experimentales (valores de absorbancia de un espectro NIR) con propiedades conocidas de la muestra (p. ej. la concentración de un determinado analito), siendo el objetivo la predicción de dicha propiedad en las muestras a analizar. Este proceso es lo que se conoce como etapa de calibración, la relación matemática desarrollada se denomina ecuación de calibración y el grupo de muestras de composición conocida se designa como colectivo de calibración. Una vez establecida la ecuación de calibración, ésta permitirá predecir la composición físico-química de muestras similares en características a las del colectivo de calibración (Williams y Sobering, 1996; Shenk y Westerhaus, 1995b y 1996).

La obtención de ecuaciones de calibración globales o universales y robustas, es decir, ecuaciones que sean de aplicación a la práctica totalidad de muestras de una población y que mantengan su exactitud y precisión a lo largo del tiempo, requiere del seguimiento de unas estrategias concretas que se indicarán a continuación (Shenk y Westerhaus, 1995b y 1996). Para ello, dentro de este apartado, se pretende describir los principales pasos metodológicos necesarios para la obtención de la ecuación de calibración, y posterior predicción de los parámetros analíticos en las muestras objeto de estudio.

2.2.6.1 OBTENCIÓN DE LOS ESPECTROS DE ABSORCIÓN

La técnica NIR comienza con la obtención de un espectro de absorción (entre 750 y 2.500 nm) a partir del escaneado de la muestra. Como se ha comentado anteriormente, dicho espectro refleja las transiciones cuantizadas vibracionales producidas en las moléculas como consecuencia de la interacción entre la radiación emitida por una lámpara halógena de filamento de tungsteno y la muestra.

2.2.6.2 SELECCIÓN DEL CONJUNTO DE MUESTRAS

Una etapa de gran importancia en el desarrollo de una ecuación de calibración NIRS es la selección de muestras que van a constituir el colectivo de calibración o aprendizaje. En primer lugar se ha de disponer de un número de muestras suficiente para la creación y validación del modelo. En general, mientras mayor sea el número de muestras que constituyan el colectivo de calibración, mayor capacidad de predicción presentará una ecuación. Pero dado que las muestras han de ser analizadas por el método de referencia, el cual suele ser lento y costoso, el número de muestras a emplear se ve limitado.

Por otro lado, las muestras utilizadas para el desarrollo de un modelo de calibración han de ser representativas de la variabilidad que pueda darse durante el proceso, y también entre procesos. Así las muestras utilizadas, además de abarcar la variabilidad existente en cuanto a composición se refiere, han de incorporar la variabilidad debida a otras variables, como el origen de la materia prima o la variabilidad debida a ciclos de producción, entre otros. A los colectivos de muestras que cumplen estos objetivos se les suele denominar librerías espectrales universales o globales de un producto (Shenk y Westerhaus, 1991a y 1995).

2.2.6.3 MÉTODO DE REFERENCIA

El desarrollo de modelos cuantitativos requiere el conocimiento previo de las variables que van a ser determinadas. Para ello, se utilizan los métodos de referencia (análisis por vía húmeda) que deben proveer valores precisos y exactos, ya que de ello dependerá la calidad del modelo a desarrollar.

2.2.6.4 PRETRATAMIENTO ESPECTRAL

Una vez obtenidos los espectros NIR de las muestras seleccionadas, puede ser necesario aplicar un pretratamiento espectral. Esto se debe a que en los datos espectroscópicos pueden aparecer contribuciones no deseadas (debido al proceso de registro, a la naturaleza de la muestra o al ruido instrumental), como ya hemos comentado, que causan no linealidades u otros efectos que pueden afectar negativamente al desarrollo del modelo de calibración. Los pretratamientos espectrales tienen como objetivo, entre otros, minimizar estas contribuciones espectrales no deseadas, simplificando los modelos y por ende, acrecentar la señal del analito de interés. No todos los pretratamientos consiguen estos objetivos simultáneamente, por lo que la selección del más apropiado es puramente experimental. Los pretratamientos espectrales más utilizados son:

- a. Promedio de Espectros: El ruido es considerado una variación instrumental aleatoria, por lo que promediando varias señales analíticas de la misma muestra, el ruido disminuye y se mejora la relación señal/ruido.
- b. Suavizado Espectral: Los métodos de suavizado son utilizados para reducir matemáticamente el ruido aleatorio o incrementar la relación señal/ruido (Beebe *et al.*, 1998). Estos métodos utilizan una ventana de puntos para determinar un valor central, desplazando la ventana a lo largo de todo el espectro. Los métodos más utilizados son el de Savitzky-Golay (Savitzky y Golay, 1964) y el de la Transformada de Fourier (Horlick, 1972).
- c. Derivadas: Es uno de los pretratamientos más utilizados en espectroscopía NIR por su capacidad de solventar los problemas más característicos de esta técnica: el solapamiento de bandas y los desplazamientos de la línea base. La primera derivada elimina los desplazamientos de la línea base constantes y la segunda derivada

elimina los desplazamientos que varían linealmente con la longitud de onda. Los métodos más utilizados son el de Savitzky-Golay (Savitzky y Golay, 1964) y el de Norris (Norris y Williams, 1984). Las derivadas por el método de Savitzky-Golay incorporan un suavizado, por lo que el tamaño de ventana es un parámetro crítico. Si éste es pequeño la derivada tendrá elevado ruido y si es grande la información espectral resultará demasiado suavizada (Beebe *et al.*, 1998).

- d. Centrado: El centrado es un pretratamiento habitual previo al desarrollo de un modelo de calibración o de un análisis de componentes principales. Consiste en centrar cada una de las N variables restando la media de todos los elementos de esa variable. Los vectores centrados tienen valor medio igual a cero, sin modificar la varianza.

Un aspecto que influye de manera importante en la baja selectividad de la información espectral NIR es la dispersión de la radiación incidente, también denominada *efecto scatter* (Burns y Ciurczak, 1992; Osborne, 1993; Bertrand y Dufour, 2000). Este hecho es debido a fenómenos físicos como la textura, el tamaño y la geometría de las partículas que conforman la muestra (Iwamoto, 1991; Shenk *et al.*, 1992) y a cambios en el índice de refracción del material que interacciona con la radiación, lo que provoca numerosas variaciones no deseadas en los datos espectrales NIR (Barnes *et al.*, 1989; Dhanoa *et al.*, 1994; Fernández y Garrido, 1999; Naes *et al.*, 2002).

Para separar la información existente en el espectro NIR debido a estas variaciones de origen físico, de aquellas que aporten información meramente química se han desarrollado numerosos métodos quimiométricos, a los cuales se les suele agrupar bajo el nombre de tratamientos de corrección de *scatter* (Bertrand, 1993; Bertrand y Dufour, 2000). Algunos de estos tratamientos (Puigdomenec, 1998; Naes *et al.*, 2002), serían los denominados MSC o *multiplicative scatter correction*, SNV o *standard normal variate*, DT o *detrending* y OSC u *ortogonal signal correction*. Siendo los tratamientos utilizados más comúnmente MSC, SNV y DT.

- a. El SNV o *Standard Normal Variate* se utiliza principalmente para corregir variaciones de la línea base producidas por la dispersión (Barnes *et al.*, 1989), por lo que puede ser útil para sólidos o muestras líquidas con turbidez. Con este

pretratamiento se centra cada espectro, restando el valor medio de la absorbancia del espectro a los valores de absorbancia de cada longitud de onda, dividido todo ello por la desviación estándar:

$$x'_n = \frac{x_n - \bar{x}}{s}$$

- b. El MSC o *Multiplicative Scatter Correction* se utiliza para compensar efectos multiplicativos o aditivos debidos al *scattering*. El MSC corrige los desplazamientos entre muestras aplicando a los espectros originales los parámetros de la recta, obtenida por mínimos cuadrados, representando los valores de absorbancia de un intervalo de longitudes de onda en el que no absorba el analito (aunque a la práctica se realiza con el espectro completo), frente a los valores de absorbancia de un espectro de referencia (generalmente el espectro medio de los datos a tratar). La corrección del espectro original se reduce a la siguiente fórmula, en la que a y b son los parámetros de la recta.

$$x_i^{MSC} = \frac{x_i - a}{b}$$

- c. El DT o *detrending* es un tratamiento para quitar los efectos de *offset* en la línea de base, así como la pendiente o curvatura de los espectros, normalmente causados por el *scatter*. El cálculo de esta función se resta del espectro original, dando como resultado el espectro con tratamiento *detrend* aplicado. Normalmente se aplica conjuntamente a otros tratamientos (por lo general el SNV).

2.2.6.5 DESARROLLO DEL MODELO DE CALIBRACIÓN

Una vez seleccionadas las muestras de calibración, analizadas éstas mediante el método de referencia y NIRS, la información espectral se simplifica a través del centrado de la población mediante un análisis de componentes principales o PCA (*Principal Component Analysis*), seguido del cálculo de distancias entre muestras (espectros) en un espacio n-dimensional a través generalmente de la distancia de Mahalanobis (Shenk y Westerhaus, 1991a y 1995^a y b).

El análisis de componentes principales es una herramienta que permite condensar la variabilidad presente en una matriz de datos en unos pocos parámetros representativos, denominados componentes principales (CPs). Los componentes principales son combinación lineal de los datos originales (en este caso, datos espectrales NIR), para cualquier nivel de exactitud requerido. Cada uno de estos componentes principales intenta explicar la máxima cantidad posible de la varianza residual existente en el colectivo de datos originales. El PCA es uno de los métodos más empleados para la reducción de variables, además de constituir la base a partir de la cual se han desarrollado multitud de técnicas quimiométricas de análisis cualitativo y cuantitativo.

Después del análisis de componentes principales, el conjunto de muestras aparece como un elipsoide, en el cual se establece un radio que permitirá la detección de anómalos (*outliers*). La causa de la existencia de este tipo de muestras anómalas es ciertamente diversa, desde muestras que pueden pertenecer a una variedad distinta a las demás, espectros recogidos en el equipo sin estabilizar, encapsulamientos incorrectos, etc. Es decir que, la anomalía puede ser causada tanto por la información espectroscópica como por la química. 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 influencia que provoca su presencia en los resultados del modelo.

Para la detección de anómalos espectrales, entre los métodos más utilizados se encuentra el cálculo de distancias n-dimensionales, como puede ser la distancia de Mahalanobis (se consideran como pertenecientes a la población aquellas muestras con $GH < 3$) y el cálculo de residuales en los datos espectrales, es decir, espectros o datos espectrales que presenten una parte importante de variabilidad sin explicar por el modelo generado (Martens y Naes, 1989; Shenk y Westerhaus, 1995a y b).

Ambos tipos de estadísticos (distancias en espacios n-dimensionales y residuales) pueden ser también empleados en la detección de anómalos químicos. Sin embargo, el cálculo de residuales está más extendido en lo que a datos de composición se refiere. Dichos residuales químicos serían aquellas muestras que presentan diferencias significativas entre los valores de composición aportados por el método de

referencia y los estimados mediante el modelo de regresión, evaluados normalmente mediante un test T .

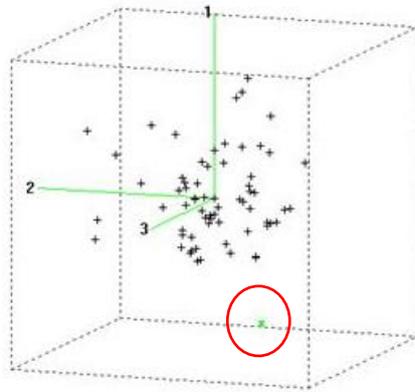


Figura 2.10. Representación tridimensional de la población de muestras según la distancia de Mahalanobis global. Las muestras anómalas (*outliers*) aparecen enmarcadas.

Durante la calibración, es posible eliminar la información redundante, identificando las muestras con un espectro muy similar a otras presentes en la misma población, seleccionando así aquellas que recogen la máxima variabilidad. Para ello se emplea el concepto de distancia entre vecinos (NH, de *neighborhood*), que mide la semejanza entre muestras mediante el cálculo de la distancia entre una muestra y su “vecino” (normalmente, en este paso, se establece un valor limitante de NH de 0,6). En el centro de la población muchas muestras son vecinas, mientras que en los extremos las muestras tienen un número menor de vecinos.

Una vez eliminada la información redundante, se procede al cálculo de la ecuación que nos permitirá correlacionar los valores de referencia con la información espectral NIR, y así obtener el modelo de predicción necesario para el análisis de muestras desconocidas. Para ello existen diferentes métodos de regresión multivariante (Martens y Naes, 1989; Burns y Ciurczak, 1992; Puigdomenec, 1998; Naes *et al.*, 2002), siendo los más utilizados en las aplicaciones cuantitativas NIRS la regresión lineal múltiple (MLR), la regresión por componentes principales (PCR) y la regresión mediante mínimos cuadrados parciales (PLS).

- **MLR:** Este algoritmo calcula el modelo de regresión en base a todas las variables espectrales disponibles y los valores analíticos, por lo que no se realiza una simplificación de las variables (Shenk y Westerhaus, 1995b; Puigdomenec, 1998).

Las longitudes de onda seleccionadas, mediante un test F, serán aquellas que presentan una mayor correlación entre el valor de absorbancia a una longitud de onda determinada y el dato de composición química.

- **PCR**: Se basa en la descomposición de la matriz de datos espectrales mediante un PCA, por lo que genera unas nuevas variables ortogonales no correlacionadas (PCs), con las cuales desarrolla una regresión lineal junto con la matriz de datos que contiene la información de referencia. El inconveniente de este algoritmo es que sólo usa la información espectral para calcular las nuevas variables.
- **PLS**: Se diferencia del anterior en que las nuevas variables ortogonales no sólo se calculan a partir de la matriz de datos espectrales, sino que considera también la matriz de los datos de referencia. De este modo, las nuevas variables (LV, *Latent Variables*) maximizan la varianza explicada de la matriz espectral (X) de forma que sea relevante para predecir los parámetros de la matriz con los datos de referencia (Y) (Martens y Naes, 1989; Wold *et al.*, 2001).

Los métodos de regresión PCR y PLS se asemejan en sus fundamentos, ya que mediante ambos métodos se pretende generar unas nuevas variables, combinación lineal de los datos espectrales originales y emplear estas nuevas variables en el desarrollo de la ecuación de regresión (Martens y Naes, 1989; Shenk y Westerhaus, 1995b; Martens y Martens, 2000). Así, únicamente es considerada la información relevante durante el desarrollo de la regresión.

Estos métodos de regresión permiten obtener una relación lineal entre los datos espectrales y los de su composición. Sin embargo, en algunos casos, no es posible encontrar una respuesta lineal por lo que es necesario recurrir a métodos de regresión no lineales (Martens y Naes 1989; Shenk y Westerhaus, 1996; Bertrand y Dufour, 2000; Naes *et al.*, 2002).

2.2.6.6 EVALUACIÓN Y SELECCIÓN DEL MODELO DE CALIBRACIÓN

La fiabilidad del modelo de calibración se evalúa inicialmente mediante un proceso de validación cruzada, en el que se calculan distintas ecuaciones y se procede a seleccionar aquella que mejor predice las muestras (la que tiene un valor más alto del

coeficiente de correlación y más bajo del error estándar de validación cruzada, que comentaremos a continuación).

Esta técnica descrita por Stone (1974) consiste en una validación basada únicamente en los datos empleados en la etapa de calibración. Para ello, se eliminan de forma sucesiva muestras del colectivo de calibración que son empleadas para validar la ecuación desarrollada a partir del resto de muestras del colectivo de calibración que no han sido eliminadas. El procedimiento se repite hasta lograr que todas las muestras hayan sido utilizadas una vez para realizar la validación. Con ello se logra obtener una estimación de la capacidad de predicción de una ecuación más real.

2.2.6.7 ETAPA DE VALIDACIÓN

Después de haber desarrollado distintas ecuaciones de calibración mediante alguno de los métodos de regresión existentes se ha de validar nuevamente la fiabilidad del modelo de calibración mediante la predicción de muestras que no hayan intervenido en la misma, utilizando para ello diversos estadísticos. Este proceso se denomina etapa de validación (o validación externa), mientras que las muestras empleadas en dicha etapa se designan como colectivo de validación.

La etapa de validación consiste en la comparación del valor verdadero y el valor estimado (Massart *et al.*, 1988). Considerando, en este caso, el valor verdadero a aquel obtenido mediante el método de referencia, mientras que el valor estimado será el predicho por la ecuación NIRS.

Los estadísticos empleados en la evaluación, selección y validación de las ecuaciones de calibración son los siguientes:

- Coeficiente de determinación de la calibración (R^2) o medida de la bondad de ajuste del modelo de regresión utilizado (RSQ). Establece una correlación entre los datos primarios obtenidos y los predichos por las ecuaciones de calibración para un determinado parámetro. Se busca el valor de R^2 más próximo a 1.
- Error estándar de calibración (ETC o SEC) o error asociado a las diferencias existentes entre las medidas primarias obtenidas por los métodos de referencia y los resultantes del análisis NIRS para los parámetros analíticos determinados en las muestras utilizadas en la calibración, por lo que se requiere sea el menor posible.

- Coeficiente de determinación de la validación cruzada (r^2) o porcentaje de la variación existente en el grupo de validación cruzada que puede ser explicado por el modelo para el parámetro estudiado ($I-VR$). Para este estadístico se tuvieron en cuenta los criterios interpretativos expuestos por Shenk y Westerhaus (Shenk y Westerhaus, 1996) según los cuales:
 - Un valor de $r^2 > 0,90$ indica que la calibración es excelente
 - Si $0,89 > r^2 > 0,70$ la calibración se puede considerar buena
 - Si $0,69 > r^2 > 0,50$, el modelo obtenido permitiría una adecuada discriminación entre las muestras de alto, medio y bajo contenido del parámetro en cuestión.

- Error típico de validación cruzada ($ETVC$) o error de los residuales para el colectivo de validación cruzada ($SECV$), el cual ha de ser el menor posible. El procedimiento de validación cruzada utilizado por el Software WinISI selecciona el número de factores LV de acuerdo al valor más bajo de $ETVC$ y, posteriormente, calcula un nuevo modelo con dicho número de términos. El valor de $ETVC$ final se calcula como la raíz cuadrada de la media de los valores de los $ETVC$ de los distintos pases de validación cruzada al cuadrado.

- La relación entre la desviación estándar y el error típico de validación cruzada o de predicción (RPD). Este cociente ha de ser menor o igual a 3, aunque un valor de 2,5 es aceptable (Williams, 2003)

- RER , se define como la relación entre el intervalo de composición de los datos de referencia para el colectivo de calibración y el error estándar de validación cruzada. Millmier (2000) identifica para este parámetro cuatro niveles de exactitud en la predicción:
 - < 4 : no es utilizable.
 - Entre 4 y 8: la calibración puede distinguir entre valores altos y bajos.
 - Entre 8 y 12: hay posibilidad de predecir cuantitativamente datos.
 - > 12 : indica una buena predicción, pero hay que tener en cuenta que RER es bastante sensible a la presencia de *outliers* de composición.

Una vez desarrolladas las ecuaciones para el análisis por NIRS, su selección para su aplicación a rutina dependerá de los estadísticos obtenidos. De manera, que se ha de elegir la ecuación con menores errores de predicción y mayores coeficientes de determinación, cumpliéndose que:

- El error estándar de validación cruzada (ETVC) sea igual o inferior a 1.33 multiplicado por el error estándar de calibración (ETC).
- La correlación mayor o igual a 0.7
- En caso de validación externa, la pendiente no diferente a 1.

Se considera una buena práctica de laboratorio ampliar y actualizar la ecuación con una periodicidad anual, hasta alcanzar una robustez óptima (*i.e.*, un 95% de predicción).

2.2.7 CLONACIÓN / ESTANDARIZACIÓN DE INSTRUMENTOS Y TRANSFERENCIA DE CALIBRACIONES

Un factor importante para la implantación de la tecnología NIRS a nivel industrial y de laboratorios públicos y privados es el desarrollo de ecuaciones de calibración globales y robustas (Shenk y Westerhaus, 1995 a y b). Tales ecuaciones se denominan ecuaciones de calibración, como hemos comentado previamente, las cuales son obtenidas a partir de un gran número de muestras y pueden ser empleadas para predecir con exactitud y precisión la mayor parte de las muestras de una población a lo largo del tiempo.

Estas ecuaciones de calibración generadas tienen además de un alto valor científico, un importante valor económico, ya que podrían ser empleadas por diferentes instrumentos localizados en el mismo laboratorio o bien en laboratorios diferentes, o incluso ser utilizadas por equipos incorporados en la línea de producción. Para que ello sea posible, el espectro de una muestra obtenido por el equipo a partir del cual se han desarrollado las ecuaciones (instrumento Master) ha de ser igual al espectro obtenido por el equipo NIR al cual se quieren transferir las ecuaciones (instrumento Satélite).

Pese al avance industrial y tecnológico de los últimos tiempos, los espectros obtenidos por diferentes equipos NIRS difieren por diversos motivos, entre los cuales la configuración y óptica del instrumento son los más comunes. Este hecho imposibilita la

transferencia directa de ecuaciones entre instrumentos, si lo que se pretende es emplear dichas ecuaciones con la misma exactitud y precisión que en el instrumento Master.

Tradicionalmente, para resolver el problema de la transferencia de ecuaciones se realizaba un ajuste, mediante la corrección de la pendiente y/o sesgo o bien mediante ajuste de coeficientes y longitudes de onda, de las ecuaciones a cada equipo Satélite en particular. Este procedimiento resultaba tedioso y no posibilitaba la transferencia de espectros para la realización de calibraciones comunes (Dardenne *et al.*, 1992).

Posteriormente, durante la 3ª Conferencia Internacional NIRS (Bélgica), Shenk y Westerhaus presentaron un procedimiento que permitía llevar a cabo la corrección de las diferencias existentes entre espectros de las mismas muestras obtenidos en instrumentos diferentes. Este procedimiento es lo que se conoce como estandarización o clonación de instrumentos, el cual se basaba en la utilización de un “set de universales” (30 muestras selladas de diferentes productos agrícolas). En 1991, los mismos autores, propusieron un método de estandarización simplificado, basado únicamente en la utilización de una muestra sellada de un producto agrícola proteico, para corregir las diferencias espectrales entre instrumentos.

Hoy en día, se han desarrollado numerosas técnicas quimiométricas que permiten llevar a cabo la corrección de las diferencias existentes entre espectros de las mismas muestras obtenidos en instrumentos diferentes. Entre ellos se pueden citar el método DS (*Direct standardisation*) y PDS (*Piecewise direct standardisation*) descrito por Wang *et al.* (1991), aquel que emplea OSC (*Orthogonal Signal Correction*) propuesto por Wold *et al.* (1998), así como la estandarización mediante redes neuronales (Despaigne *et al.*, 1998). Sin embargo, desde el punto de vista práctico, uno de los métodos de estandarización más utilizado es el descrito por Shenk y Westerhaus (Shenk y Westerhaus, 1989). A continuación, se describen las herramientas quimiométricas más destacables de las aquí comentadas.

2.2.7.1 ESTANDARIZACIÓN DIRECTA (DS)

Este método emplea una matriz de transformación general F en la que todos sus elementos pueden ser no nulos. A partir de las muestras medidas en ambos instrumentos como lote de entrenamiento, es posible emplear tanto una regresión de componentes principales (PCR) como de mínimos cuadrados parciales (PLS) para la estimación del

vector de coeficientes que predecirá el valor en el antiguo instrumento para la longitud de onda j a partir de todo el espectro del nuevo instrumento. Para la definición de la matriz F es necesario determinar una enorme cantidad de constantes y normalmente no hay muestras en el lote de entrenamiento. Incluso empleando pocos factores para la regresión el riesgo de sobreajuste es muy elevado.

2.2.7.2 ESTANDARIZACIÓN DIRECTA PASO A PASO (PDS)

En este caso F está restringida de forma que todos sus elementos son nulos excepto una banda en torno a la diagonal principal. Los elementos no nulos se sitúan en la diagonal principal y en un número igual de diagonales por encima y por debajo de ésta. De esta forma, la matriz de transformación relaciona cada medida ajustada con la medida a correspondiente longitud de onda y unas pocas más del espectro bruto a cada lado de ésta. Igual que en el caso anterior, se puede emplear una regresión PCR o una PLS para la estimación de las constantes, siendo más frecuente el empleo de PCR.

El ancho de ventana (número de longitudes de onda empleadas) debe ser optimizado, aunque en la práctica se emplea un ancho de 3 o 5. Como el número de constantes a determinar es mucho menor que en el caso anterior, se reduce el riesgo de sobreajuste notablemente. Independientemente del ancho de ventana, al deslizar ésta sobre los extremos del espectro se presenta un problema ya que no existirán las longitudes de onda a uno de los lados de la ventana. Para solucionar esto, se pueden trincar las ventanas o prescindir de algunas longitudes de onda.

La versión original de la estandarización directa paso a paso (PDS) no incluía el vector de ordenadas en el origen (b) en la ecuación de transferencia. Éste fue incluido por Wang y cols. (Wang *et al.*, 1995) que observaron que el rendimiento obtenido era superior a la versión puramente multiplicativa.

Este procedimiento mantiene la flexibilidad de la estandarización directa (DS) pero reduciendo enormemente el número de constantes a determinar. Aún así, resulta necesario estimar bastantes constantes ya que hay un modelo de regresión PCR por cada longitud de onda del espectro. La determinación del óptimo local de componentes principales, así como la selección de muestras empleadas son dos aspectos clave que pueden generar artefactos en la aplicación de la PDS.

2.2.7.3 TRANSFERENCIA POR PROYECCIÓN ORTOGONAL (TOP)

Este último método de transferencia busca ortogonalizar los espectros de la calibración en aquellas direcciones del espacio espectral donde exista mayor variabilidad entre instrumentos (Soldado *et al.*, 2003). Para tal fin, es necesario que, a partir de muestras medidas en diferentes equipos, se obtengan mediante un PCA, las principales direcciones con información de la variabilidad existente entre instrumentos. Cuando el colectivo de calibración se proyecta ortogonalmente sobre estas componentes, se logra aislar esa información, otorgándole al método de calibración (generalmente PCR o PLS), una mayor posibilidad de hallar factores útiles, “no contaminados” por esa variación entre instrumentos.

2.2.7.4 ALGORITMO DE SHENK Y WESTERHAUS

Este método patentado por Shenk y cols., e incluido en el software WinISI utilizado en este trabajo, realiza una corrección univariante del espectro completo mediante dos etapas independientes. Una primera etapa de corrección de longitudes de onda y una segunda etapa de corrección de los valores de absorbancias.

La corrección de longitudes de onda individuales entre los espectros del instrumento Master y el Satélite, transformados por un tratamiento previo de primera derivada, se realiza buscando la longitud de onda del instrumento Satélite para la que sus valores de absorbancia estén más correlacionados con cada uno de los valores del equipo Master. A continuación, se ajusta mediante un modelo cuadrático a la longitud de onda con la máxima correlación y sus dos longitudes de onda más próximas. Las distintas localizaciones de los modelos cuadráticos obtenidos para cada longitud de onda del instrumento Master se consideran las longitudes de onda del instrumento Satélite que mejor se ajustan a las correspondientes longitudes de onda del Master.

Posteriormente, se ajusta un nuevo modelo cuadrático que relaciona las longitudes de onda del instrumento Master con sus correspondientes longitudes de onda en el instrumento Satélite, obteniéndose así los valores definitivos para las longitudes de onda del instrumento Satélite correspondientes a las longitudes de onda del instrumento Master.

En la segunda etapa, etapa de corrección de los valores de absorbancia se llevan a cabo las interpolaciones para calcular las respuestas del espectro medido en el

instrumento Satélite a las longitudes de onda sugeridas por el modelo cuadrático obtenido en la etapa anterior.

La corrección de las absorbancias se obtiene mediante regresión lineal de las respuestas del instrumento Satélite obtenidas por interpolación a cada longitud de onda seleccionada, sobre las respuestas del instrumento Master a la correspondiente longitud de onda. Longitud de onda por longitud de onda, se ajusta la respuesta del instrumento Satélite con los correspondientes coeficientes de regresión.

Para poner en práctica el proceso de clonación descrito, se han de obtener espectros de las mismas muestras selladas en el instrumento Master, aquel a partir del cual se van a desarrollar las ecuaciones de calibración, así como en el instrumento Satélite, instrumento al que se desean transferir dichas ecuaciones generadas. Idealmente, se deberían emplear cápsulas selladas en ambos instrumentos para que los espectros obtenidos por ambos equipos sean idénticos, corrigiendo las diferencias existentes entre ambos equipos. Asimismo, con el uso de cápsulas selladas se lograría evitar cambios en las muestras debidos a variaciones de temperatura o humedad provocados durante la toma de espectros.

En numerosas ocasiones, la utilización de dichas cápsulas selladas no es posible, ya sea por razones económicas o prácticas. Park *et al.*, (1999) han demostrado la posibilidad de clonar instrumentos y por tanto de transferir ecuaciones de calibración para el análisis de ensilado fresco sin el uso de cápsulas selladas e incluso presentando diferentes superficies de muestra a los instrumentos Master y Satélite.

2.2.8 ESPECTROSCOPIA NIR EN EL CONTROL DE CALIDAD DE ENSILADOS DE MAÍZ

Como se ha comentado, la potencialidad del método NIRS para la determinación rápida y fiable de la calidad de alimentos en general y del forraje en particular, es conocida desde mediados de los años 70 (Norris *et al.*, 1976). En los últimos años se han llevado a cabo un gran número de investigaciones que demuestran la utilidad de ese método para predecir la composición química de diversos productos agrícolas como el ensilaje de maíz (Cozzolino *et al.*, 2003).

Desde las primeras incursiones en el uso de esta técnica en la valoración de forrajes, el avance ha sido tal que, al comparar diversas técnicas de laboratorio de uso

común para predecir la digestibilidad de más de 150 ensilajes evaluados *in vivo*, en Gran Bretaña, Barber *et al.* (1990) concluyeron que NIRS es actualmente la mejor en términos de precisión y exactitud, siempre que se cuente con calibraciones apropiadas.

En la actualidad, con el desarrollo de instrumentos NIR *on-site*, numerosas investigaciones se han basado en el estudio de la aplicabilidad de los mismos en diversos sectores. En este sentido, desde el Área de Nutrición, Pastos y Forrajes del SERIDA, se ha demostrado la potencial aplicabilidad de los equipos *on-site* o *in-situ* para la valoración de parámetros nutritivos y fermentativos de ensilados de hierba (Soldado *et al.*, 2013). Esto posibilita en gran medida, la incorporación de estos equipos a nivel de las explotaciones ganaderas con las numerosas ventajas que ello supone, tanto a la obtención de datos fiables de manera rápida y precisa, como desde el punto de vista económico.

En el presente trabajo, tomando como referencia el estudio anteriormente comentado (Soldado *et al.*, 2013), se evaluará la posibilidad de determinar parámetros nutritivos y fermentativos de ensilados de maíz a partir de dos equipos *on-site* (Satélites) mediante la transferencia de ecuaciones de calibración desarrolladas en los equipos *at-line*, como fundamento para la toma de decisiones estratégicas en las explotaciones ganaderas. Por todo lo anterior los objetivos a desarrollar son:

- I. Evaluación de la transferencia de una biblioteca espectral de un equipo de laboratorio (*at-line*) (FossNIRSystems 6500) a equipos *on-site*, *in-situ/in field* (Corona 45 VisNIR 1.7 y Phazir 1624 Handheld NIR).
- II. Estandarización / clonación de los equipos *on-site* e *in-situ* (satélites) frente al equipo *at-line* (Master) para la evaluación de parámetros nutricionales y fermentativos en ensilados de maíz.
- III. Evaluación de la viabilidad de los modelos quimiométricos desarrollados mediante validación externa.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MUESTRAS Y ANÁLISIS NIRS

En el presente estudio se han empleado un total de 322 muestras de ensilado de maíz, recogidas en explotaciones ganaderas del Principado durante el periodo comprendido entre 2010-2013.

Este conjunto global de muestras se divide en dos grandes grupos:

a) Colectivo de calibración (Set 1). Lo constituyen un total de 241 muestras recogidas entre 2010 y 2011 en el equipo *at-line* (Foss-NIRSystems 6500), en modo transport y con presentación intacta de la muestra. La información espectral se recoge en modo de reflectancia como $\log(1/R)$, con un instrumento Foss-NIRSystems 6500 (*at-line*), equipado con un módulo de transporte, en el rango 400-2.500 nm a intervalos constantes de 2 nm. Este colectivo de calibración, sus datos espectroscópicos, así como la información de referencia ya existían antes del inicio del estudio aquí descrito, puesto que dichas muestras fueron usadas para el desarrollo de ecuaciones de predicción de parámetros nutritivos y fermentativos de ensilados de maíz en el equipo Master en estudios previos (Soldado *et al.*, 2013b).

b) Colectivo de estandarización y validación (Set 2, 3 y 4). Lo constituyen 3 subgrupos de muestras, cada uno de los cuales consta de 51, 10 y 20 muestras respectivamente, que han sido analizadas en el equipo *at-line* y los dos equipos *on-site* utilizados en el presente trabajo (Foss-NIRSystems 6500, Corona 45 VisNIR 1.7 y Phazir 1624 Handheld NIR). La principal diferencia entre estos colectivos muestrales, radica en el método de homogeneización precedente a la toma de espectros por los diferentes equipos NIRS. Los métodos de homogeneización realizados fueron los que se describen a continuación:

I. Método de homogeneización A: Una vez recibida la muestra, ésta es homogeneizada por cuarteo. Este método consiste en ir reduciendo la cantidad de muestra inicial recepcionada hasta obtener una porción representativa del total y suficiente para llevar a cabo los correspondientes análisis. Para ello, la muestra se extiende sobre una superficie donde es homogeneizada y posteriormente, se divide en cuatro cuadrantes. Se separan cuadrantes opuestos y el resto de la muestra se retira. La

porción de muestra resultante, se homogeneiza, se divide de nuevo en cuatro cuadrantes y en esta ocasión, se toman los cuadrantes opuestos a los seleccionados en la etapa anterior. De esta manera, la muestra de partida se divide en dos submuestras, una de las cuales será analizada por vía húmeda (análisis químico de referencia) y por NIRS, y la segunda para la extracción de jugo por presión y posterior análisis de los parámetros fermentativos. La submuestra destinada al análisis por NIRS, será dividida en porciones que serán analizadas de forma simultánea por los diferentes equipos utilizados en el estudio.

II. Método de homogeneización B: En este método al igual que en el anterior, la muestra es homogeneizada por cuarteo, según hemos comentado, y se obtienen dos submuestras. La diferencia con respecto al método anterior, estriba en que se selecciona una de las dos submuestras, la cual será analizada por NIRS haciendo pasar exactamente la misma porción de muestra por los diferentes equipos, fracción que será analizada por vía húmeda posteriormente. Este procedimiento se realiza con el fin de evaluar las diferencias existentes en la toma de espectros por los diferentes equipos, en relación con los datos de referencia obtenidos.

Las características de las muestras y los modos de análisis NIRS que se incluyen en el grupo de estandarización y validación se describen a continuación:

- Set 2: consta de un total de 51 muestras recogidas durante el transcurso de los años 2012 y 2013. Concretamente, 28 de éstas habían sido recogidas previamente al inicio de este proyecto. Las muestras fueron homogeneizadas según el Método de homogeneización A y analizadas por los tres equipos NIR empleados (Foss-NIRSystems 6500, Corona 45 VisNIR 1.7 y Phazir 1624 Handheld NIR).
- Set 3: incluye 10 muestras de ensilado de maíz recogidas según el Método de homogeneización B, analizadas por los equipos Foss-NIRSystems 6500, Corona 45 VisNIR 1.7 y Phazir 1624 Handheld NIR.
- Set 4: este grupo está constituido por un total de 20 muestras, homogeneizadas según el Método B y analizadas en los tres equipos NIRS comentados. Sin embargo, el análisis para la obtención de la información espectroscópica en el instrumento Corona se ha realizado en dos modalidades con el equipo en posición normal (tal y como se realizó en los sets 2 y 3) y en posición invertida (a diferencia del resto de

colectivos muestrales), para valorar las posibles divergencias existentes entre la toma de espectros con el equipo a nivel de laboratorio y la obtenida en la posición a utilizar en una explotación ganadera. En todos los procesos de estandarización evaluados este grupo de muestras fue utilizado como Colectivo de Validación Externa.

SET 1 (N=241)	SET 2 (N=51)	SET 3 (N=10)	SET 4 (N=20)
<ul style="list-style-type: none"> • Método de homogeneización A • Colectivo de Calibración • Foss-NIRSystems 6500 	<ul style="list-style-type: none"> • Método de homogeneización A • Colectivo de Validación Externa A • Colectivo de Estandarización B • Foss-NIRSystems 6500 • Corona 45 VisNIR 1.7 • Phazir 1624 Handheld NIR 	<ul style="list-style-type: none"> • Método de homogeneización B • Colectivo de Estandarización A y B • Foss-NIRSystems 6500 • Corona 45 VisNIR 1.7 • Phazir 1624 Handheld NIR 	<ul style="list-style-type: none"> • Método de homogeneización B • Colectivo de Validación Externa A y B • Foss-NIRSystems 6500 • Corona 45 VisNIR 1.7. (posición normal e invertida) • Phazir 1624 Handheld NIR

Figura 3.1. Descripción de los colectivos muestrales empleados en el estudio.

3.2 INSTRUMENTOS Y ANÁLISIS NIRS

En el desarrollo del presente proyecto se han empleado tres equipos NIRS disponibles en el laboratorio de Nutrición, adscrito al Área de Nutrición, Pastos y Forrajes del SERIDA, los cuales difieren tanto en sus sistemas ópticos como de muestreo.

Los espectros fueron recogidos bajo condiciones controladas de temperatura y humedad (40% humedad y $24 \pm 1^\circ\text{C}$). Las muestras no fueron sometidas a ningún tipo de pre-tratamiento, siendo analizadas en modo intacto; previa homogeneización manual y correcta carga de la cápsula empleada.

3.2.1 EQUIPO MONOCROMADOR FOSS NIRSYSTEM 6500 SY-II (SILVER SPRING, MD, USA)

Este instrumento de laboratorio (*at-line*), equipado con un módulo de transporte y que permite realizar medidas de reflectancia en el rango 400-2.500 nm a intervalos

constantes de 2 nm, es el instrumento Master. Posee diferentes cápsulas de presentación de la muestra al equipo en función del tipo y características de la muestra a analizar.

En este estudio se empleó la cápsula para productos naturales adecuada para el procesamiento de muestras heterogéneas, y cuyas dimensiones internas son: 4,7 cm de ancho, 20 cm de largo y 4,3 cm de profundidad, lo que le confiere una superficie de irradiación resultante es de 94 cm². Los espectros fueron recogidos como $\log(1/R)$, siendo R la reflectancia de la muestra.

Todas las muestras fueron analizadas por duplicado, y sobre muestra fresca, siendo cada espectro a su vez el promedio de dos barridos en los que se realizan 32 lecturas en cada uno. Para la recogida de los datos espectrales y el análisis quimiométrico se utilizó el software WinISI II ver.1.50 (Infrasoft International, Port Matilda, PA, USA, 2000).



Figura 3.2. Equipo FOSS-NIRSystems 6500 SY-II y cápsulas para productos naturales

3.2.2 CORONA 45 VISNIR 1.7 DE RED DE DIODOS INGAES (CARL ZEISS). EQUIPO SATÉLITE 1

El equipo portátil (*on-site* u *on-line*) de red de diodos (Corona 45 VisNIR 1.7, Carl Zeiss) fue uno de los equipos utilizados como instrumento secundario o Satélite (Figura 3.3.). Posee un soporte circular para la adaptación de cápsula tipo Petri de 9 cm de diámetro y 2 cm de profundidad. Esto permite una superficie de irradiación de 64

cm². Las medidas se tomaron como $\log(1/R)$, recogiendo un espectro en cada una de las 20 submuestras que se analizan por muestra de ensilado de maíz, en un rango comprendido entre 302 y 1.711 nm con un autoincremento no constante de 3 nm aproximadamente. El espectro final es el promedio de los 20 análisis NIRS realizados por muestra.

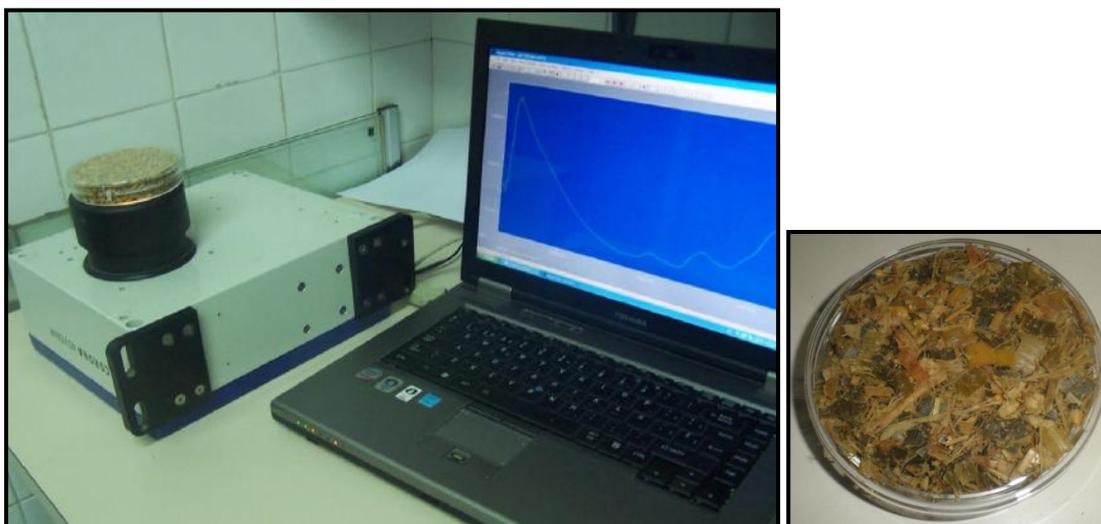


Figura 3.3. Equipo Corona 45 VisNIR 1.7 (Carl Zeiss) en posición “*up-view*” y cápsula de análisis

El diseño del instrumento permite dos modos de análisis: “*down-view*” y “*up-view*”. Estas configuraciones nos permiten recoger la información espectral utilizando cápsulas empaquetadas “*up-view*”, o recoger el espectro de la muestra a medida que se desplaza, por ejemplo, a lo largo de una cinta transportadora (“*down-view*”). La toma de espectros se realiza con el equipo en ambas posiciones simulando su incorporación en una cadena de producción activa. Para ello, las muestras fueron presentadas en bandeja, guardando una distancia de 2 cm respecto al haz de luz (Figuras 3.4. y 3.5.), realizando igualmente 20 barridos espectrales por muestra.

Con este modo de análisis se pretende optimizar el uso e implantación de sensores NIRs portátiles de red de diodos en diferentes puntos de la cadena de transformación-producción, tanto en la industria de la alimentación animal como en las explotaciones ganaderas.

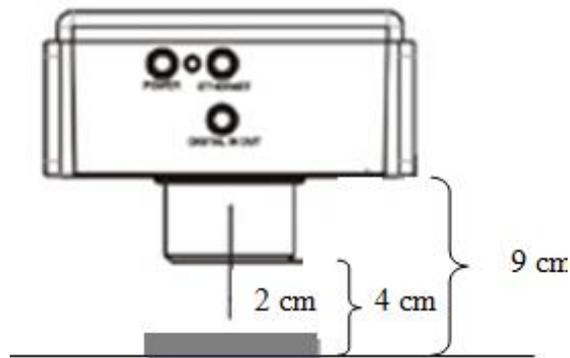


Figura 3.4. Equipo Corona 45 VisNIR 1.7 (Carl Zeiss) en posición invertida y distancias estudiadas para la presentación de la muestra.



Figura 3.5. Presentación de la muestra al Equipo Corona 45 VisNIR 1.7 (Carl Zeiss) en posición invertida o “Down-view”.

Los datos espectrales se recogieron en el software Aspect Plus ver. 1.76 (Carl Zeiss, Inc.) y el posterior análisis quimiométrico, tras exportar los datos, se realizó con el programa WinISI versión 1.50.

3.2.3 PHAZIR 1624 HANDHELD NIR (POLYCHROMIX, INC., WILMINGTON, MA, EEUU). EQUIPO SATÉLITE 2

El espectrofotómetro Phazir 1624 Handheld NIR, es un analizador NIRS de mano provisto de una pantalla LCD y baterías recargables, incluye un sistema electromecánico (MEMS) y una fuente de luz de tungsteno para la iluminación de la muestra.



Figura 3.6. Equipo Phazir 1624 Handheld NIR y modo de recogida de la información espectral

Los datos espectroscópicos son recogidos en un rango comprendido entre 1.596-2.396 nm a intervalos no constantes de aproximadamente 8 nm, con una ventana de muestreo pequeña, de dimensiones 0.8x1cm. La recogida de la información espectral se realiza a partir de la exploración directa sobre la superficie muestra analizada. Se recogieron 40 espectros de cada muestra de ensilado de maíz contenida en una bandeja, y el espectro final de una muestra fue el promedio de los 40 análisis realizados.

Todos los datos obtenidos son almacenados en la memoria interna del equipo y exportados al PC (vía conexión USB). La información de datos espectrales y su tratamiento quimiométrico de desarrollo se realizó con el software quimiométrico WinISI II ver.1.50.

3.3 ANÁLISIS QUÍMICO DE REFERENCIA

Las muestras utilizadas en el análisis NIRS fueron también procesadas por vía húmeda para determinar parámetros nutritivos y fermentativos de los ensilados de maíz. Así, sobre la muestra intacta se determinó el pH, empleando un electrodo de penetración. A continuación, una parte de la muestra fue prensada y sobre el jugo obtenido se determinó nitrógeno amoniacal (NH_3), ácidos grasos volátiles (ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico) y ácido láctico. Paralelamente, el resto de la muestra se desecó a 60°C para la determinación de materia seca (MS), cenizas (CZ), proteína bruta (PB), fibra bruta (FB), fibra neutro detergente (FND), fibra ácido

detergente (FAD), digestibilidad de la materia orgánica (DEMO) y almidón (ALM). Los parámetros descritos fueron realizados según los procedimientos normalizados de trabajo del laboratorio de Nutrición, acreditado por la norma UNE-EN ISO/IEC 17025, N° LE/1044.

- pH (PNTNA-G-008): La medida se realiza al poner en contacto la sonda de penetración del pH-metro con el ensilado, al menos en cuatro puntos diferentes de la muestra y registrando la medida, considerándose la media aritmética.
- Materia Seca (MS) (PNTNA-G-025): La determinación del contenido en materia seca consiste en la evaporación del agua contenida en la muestra, mediante el desecado de la muestra en una estufa de aire forzado a 60°C y determinación del contenido de MS por gravimetría. Después de la molienda, se determinará la humedad residual (103±1°C hasta peso constante). (Van deer Meer, 1983).
- Cenizas (CZ) (PNTNA-G-025): La determinación consiste en la oxidación de toda la materia orgánica contenida en la muestra, al someterla a combustión (550°C hasta peso constante) según Van deer Meer (1983).
- Proteína Bruta (PB) (PNTNA-G-012): La cuantificación del nitrógeno total/proteína bruta (a excepción de nitratos, nitritos y cianuros), se realiza mediante digestión en medio ácido y posterior volumetría según el Método Kjeldahl. Una vez conocido el contenido en nitrógeno de la muestra, se puede determinar el contenido de proteína bruta, aplicando un factor de conversión de 6,25, según Tecator (1995).
- Fibra Bruta (FB) (PNTNA-G-019): Las muestras se mantienen en ebullición sucesivamente con soluciones de ácido sulfúrico e hidróxido de potasio de concentraciones fijadas. El residuo resultante tras la solubilización con ambos reactivos, se separa por filtración y posteriormente, es lavado, pesado y por último, calcinado. La pérdida de peso resultante tras la calcinación corresponde al contenido en fibra bruta. (Tecator, 2000). Este principio nutritivo, pretende ser un estimador de los hidratos de carbono estructurales y sustancias indigestibles ligadas a los mismos, como ya se dijo en el apartado 2.1.4.
- Fibra Neutro Detergente (FND) (PNT-001-FND): Para su determinación, se ha de emplear una solución detergente neutra con laurilsulfato sódico que disuelve las

pectinas de la pared y los solubles celulares, resultando un residuo que representa el contenido de las paredes celulares (Van Soest *et al.*, 1991).

- Fibra Ácido Detergente (FAD) (PNT-005-FAD): Para disolver los solubles celulares, la hemicelulosa y minerales solubles, se utiliza una solución ácido detergente de bromuro de etil-trimetil amonio.
- Digestibilidad (DEMO) (PNT-001-FND): Su determinación se realiza a partir del residuo de FND, tras la adición del enzima celulasa e incubación a 40 °C durante 24 h. (Riveros y Argamentería, 1987).
- Nitrógeno soluble y amoniacal. Se determina por destilación y valoración Kjeldahl en el jugo obtenido tras el prensado del ensilado.
- Ácido láctico, acético y butírico (PNT-AGV's): Los ácidos grasos volátiles y el ácido láctico se determinan a partir del jugo del ensilado obtenido por prensado, mediante cromatografía líquida de alta resolución utilizando una columna de intercambio catiónico fuerte a temperatura a 40°C (columna Shodex RS PAK KC-L6) y con fase móvil de H₃P0₄ al 0,025%, en modo isocrático.
- Almidón (ALM) (PNT-G-015): Se cuantifica indirectamente, previa hidrólisis a glucosa y posterior determinación de la misma, mediante un método enzimático-electroquímico (Soldado *et al.*, 2003).

3.4 DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE CALIBRACIONES NIRS

Para el desarrollo de las ecuaciones de predicción NIRS, se han empleado las 241 muestras de ensilado de maíz del Set 1. Este colectivo de muestras fue utilizado con anterioridad por Soldado *et al.* (2013b), para el desarrollo de modelos de predicción de parámetros nutritivos y fermentativos de ensilados de maíz en fresco, en el rango del equipo Master (400 - 2.500 nm) y validadas externamente con 10 muestras, no incluidas en el estudio actual.

Una vez desarrollado el modelo es necesario evaluar la robustez del mismo con el fin de verificar la viabilidad de la transferencia de las ecuaciones de predicción en el equipo Master (*at-line*). Para ello, se ha de llevar a cabo nuevamente la validación externa del colectivo de calibración, con el fin de corroborar la robustez del mismo,

empleando el colectivo muestral del Set 4 (apartado 3.1.), muestras que son utilizadas en todos los procesos de validación externa que llevamos a cabo en el presente estudio.

3.4.1 TRATAMIENTO QUIMIOMÉTRICO DE LOS DATOS

El tratamiento quimiométrico para el desarrollo y evaluación de los modelos de predicción se realizó utilizando el software WinISI II ver.1.50 (Infrasoft International).

Los estadísticos obtenidos en la validación de los modelos predictivos se comentan en los apartados 2.2.6.7. y 3.4.1.3. En función de estos estadísticos, se valora la robustez del modelo de predicción. Los valores del error estándar de validación cruzada (SECV), estadístico considerado como mejor estimador que el error estándar de calibración (SEC) de la capacidad predictiva de una ecuación NIRS (Shenk y Westerhaus, 1995b), son de magnitud similar al error estándar de laboratorio (SEL) del método de referencia. Por tanto, asumiendo que el SECV es aproximadamente igual que el SEL, la relación entre el SECV y el error estándar de predicción (SEP) ha de estar comprendida entre 0,5 y 1,5 (Savenije *et al.*, 2005; de la Roza *et al.*, 2013). Ello indica no sólo la alta calidad de los datos de referencia sino también la alta repetibilidad de la medida espectral y la alta correlación entre los datos espectroscópicos y los datos de referencia. Por tanto, esta relación es muy aceptable para evaluar la eficacia de la calibración y robustez del modelo de predicción. La obtención de un modelo de calibración robusto, posibilita la transferencia de las ecuaciones de predicción desarrolladas en el equipo *at-line* a los equipos *on-site* u *on-line*.

3.4.1.1 DESARROLLO DE LOS MODELOS DE CALIBRACIÓN Y SU EVALUACIÓN

Partiendo de los datos espectrales y químicos, de las muestras del colectivo de calibración (apartado 3.1.), y de acuerdo con el protocolo para el desarrollo de ecuaciones de calibración NIRS descrito por Shenk y Westerhaus (Shenk y Westerhaus, 1995a, 1995b y 1996), se procedió a la eliminación de anómalos espectrales.

Como paso previo al desarrollo de los modelos de calibración, se aplicó el algoritmo CENTER del paquete quimiométrico ISI a los datos espectrales del colectivo de calibración. La finalidad de esta etapa consiste en reducir la dimensionalidad del colectivo de partida, a partir de la evaluación de la presencia de muestras anómalas espectrales mediante el cálculo de la distancia H de cada muestra al centro de la

población. Este estadístico H , es una variante de la distancia de Mahalanobis (apartado 2.2.5.4), que proporciona información acerca de la distancia, dentro del espacio multivariante definido por las componentes principales, entre cada muestra (espectro) y el centro de un grupo de muestras.

Se consideran muestras atípicas aquellas que tienen un valor de $H > 3$. Los espectros anómalos fueron eliminados, repitiendo el proceso de detección y eliminación de anómalos espectrales hasta lograr que todas las muestras presentaran un valor de H inferior al valor máximo recomendado.

La primera etapa en el desarrollo de los modelos de calibración es seleccionar los pretratamientos de las señales espectroscópicas que minimicen efectos como la dispersión o la refracción de la radiación. En el presente trabajo, se llevaron a cabo diferentes pretratamientos de la señal espectroscópica NIR tales como la derivación y la corrección del fenómeno de radiación dispersa o *scattering*, con *Standard Normal Variate (SNV) and Detrend (DT)* (Barnes *et al.*, 1989 y 1994; Dhanoa *et al.*, 1994 y 1995).

La derivación se utiliza principalmente con tres propósitos: discriminación espectral (acentuando pequeñas diferencias entre espectros prácticamente iguales), aumento de la resolución espectral (incrementando la resolución aparente de bandas espectrales solapadas) y análisis cualitativo (como técnica de corrección de absorciones irrelevantes relacionadas con ruido de fondo y para facilitar el análisis multivariante).

Además del tratamiento matemático de derivadas, se aplicó un pretratamiento de *SNV & D* a los datos espectrales para corregir el fenómeno de la radiación dispersa. El *D* o *DT* se utiliza para eliminar la curvatura lineal o cuadrática de la línea base del espectro debido a las diferentes presiones de empaquetamiento. Mientras que la finalidad del *SNV* es reducir el efecto del tamaño de partícula y la dispersión de la luz. El pretratamiento de corrección de la radiación difusa *SNVD (Standard Normal Variate and Detrend)* es una combinación de los dos métodos anteriores, ya que corrige la línea base y elimina las diferencias entre los espectros correspondientes a muestras de similar composición química. En todas las ecuaciones de calibración generadas se aplicó un pretratamiento *SNV+D* para la corrección del fenómeno de radiación dispersa y

diferentes tratamientos matemáticos de derivadas para optimizar la precisión de los modelos generados.

A continuación, las ecuaciones de calibración fueron generadas a partir de una modificación de la regresión por mínimos cuadrados parciales (MPLS). El algoritmo PLS (Mínimos Cuadrados Parciales) lleva a cabo una regresión multivariante en la que se reducen los datos espectrales a una serie de variables fundamentales (factores LV) que no sólo resumen la mayor parte de la información espectral, sino que también son las que mayor correlación alcanzan con los valores de referencia. En la regresión MPLS los residuos obtenidos después del cálculo de cada término de regresión son estandarizados (dividiendo por la desviación típica antes de calcular el siguiente término de regresión).

Como opciones de la regresión MPLS se incluyeron el cálculo de un máximo de 12 términos de regresión o factores LV (generalmente se aconseja uno por cada diez muestras más dos o tres términos adicionales), el uso de 4 grupos de validación cruzada y la aplicación de un máximo de 6 etapas de eliminación de datos anómalos. El número óptimo de términos de la regresión se determinó automáticamente minimizando el error de validación cruzada y empleando el estadístico T , similar a una t de Student, que evalúa la presencia de muestras anómalas en cuanto a su composición de referencia. Este estadístico compara, para cada muestra, el valor del constituyente obtenido mediante el método de referencia (y_i) y el valor predicho por la ecuación de calibración NIRS (\hat{y}_i). Se consideraron muestras anómalas en cuanto a su composición química, aquellas que presentaron valores del estadístico T superiores a 2,5 (Mark y Workman, 1991).

$$T = \frac{(y_i - \hat{y}_i)}{ETC} = \frac{Residual}{ETC}$$

El modo de descripción de los tratamientos generados en el software WinISI presenta una nomenclatura de cuatro dígitos: (a, b, c, d). El primer dígito (a) hace referencia al orden de magnitud de la derivada aplicada (0 = espectro sin derivar, 1 = 1ª derivada, 2 = 2ª derivada, etc.). El segundo dígito (b) indica el tamaño del segmento sobre el cual se realiza la derivación (intervalo expresado en nanómetros dónde se realiza el cálculo de la derivada). El tercero (c) y el cuarto (d) dígito muestran el tamaño

de los intervalos, expresado en nanómetros, empleados para el cálculo de suavización de la derivada (Shenk y Westerhaus, 1995b).

Una vez desarrollados los modelos es necesario evaluar la calidad de los mismos y sus características de exactitud y precisión:

- Error típico de calibración (ETC o SEC): es el error típico de los residuales para el colectivo de calibración. Su fórmula es la que a continuación figura, donde N representa el número de muestras del colectivo de calibración, p el número de factores o términos de la regresión, e y_i el valor del constituyente a calibrar para la muestra i e \hat{y}_i el valor estimado por la ecuación de calibración para la muestra i .
- Coefficiente de determinación (R^2): muestra el porcentaje de la variabilidad existente 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 (r^2). Su fórmula es:

$$ETC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N - p - 1}}$$

- Error típico de validación cruzada (ETVC o SECV) y error típico de predicción (ETP): representan el error típico de los residuales para el colectivo de validación cruzada o de predicción respectivamente. Sus fórmulas son:

$$ETVC \cong ETP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N - 1}}$$

donde N representa el número de muestras empleadas como colectivo de validación cruzada o de predicción.

$$R^2 = \frac{SC_{reg}}{SC_{tot}} = \frac{SC_{tot} - SC_{res}}{SC_{tot}} = 1 - \frac{SC_{res}}{SC_{tot}} = 1 - \frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2}$$

siendo SC_{reg} la suma de cuadrados de la regresión, SC_{res} la suma de cuadrados de los residuales, SC_{tot} la suma de cuadrados total y N el número de muestras del colectivo.

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, debería aproximarse a 1,0.

- RER (Williams, 2001): muestra la relación entre el intervalo de composición de los datos de referencia para el colectivo de calibración y el error típico de validación cruzada. Este cociente deberá ser al menos igual a 10

$$RER = \frac{\text{Intervalo}}{ETVC} = \frac{y_{max} - y_{min}}{ETVC}$$

siendo y_{max} e y_{min} el valor máximo y mínimo de composición, respectivamente, del colectivo de calibración.

Como se ha comentado anteriormente en el apartado 2.2.6.7, una vez desarrolladas las ecuaciones para el análisis por NIRS, la selección para su aplicación a nivel de rutina dependerá de los estadísticos obtenidos. Las mejores ecuaciones de calibración NIRS son seleccionadas de acuerdo con los valores para los estadísticos r^2 y $ETVC$ (o $SECV$). Es decir, que se ha de elegir la ecuación con mayores coeficientes de determinación y menores errores de predicción, habiéndose de cumplir dos de los tres criterios que a continuación figuran:

1. El error estándar de validación cruzada (ETVC o SECV) sea igual o inferior a 1.33 multiplicado por el error estándar de calibración (ETC o SEC).
2. La correlación mayor o igual a 0,7.
3. En caso de validación externa, la pendiente no diferente a 1.

3.4.1.2 DESARROLLO DE LOS MODELOS DE CALIBRACIÓN ADAPTADOS A LOS RANGOS DE LONGITUDES DE ONDA DE LOS EQUIPOS SATÉLITE.

Previo a la transferencia de los modelos es importante tener en cuenta que el rango espectral es distinto para los tres instrumentos (Master, Satélite 1: Corona 45 VisNIR 1.7 y Satélite 2: Phazir 1624 Handhled NIR). Tampoco son coincidentes los intervalos de longitudes de onda, a los cuales recoge información espectral cada

instrumento (2, 3 y 8 nm respectivamente), por ello, se ha de llevar a cabo una interpolación lineal de los espectros tomados por los equipos Satélites 1 y 2, en sus correspondientes intervalos de longitudes de onda de trabajo y para un paso de onda constante de 2 nm. Para llevar a cabo este proceso, el grupo de investigación del SERIDA ha desarrollado una macro en Excel que de manera automatizada genera, a partir de la base de datos del equipo Satélite una nueva base de datos con un intervalo constante de 2 nm. Así, por ejemplo, para una muestra dada el equipo Satélite dispone de valores de $\log(1/R)$ para las longitudes de onda de 398,9 y 402,2 nm, pero nosotros para compararlo con el equipo Master necesitamos conocer el valor de $\log(1/R)$ a 400nm, pues bien, la macro diseñada calcula la recta que une los dos puntos conocidos de equipo Satélite y después estima el valor reflectancia a 400 nm interpolando en dicha recta.

Para llevar a cabo la transferencia de los modelos es necesario desarrollar con el Set 1, nuevos modelos de calibración en el rango de trabajo de cada uno de los equipos satélite:

- Rango 400-1.710 nm: Rango completo del equipo NIR Corona.
- Rango 1.100-1.710 nm: Rango trimado del equipo NIR Corona.
- Rango 1.596-2.396 nm: Rango completo del equipo NIR Phazir.
- Rango 1.596-2.090 nm: Rango trimado del equipo NIR Phazir.

La estrategia seguida para el desarrollo detallado de los modelos es la misma que se ha descrito en el apartado 3.4.1.1.

Concretamente, para el desarrollo de los modelos de regresión se evaluaron las siguientes estrategias matemáticas, en primera y segunda derivada: 1,5,5,1, 1,2,8,5 y 2,6,4,1. La selección de los tratamientos matemáticos 1,5,5,1 y 2,6,4,1 en particular, se hizo tomando como referencia resultados previos del grupo de investigación del SERIDA (Soldado *et al.* 2013b). En lo referente al modelo 1,2,8,5, fue seleccionado porque este pretratamiento resultó el más eficaz para llevar a cabo la selección de anomalos espectrales en la base de datos muestral del equipo Satélite 2.

Teniendo en cuenta que este tratamiento matemático no había sido evaluado con anterioridad sobre el rango espectral del equipo Master, fue necesario desarrollar un nuevo modelo con este pretratamiento y realizar su evaluación posterior.

En la Tabla 3.1 se representan esquemáticamente cada uno de los tratamientos ensayados en el presente estudio.

Tabla 3.1. Ecuaciones de calibración desarrolladas

Rango	Ecuación	Tratamiento matemático	Corrección de radiación difusa
Corona (400-1098, 1100-1710 nm)	1	1,5,5,1	SNVD
	2	2,6,4,1	SNVD
Corona (1100-1710 nm)	3	1,5,5,1	SNVD
	4	2,6,4,1	SNVD
Phazir (1596-2396 nm)	5	1,5,5,1	SNVD
	6	2,6,4,1	SNVD
Phazir (1596-2090 nm)	7	1,5,5,1	SNVD
	8	2,6,4,1	SNVD

Una vez seleccionada la mejor ecuación para un determinado constituyente, la misma es evaluada utilizando para ello un colectivo diferente al utilizado para la obtención de la calibración (validación externa).

3.4.1.3 VALIDACIÓN EXTERNA DE LOS MODELOS DE CALIBRACIÓN

Con el fin de evaluar la robustez de los modelos desarrollados, es necesario llevar a cabo una validación externa de los mismos. Para ello se comparan los resultados predichos por los modelos desarrollados con aquellos obtenidos mediante la realización de los correspondientes análisis de referencia (apartado 3.3).

Los estadísticos utilizados para evaluar los resultados de la validación externa son los siguientes:

- Sesgo o BIAS: informa acerca de la media de las diferencias existentes entre el valor del constituyente determinado por el método de referencia ($i y$) y el valor predicho por la ecuación de calibración ($i \hat{y}$), para la muestra i , siendo N el número de muestras del colectivo de calibración. Su fórmula es:

$$sesgo = \frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)}{N}$$

- Error típico de predicción corregido por el sesgo ($ETP(C)$): es un estimador del error aleatorio o error no explicado por la regresión. Se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$ETP(C) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i - sesgo)^2}{N - 1}}$$

Se establece un límite para el $ETP(C)$, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Límite } ETP(C) = ETC \times 1,3$$

3.5 CLONACIÓN / ESTANDARIZACIÓN DE INSTRUMENTOS Y TRANSFERENCIA DE CALIBRACIONES

En esta parte del estudio llevado a cabo, se ha realizado la estandarización de dos instrumentos NIRS portátiles. Para ello, se ha seleccionado el equipo Foss-NIRSystems 6500 como equipo Master, en el cual se desarrollaron las ecuaciones de predicción para la determinación de parámetros nutritivos y fermentativos de ensilados de maíz; así como otros dos equipos, Corona 45 VisNIR 1.7 y Phazir 1624 Handheld NIR, elegidos como Satélites. Los tres equipos utilizados se encontraban ubicados en el laboratorio de NIRS del Área de Nutrición, Pastos y Forrajes del SERIDA, en el momento del presente estudio.

3.5.1 TRANSFERENCIA DE ECUACIONES DE CALIBRACIÓN NIRS

Las ecuaciones de calibración NIRS transferidas fueron aquellas que resultaron más robustas para la predicción de los parámetros de calidad de los ensilados en cada uno de los rangos de trabajo de los diferentes equipos satélite (ver Figura 3.7).

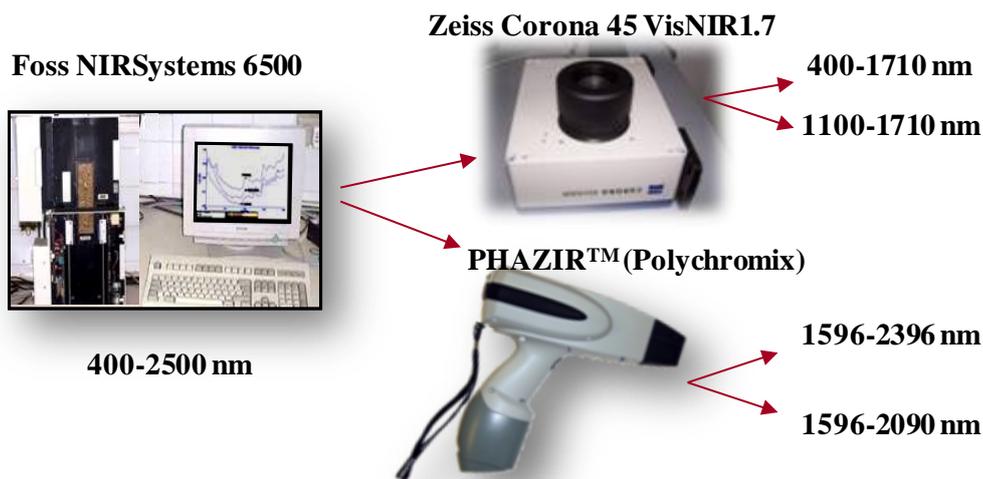


Figura 3.7. Transferencia Master-Satélite

Como se ha indicado con anterioridad, los espectros NIR utilizados para este propósito fueron recogidos con el equipo monocromador Foss-NIRSystems 6500 en el rango comprendido entre los 400 – 2.500 nm y posteriormente trimados a los rangos de lectura de los equipos *on-site* (apartado 3.4.1.2.).

3.5.2 MUESTRAS EMPLEADAS EN LA ESTANDARIZACIÓN

Para llevar a cabo la estandarización entre el equipo Master y los Satélites, como paso previo a la transferencia de las ecuaciones de calibración desarrolladas en un instrumento NIRS *at-line* a los dos equipos *on-site*, se han empleado los colectivos muestrales descritos anteriormente (Sets 2 y 3), pero combinados. Las características de dichos grupos de muestras son las siguientes (ver Figura 3.8):

- Colectivo de Estandarización A: formado por 10 muestras de ensilado de maíz recogidas según el Método de Homogeneización B (apartado 3.1) y escaneadas por los tres equipos NIRS utilizados (Set 3).
- Colectivos de Estandarización B:
 - ~ B1: incluye el colectivo de muestras del Set 3 y 10 muestras del Set 2 recogidas según lo descrito en el apartado. La selección de las 10 muestras del Set 2 se realizó mediante el programa CENTER evitando la incorporación de muestras anómalas en el colectivo de estandarización.

- ~ B2: constituido por los colectivos muestrales del Set 2 y del Set 3, a excepción de una muestra del Set 2 que presentaba valores de $H > 3$.

Para evaluar el proceso de estandarización y transferencia de ecuaciones entre instrumentos se han empleado dos colectivos de validación:

- Validación A: Se han utilizado como colectivos de validación externa las muestras del Set 2 y del Set 4 (apartado 3.1.).
- Validación B: Se ha empleado como colectivo de validación el conjunto de muestras integrantes del Set 4.

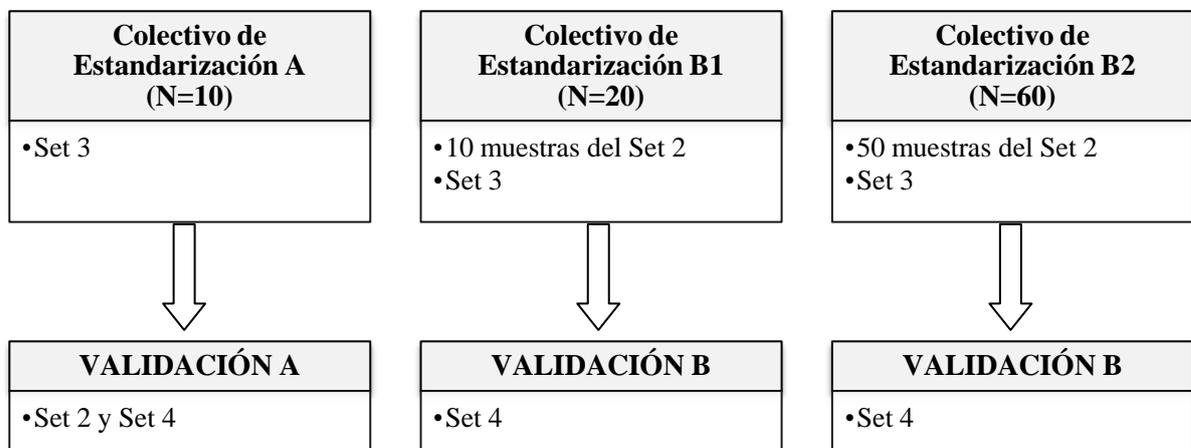


Figura 3.8. Colectivos de Estandarización y Validación

Una vez recogida la información espectral en todos los equipos, se evaluaron las diferencias espectrales entre la información recogida en el equipo Master algoritmo vs los equipos Satélite, cuantificando las diferencias entre los mismos para cada una de las longitudes de onda de las muestras englobadas en los Sets 2 y 3. El estadístico que describe estas diferencias es el RMS (Shenk y Westerhaus, 1990, 1991, 1992 y 1995).

El valor del estadístico raíz cuadrática media (RMS) para una única submuestra j (RMS_j) viene dado por la siguiente ecuación:

$$RMS_j = 10^6 \times \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n D_{ij}^2}{n}}; \quad D_{ij} = y_{ij} - \bar{y}_i$$

Siendo,

y_{ij} : $\log(1/R)$ a λ_i para una submuestra (espectro) j .

y_i : $\log(1/R)$ a λ_i para el espectro medio de N submuestras de una muestra

n : número de datos espectrales

Simultáneamente a la obtención del valor de RMS, se llevó a cabo la comparación del valor medio de la raíz cuadrada de las diferencias, corregidas por el sesgo o BIAS, ($RMS(C)$) entre espectros de las mismas muestras obtenidos en los instrumentos Master y Satélite a n longitudes de onda. La fórmula de este estadístico es:

$$RMS(C) = 10^6 \times \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_{ij} - y_{ik})^2 - \frac{\left(\sum_{i=1}^n (y_{ij} - y_{ik})\right)^2}{n}}{n-1}}$$

donde:

y_{ij} : Valor de $\log(1/R)$ de la submuestra j para la longitud de onda i (λ_i).

y_i : Valor de $\log(1/R)$ de la submuestra k para la longitud de onda i (λ_i).

n : número de longitudes de onda empleadas.

Como se puede deducir de la fórmula anterior, valores altos de $RMS(C)$ indican diferencias notables entre espectros, mientras que valores bajos indicarían una mayor similitud espectral.

Una vez calculado dicho parámetro se procedió a la creación de los ficheros de estandarización, con los cuales se desarrollarán las correspondientes matrices de estandarización. En este estudio, se ha planteado la estandarización directa mediante el algoritmo incorporado en el software WinISI ver. 1.05 y desarrollado por Shenk y Westerhaus (1989). Se construyeron 8 ficheros de estandarización diferentes, constituidos por 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 y 60 muestras, seleccionadas en función de los valores de $RMS(C)$ obtenidos a partir de los correspondientes colectivos de estandarización, los cuales se presentan en la Tabla 3.2. Las muestras integrantes de dichos ficheros fueron elegidas por orden de menor a mayor valor de $RMS(C)$. Con el desarrollo de esta actividad comprobamos que no existen diferencias en los colectivos

muestrales obtenidos por uno u otro método de homogeneización, luego el Set 2 y el Set 3 podrán tratarse con posterioridad como si de un mismo colectivo muestral se tratase.

Las matrices de estandarización obtenidas, se aplicaron sobre los espectros de recogidos en los instrumentos Satélite siguiendo la metodología que se detalla en la Tabla 3.2. Cada una de estas 8 matrices de estandarización fue diferente en función del equipo satélite a estandarizar y del rango de trabajo empleado. Así, en el presente estudio se desarrollaron 8 matrices x 2 equipos satélite x 2 rangos de longitudes de onda para cada equipo, lo que hace un total de 32 matrices de estandarización diferentes.

Tabla 3.2. Ficheros de estandarización desarrollados y colectivos de validación empleados

Colectivo de Estandarización	Ficheros de Estandarización	Colectivo de Validación
Set 3 (N=1)	STD _{1st}	Set 2 y Set 4
Set 3 (N=2)	STD _{2st}	Set 2 y Set 4
Set 3 (N=3)	STD _{3st}	Set 2 y Set 4
Set 3 (N=4)	STD _{4st}	Set 2 y Set 4
Set 3 (N=5)	STD _{5st}	Set 2 y Set 4
Set 3 (N=10)	STD _{10st}	Set 2 y Set 4
Set 3 + 10 muestras del Set 2 (N=20)	STD _{20st}	Set 4
Set 3 + 50 muestras del Set 2 (N=60)	STD _{60st}	Set 4

4 RESULTADOS EXPERIMENTALES

Es importante reseñar que en el presente trabajo se ha planteado una estrategia cuantitativa para la predicción de parámetros nutritivos y fermentativos de ensilados de maíz en su forma intacta, con el fin de evaluar la posible implantación de controles de calidad a pie de campo.

4.1 DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE LAS ECUACIONES DE CALIBRACIÓN EXISTENTES

A partir de los datos de referencia obtenidos según la metodología descrita en el apartado 3.3. y los datos espectroscópicos recogidos según figura en el apartado 3.2., se pretende desarrollar ecuaciones de calibración para la determinación de parámetros de calidad de ensilado de maíz en fresco y a pie de explotación.

Se ensayaron 3 tratamientos matemáticos diferentes, ya descritos en la sección de material y métodos y resumidos en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Ecuaciones de calibración desarrolladas para el Rango 400-1098, 1100-2500 nm, rango del equipo Master.

Rango	Ecuación	Tratamiento matemático	Corrección de radiación difusa
Foss-NIRSystems 6500 (400-1098, 1100-2500 nm)	1 _{Master}	1,5,5,1	SNVD
	2 _{Master}	2,6,4,1	SNVD
	3 _{Master}	1,2,8,5	SNVD

Los estadísticos de calibración obtenidos para cada uno de los modelos de predicción descritos en la Tabla 4.1, se muestran en la Tabla 4.2. Como puede observarse, la precisión y exactitud para la mayor parte de las variables ha sido buena, teniendo en cuenta los valores de SECV y R^2 . A la vista de los resultados, se puede afirmar que los mejores estadísticos se obtuvieron con el tratamiento matemático 2,6,4,1, confirmando los resultados obtenidos por Soldado *et al.* (2013b). Los valores del coeficiente de determinación de los parámetros analíticos evaluados, tanto para el colectivo de calibración (R^2) como para el colectivo de validación cruzada (r^2), fueron

excelentes para MS_{real}, buenos para PBF, FNDF, FADLCF, ALMF y FBF y aceptables para CZF.

En el presente estudio se han desarrollado también los correspondientes modelos de predicción de parámetros fermentativos; sin embargo para ninguno de ellos, con los tratamientos evaluados fue posible alcanzar resultados satisfactorios, por ello, a continuación sólo se detallan los resultados obtenidos para los parámetros nutritivos.

Tabla 4.2. Predicción de parámetros nutritivos por los Modelos de calibración desarrollados

PARÁMETROS NUTRITIVOS									
Parámetro	Tto mat.	Rango	SD	N	SEC	RSQ	SECV	1-VR	RER
MS real	1,5,5,1	24,42-42,68	3,46	228	0,73	0,96	0,84	0,94	21,74
	2,6,4,1	24,42-42,68	3,46	230	0,72	0,96	0,82	0,95	22,32
	1,2,8,5	24,42-42,68	3,46	233	0,75	0,95	0,88	0,94	20,75
CZF	1,5,5,1	0,48-1,69	0,20	230	0,12	0,67	0,14	0,54	8,83
	2,6,4,1	0,66-1,69	0,20	230	0,11	0,67	0,14	0,51	7,30
	1,2,8,5	0,68-1,64	0,19	218	0,17	0,23	0,17	0,19	5,61
PBF	1,5,5,1	1,38-3,00	0,28	227	0,12	0,83	0,13	0,77	12,09
	2,6,4,1	1,43-3,18	0,28	231	0,10	0,88	0,13	0,79	13,36
	1,2,8,5	1,38-3,00	0,28	227	0,12	0,82	0,14	0,77	17,81
FNDF	1,5,5,1	10,68-17,42	1,25	232	0,57	0,79	0,60	0,77	11,27
	2,6,4,1	10,61-17,42	1,22	228	0,41	0,89	0,52	0,82	13,20
	1,2,8,5	10,68-16,67	1,15	222	0,56	0,76	0,58	0,75	10,27
FADLCF	1,5,5,1	6,36-10,25	0,74	228	0,33	0,81	0,36	0,77	10,90
	2,6,4,1	6,18-10,25	0,75	229	0,29	0,85	0,34	0,80	12,11
	1,2,8,5	6,36-10,25	0,75	226	0,32	0,81	0,36	0,77	10,93
ALMF	1,5,5,1	4,23-16,51	2,25	228	0,79	0,88	0,92	0,83	14,46
	2,6,4,1	4,23-16,51	2,24	228	0,77	0,88	0,89	0,84	13,74
	1,2,8,5	6,18-10,25	0,75	229	0,29	0,85	0,34	0,80	32,47
FBF	1,5,5,1	5,63-8,53	0,57	225	0,23	0,85	0,27	0,78	10,78
	2,6,4,1	5,63-8,53	0,58	227	0,24	0,83	0,29	0,76	10,10
	1,2,8,5	5,63-8,53	0,54	219	0,22	0,83	0,26	0,77	10,98

Tto mat.: Tratamiento matemático; **SD:** Desviación estándar; **N:** Número de muestras; **RSQ:** Medida de bondad de ajuste del modelo de regresión utilizado; **SECV:** Error estándar de validación cruzada; **1-VR:** coeficiente de determinación de la validación cruzada; **RER:** Estadístico de calidad de la ecuación (sesgo/SECV).

En relación al parámetro Cenizas, los resultados pueden estar relacionados con el hecho de que esta propiedad representa la parte inorgánica de la muestra, por ello, su estimación se realiza de forma indirecta como la diferencia a 100 con respecto a la materia orgánica.

Por otro lado, la correlación entre los valores predichos y de referencia se pone de manifiesto para todos los parámetros nutritivos excepto para las cenizas, con coeficientes de determinación de la validación cruzada (1-VR) alrededor de 0,8. Hecho que se reafirma mediante el cálculo del estadístico RER. Los valores obtenidos superan los límites establecidos para la predicción cuantitativa de datos (apartado 2.2.6.7.), ya que en la mayor parte de los parámetros evaluados el estadístico RER es mayor de 12, lo que indica una buena capacidad de predicción de la ecuación. En el caso concreto de las CZF, la aplicación del modelo 1,5,5,1 permite obtener el mayor valor de RER (8,83).

Para evaluar las ecuaciones de calibración desarrolladas y como hemos comentado con anterioridad en el apartado 3.4.1.1, éstas han de cumplir dos de los tres criterios siguientes:

1. El error estándar de validación cruzada (ETVC) sea igual o inferior a 1.33 multiplicado por el error estándar de calibración (ETC).
2. La correlación mayor o igual a 0,7
3. En caso de validación externa, la pendiente no diferente a 1.

Atendiendo a los estadísticos expuestos y criterios de selección comentados: en la Tabla 4.2., se señalan en verde aquellos parámetros que además de tener un alto valor de R^2 y bajo SECV, cumplen con al menos dos de los criterios establecidos. Asimismo, se señalan en naranja aquellos parámetros (CZF) que presentan un coeficiente de determinación, tanto para el colectivo de calibración (R^2) como para el colectivo de validación cruzada (r^2) aceptable. En vista de los resultados obtenidos hasta el momento, podemos concluir que éstos son indicadores de una buena precisión de las ecuaciones de calibración existentes (ecuaciones 1_{Master} , 2_{Master} y 3_{Master}).

4.1.1 PREDICCIÓN DEL COLECTIVO DE VALIDACIÓN EXTERNA

Una vez evaluada la calidad de los modelos de predicción desarrollados, en base a los estadísticos de calibración, se determina su robustez mediante la predicción de muestras no empleadas en la calibración (validación externa). Para ello, se aplican estas ecuaciones, sobre el conjunto de muestras del Set 4, el cual contiene 20 muestras de ensilados de maíz. En las tablas 4.3, 4.4 y 4.5 se muestran los estadísticos de validación externa obtenidos con cada uno de los modelos desarrollados:

Tabla 4.3. Predicción de parámetros nutritivos del colectivo de validación (Set 4) tras aplicar la ecuación 1_{Master}.

Tratamiento matemático: 1,5,5,1					
Parámetro	SLOPE	RSQ	SEP	SECV/SEP	GH / NH
MS real	1,063	0,960	1,430	1,723	2,397 / 1,320
CZF	0,995	0,731	0,217	1,418	
PBF	1,035	0,869	0,183	1,083	
FND	1,037	0,877	0,678	1,249	
FAD	1,107	0,855	0,410	1,239	
ALMF	1,039	0,937	1,261	1,378	
FB	0,884	0,816	0,339	1,224	

SLOPE: Pendiente; **RSQ:** Medida de bondad de ajuste del modelo de regresión utilizado; **SEP:** Error estándar de predicción; **SECV/SEP:** Error estándar de validación cruzada/Error estándar de predicción

Tabla 4.4. Predicción de parámetros nutritivos del colectivo de validación (Set 4) tras aplicar la ecuación 2_{Master}.

Tratamiento matemático: 2,6,4,1					
Parámetro	SLOPE	RSQ	SEP	SECV/SEP	GH / NH
MS real	1,085	0,973	1,169	1,292	2,741 / 1,489
CZF	0,913	0,651	0,269	1,047	
PBF	1,130	0,939	0,099	0,566	
FND	0,904	0,836	0,602	0,715	
FAD	1,023	0,879	0,387	0,714	
ALMF	1,046	0,925	1,086	0,942	
FB	1,035	0,840	0,312	0,556	

SLOPE: Pendiente; **RSQ:** Medida de bondad de ajuste del modelo de regresión utilizado; **SEP:** Error estándar de predicción; **SECV/SEP:** Error estándar de validación cruzada/Error estándar de predicción

Tabla 4.5. Predicción de parámetros nutritivos del colectivo de validación (Set 4) tras aplicar la ecuación 3_{Master}.

Tratamiento matemático: 1,2,8,5					
Parámetro	SLOPE	RSQ	SEP	SECV/SEP	GH / NH
MS real	1,062	0,973	1,462	1,688	22,129 / 2,217
CZF	0,982	0,742	0,193	1,556	
PBF	1,066	0,890	0,200	1,754	
FND	1,031	0,874	0,727	1,475	
FAD	1,085	0,837	0,439	1,152	
ALMF	1,116	0,937	1,099	1,153	
FB	0,950	0,802	0,321	1,049	

SLOPE: Pendiente; **RSQ:** Medida de bondad de ajuste del modelo de regresión utilizado; **SEP:** Error estándar de predicción; **SECV/SEP:** Error estándar de validación cruzada/Error estándar de predicción

El valor medio del estadístico H (distancia de Mahalanobis, apartado 2.2.6.5) fue 2,397, inferior al límite máximo recomendado por el programa ($H < 3$), cuando fue aplicada la ecuación desarrollada a partir del tratamiento matemático 1,5,5,1 (ecuación 1_{Master}); e igualmente, cuando se aplicó la ecuación obtenida a partir del tratamiento 2,6,4,1 (ecuación 2_{Master}), siendo el resultado obtenido de 2,741 ($H < 3$).

Como se ha comentado en el apartado 3.4.1., la relación entre el SECV y el error estándar de predicción (SEP) ha de estar comprendida entre 0,5 y 1,5, para que la ecuación de calibración desarrollada sea considerada aceptable e indicadora de la robustez del modelo de predicción (Savenije *et al.*, 2005; de la Roza *et al.*, 2013). En las Tablas 4.3, y 4.4., figuran en verde los parámetros con resultados óptimos y en rojo los resultados con valores superiores al límite establecido. Cuando es aplicada la ecuación 1_{Master} (tratamiento matemático 1,5,5,1), los resultados dan valores comprendidos dentro de los límites establecidos (apartado 3.4.2.1.) para todos los parámetros nutritivos analizados, a excepción de la MS real. Mientras que tras aplicar la ecuación 2_{Master} todos los parámetros cumplen este criterio. Luego, la ecuación 2_{Master} es más robusta, ya que es óptima para todos los parámetros nutritivos; mientras que, la ecuación 1_{Master} no es robusta para el análisis de la MSreal.

El análisis de los resultados correspondientes a la validación externa del modelo desarrollado con el tratamiento 1,2,8,5, que se muestran en la Tabla 4.5 muestra: 1) una menor robustez de dicha ecuación, en comparación con la ecuaciones 1_{Master} y 2_{Master} (Tablas 4.3. y 4.4.), para tres parámetros: MSreal, CZF y PBF; y 2) un valor del estadístico H muy por encima del límite establecido ($H < 3$). Atendiendo a lo expuesto, la aplicación del tratamiento matemático 1,2,8,5, parece conllevar una distorsión del colectivo muestral de validación con respecto al centro poblacional muy significativa. En base a ello, se decide no aplicar dicha ecuación en el presente estudio.

4.2 DESARROLLO DE NUEVOS MODELOS DE CALIBRACIÓN

Es importante recordar que, de acuerdo con el plan de trabajo propuesto se ha de realizar la transferencia de la biblioteca espectral del equipo *at-line*, con el objetivo de desarrollar ecuaciones de predicción óptimas para los equipos *on-site* utilizados. Para ello, y como hemos comentado previamente en el apartado 3.4.1.2., se ha de proceder a la interpolación de los espectros del colectivo de calibración (recogido en el rango 400-

2500 nm, en dos segmentos) y posterior trimado o cortado de acuerdo a los rangos espectrales de los equipos *on-site* ya comentados:

- Rango 400-1.098, 1.100-1.710 nm: Rango completo del equipo NIR Corona.
- Rango 1.100-1.710 nm: Rango trimado del equipo NIR Corona.
- Rango 1.596-2.396 nm: Rango completo del equipo NIR Phazir.
- Rango 1.596-2.090 nm: Rango trimado del equipo NIR Phazir.

Con las nuevas bibliotecas espectrales obtenidas en los diferentes rangos de longitudes de onda comentados, se desarrollan nuevos modelos quimiométricos. Para ello, a partir de los datos de referencia y de los datos espectroscópicos del colectivo de calibración (Set 1) se inicia el trabajo de desarrollo de ecuaciones de calibración NIRS descrito por Shenk y Westerhaus (1995a,b y 1996), siguiendo la metodología propuesta en el apartado 3.4.

Se han desarrollado un total de 8 modelos de calibración, 4 para cada equipo Satélite, los cuales difieren en el tratamiento matemático aplicado y el rango espectral a partir del cual han sido desarrolladas (Tabla 3.1.).

Las Tablas 4.6., 4.7., 4.8. y 4.9., muestran los estadísticos obtenidos durante el desarrollo de las ecuaciones de calibración obtenidas a partir de la información espectral recogida por el equipo Master (Set 1) y previamente trimada o reducida a los rangos de interés de los equipos Satélite. Los resultados evidencian lo expuesto en la etapa previa (apartado 4.1.); es decir, de todos los parámetros nutritivos a analizar, los resultados fueron excelentes para MS real, buenos para PBF, FNDF, FADLCF, ALMF, FBF y aceptables para CZF.

Analizando con detalle los resultados y comparando con los datos obtenidos para el rango del equipo Master completo (Tabla 4.2.), se observa que éstos son similares, si bien para el Rango 1596-2090 nm (Rango del satélite 2), se aprecia una disminución en los valores de los estadísticos. Esto supone que la capacidad predictiva de las ecuaciones desarrolladas para este rango en concreto (ecuaciones 7 y 8), tienen una menor exactitud y capacidad de predicción aunque no muy significativa, pudiendo considerarse igualmente una buena calibración.

Estos resultados se ajustan a lo esperado, ya que dentro de cada espectro hay determinadas absorbancias que se corresponden específicamente con determinados parámetros nutritivos. Luego, al trimar el rango espectral del equipo Master para que se corresponda con el rango espectral de los equipos Satélite, alguno de los parámetros que podrían ser determinados con el equipo *at-line*, puede que no sean determinados con la misma eficacia por los equipos *on-site*. También sucede en algunos casos, que el coeficiente de determinación (R^2) aumenta con respecto al obtenido para el rango del equipo Master, lo que indica la posible eliminación de “ruido” que puede distorsionar el espectro y por lo tanto, la determinación de ciertos parámetros, como ocurre en el caso de la FADLCF cuando es aplicada la ecuación 1.

En las Tablas 4.6 - 4.9., se resalta en verde la mejor ecuación para cada uno de los parámetros analizados, de acuerdo a la evaluación detallada en base a los estadísticos de calibración recogidos en la sección 4 del apartado de material y métodos. De entre todas ellas, se seleccionan aquellas con mayor precisión y exactitud de acuerdo con los estadísticos tradicionalmente empleados en los trabajos científicos (r^2 y SECV) y otro de uso menos frecuente como es el estadístico RER (apartado 3.4.), pero de gran interés desde el punto de vista de la evaluación de la utilidad de una determinada ecuación para su aplicación real a nivel de la industria (Williams y Sobering, 1996).

Tabla 4.6. Estadísticos de predicción del colectivo de calibración para el Rango 400-1098, 1100-1710 nm (Rango Corona Completo)

Parámetro	Ec.	Tto mat.	Rango	SD	N	SEC	RSQ	SECV	1-VR	RER
MS real	1	(1,5,5,1)	24,42-46,20	3,57	226	0,74	0,96	0,81	0,95	26,67
	2	(2,6,4,1)	24,42-46,02	3,58	228	0,74	0,96	0,85	0,94	25,35
CZF	1	(1,5,5,1)	0,68-1,64	0,18	195	0,16	0,14	0,17	0,11	5,71
	2	(2,6,4,1)	0,66-1,69	0,20	228	0,11	0,68	0,14	0,50	7,30
PBF	1	(1,5,5,1)	1,60-3,18	0,27	220	0,13	0,78	0,15	0,70	10,68
	2	(2,6,4,1)	1,60-3,18	0,27	217	0,11	0,84	0,13	0,77	12,15
FNDF	1	(1,5,5,1)	10,68-17,42	1,22	225	0,45	0,87	0,51	0,83	13,29
	2	(2,6,4,1)	10,68-19,89	1,31	231	0,48	0,86	0,56	0,81	16,36
FADLCF	1	(1,5,5,1)	6,36-10,25	0,76	226	0,31	0,84	0,34	0,81	11,58
	2	(2,6,4,1)	6,36-10,25	0,76	232	0,32	0,82	0,36	0,78	10,87
ALMF	1	(1,5,5,1)	4,23-16,51	2,25	226	0,84	0,86	0,93	0,83	13,28
	2	(2,6,4,1)	5,60-16,51	2,21	222	0,78	0,88	0,91	0,83	11,95
FBF	1	(1,5,5,1)	5,63-9,27	0,59	227	0,25	0,82	0,28	0,78	13,09
	2	(2,6,4,1)	5,65-8,53	0,58	229	0,26	0,80	0,29	0,76	10,00

Tto mat.: Tratamiento matemático; **SD:** Desviación estándar; **N:** Número de muestras; **RSQ:** Medida de bondad de ajuste del modelo de regresión utilizado; **SECV:** Error estándar de validación cruzada; **1-VR:** coeficiente de determinación de la validación cruzada; **RER:** Estadístico de calidad de la ecuación (sesgo/SECV).

Tabla 4.7. Estadísticos de predicción del colectivo de calibración para el Rango 1100- 1710 nm (Rango Corona Trimado)

Parámetro	Ec.	Tto mat.	Rango	SD	N	SEC	RSQ	SECV	1-VR	RER
Ms real	3	(1,5,5,1)	24,42-42,68	3,39	218	0,76	0,95	0,81	0,94	22,52
	4	(2,6,4,1)	24,42-42,68	3,40	225	0,76	0,95	0,84	0,94	21,71
CZF	3	(1,5,5,1)	0,48-1,68	0,20	227	0,13	0,58	0,14	0,51	8,45
	4	(2,6,4,1)	0,48-1,69	0,20	226	0,13	0,61	0,14	0,52	8,58
PBF	3	(1,5,5,1)	1,60-3,18	0,27	226	0,13	0,77	0,15	0,70	10,53
	4	(2,6,4,1)	1,60-3,18	0,27	220	0,11	0,85	0,12	0,80	12,95
FNDF	3	(1,5,5,1)	10,61-17,16	1,19	219	0,49	0,83	0,53	0,80	12,34
	4	(2,6,4,1)	10,61-17,16	1,22	221	0,47	0,85	0,52	0,82	12,60
FADLCF	3	(1,5,5,1)	6,18-10,25	0,77	226	0,33	0,81	0,35	0,79	11,60
	4	(2,6,4,1)	6,18-10,20	0,76	227	0,33	0,82	0,35	0,79	11,39
ALMF	3	(1,5,5,1)	4,23-16,51	2,25	222	0,84	0,86	0,89	0,84	13,77
	4	(2,6,4,1)	4,23-16,51	2,22	222	0,83	0,86	0,95	0,83	12,89
FBF	3	(1,5,5,1)	5,63-8,53	0,58	220	0,25	0,81	0,28	0,77	10,47
	4	(2,6,4,1)	5,63-8,49	0,56	217	0,25	0,80	0,27	0,77	10,71

Tto mat.: Tratamiento matemático; **SD:** Desviación estándar; **N:** Número de muestras; **RSQ:** Medida de bondad de ajuste del modelo de regresión utilizado; **SECV:** Error estándar de validación cruzada; **1-VR:** coeficiente de determinación de la validación cruzada; **RER:** Estadístico de calidad de la ecuación (sesgo/SECV).

Tabla 4.8. Estadísticos de predicción del colectivo de calibración para el Rango 1596-2396 nm (Rango Phazir Completo)

Parámetro	Ec.	Tto mat.	Rango	SD	N	SEC	RSQ	SECV	1-VR	RER
Ms real	5	(1,5,5,1)	24,42-41,22	3,24	223	0,71	0,95	0,89	0,93	18,90
	6	(2,6,4,1)	24,42-41,22	3,21	217	0,74	0,95	0,85	0,93	19,70
CZF	5	(1,5,5,1)	0,48-1,69	0,20	227	0,12	0,64	0,14	0,55	8,96
	6	(2,6,4,1)	0,48-1,69	0,20	226	0,13	0,56	0,15	0,42	7,96
PBF	5	(1,5,5,1)	1,38-3,18	0,29	230	0,11	0,85	0,13	0,80	14,17
	6	(2,6,4,1)	1,38-3,18	0,28	225	0,12	0,84	0,14	0,77	13,14
FNDF	5	(1,5,5,1)	10,61-17,42	1,20	223	0,43	0,87	0,46	0,86	14,87
	6	(2,6,4,1)	10,61-16,86	1,17	223	0,05	0,85	0,55	0,78	11,43
FADLCF	5	(1,5,5,1)	6,18-10,25	0,73	223	0,31	0,82	0,34	0,79	12,15
	6	(2,6,4,1)	6,18-10,01	0,69	213	0,36	0,74	0,38	0,70	10,16
ALMF	5	(1,5,5,1)	5,60-15,51	2,14	217	1,07	0,75	1,09	0,74	9,09
	6	(2,6,4,1)	5,60-16,51	2,11	222	1,09	0,73	1,12	0,72	9,74
FBF	5	(1,5,5,1)	5,10-8,53	0,58	226	0,27	0,79	0,31	0,73	11,21
	6	(2,6,4,1)	5,63-8,49	0,56	223	0,30	0,72	0,32	0,67	8,99

Tto mat.: Tratamiento matemático; **SD:** Desviación estándar; **N:** Número de muestras; **RSQ:** Medida de bondad de ajuste del modelo de regresión utilizado; **SECV:** Error estándar de validación cruzada; **1-VR:** coeficiente de determinación de la validación cruzada; **RER:** Estadístico de calidad de la ecuación (sesgo/SECV).

Tabla 4.9. Estadísticos de predicción del colectivo de calibración para el Rango 1596-2090 nm (Rango Phazir Trimado)

Parámetro	Ec.	Tto mat.	Rango	SD	N	SEC	RSQ	SECV	1-VR	RER
Ms real	7	(1,5,5,1)	24,42-41,22	3,15	215	0,90	0,918	0,944	0,911	17,80
	8	(2,6,4,1)	24,42-41,22	3,17	215	0,94	0,912	1,008	0,899	16,67
CZF	7	(1,5,5,1)	0,48-1,64	0,19	222	0,139	0,482	0,149	0,401	7,79
	8	(2,6,4,1)	0,66-1,64	0,19	219	0,138	0,470	0,147	0,397	6,67
PBF	7	(1,5,5,1)	1,38-3,10	0,27	220	0,127	0,783	0,148	0,705	11,62
	8	(2,6,4,1)	1,38-3,00	0,27	217	0,121	0,795	0,136	0,744	11,91
FNDF	7	(1,5,5,1)	5,10-18,45	3,65	210	1,929	0,721	2,088	0,673	6,39
	8	(2,6,4,1)	5,10-18,45	3,65	214	2,019	0,695	2,239	0,632	5,96
FADLCF	7	(1,5,5,1)	6,18-10,20	0,70	219	0,340	0,765	0,356	0,744	11,29
	8	(2,6,4,1)	6,36-10,20	0,69	216	0,340	0,755	0,352	0,740	10,91
ALMF	7	(1,5,5,1)	4,23-16,51	2,20	220	1,081	0,758	1,125	0,738	10,92
	8	(2,6,4,1)	5,60-16,25	2,10	210	1,022	0,761	1,072	0,739	9,93
FBF	7	(1,5,5,1)	5,10-8,49	0,572	192	0,309	0,708	0,318	0,693	10,66
	8	(2,6,4,1)	5,10-8,49	0,567	193	0,297	0,726	0,316	0,692	10,73

Tto mat.: Tratamiento matemático; **SD:** Desviación estándar; **N:** Número de muestras; **RSQ:** Medida de bondad de ajuste del modelo de regresión utilizado; **SECV:** Error estándar de validación cruzada; **1-VR:** coeficiente de determinación de la validación cruzada; **RER:** Estadístico de calidad de la ecuación (sesgo/SECV).

Con relación al coeficiente de determinación de la validación cruzada, en los rangos evaluados en el equipo Satélite 1 se pone de manifiesto, que con la excepción de las cenizas (tal y como sucedía en el equipo Master) el resto de parámetros poseen valores superiores a 0,70 con un rango que va desde 0,70 para la PB hasta 0,95 para la MSreal. En lo referente a los errores de validación cruzada, tal y como sucede en la técnica de referencia, encontramos errores próximos al 1% para la determinación de ALM y mínimos 0,15 % para la determinación de la PB. Estos resultados son acordes totalmente con los valores del estadístico RER, el cual es mayor de 10 para todos los parámetros nutritivos.

Con respecto a la evaluación de la calibración en el rango del equipo Satélite 2, hay que remarcar que los resultados en líneas generales son menos satisfactorios. Así los errores son mayores que aquellos obtenidos para el equipo Satélite 1, los RER son menores de 10 para CZ y ALM; sin embargo, al igual que en equipo Satélite 1, los coeficientes de determinación de la validación cruzada son superiores a 0,7 para todos los parámetros, a excepción de las cenizas. Cuando se trabaja en el rango reducido (1596-2090 nm), la FND también arroja valores del estadístico RER no satisfactorios.

En base a los estadísticos obtenidos, los modelos de predicción, muestran una predicción y exactitud que va de excelente (p.e. MS_{real}) a moderada (p.e. FBF), dados los valores de R^2 para cada parámetro y los valores de SEC inferiores a los de SD. En la Tabla 4.10., se presentan las mejores ecuaciones para cada uno de los rangos analizados, aquellas que predicen satisfactoriamente un mayor número de parámetros, en función del rango espectral considerado.

Tabla 4.10. Mejores ecuaciones para los distintos rangos

RANGO 400-1098, 1100-1710 NM (Rango Corona Completo)	RANGO 1100-1710 NM (Rango Corona Trimado)	RANGO 1596-2396 NM (Rango Phazir Completo)	RANGO 1596-2090 NM (Rango Phazir Trimado)
Ecuación 1 (1,5,5,1)	Ecuación 3 (2,6,4,1)	Ecuación 5 (1,5,5,1)	Ecuación 7 (1,5,5,1)

Mediante la aplicación de todas las ecuaciones planteadas y teniendo en cuenta los criterios de evaluación y selección de ecuaciones ya comentados en el apartado 3.4., en términos generales, las mejores ecuaciones ha sido las desarrolladas a partir del tratamiento matemático 1,5,5,1. Este resultado difiere de lo expuesto en el apartado 4.1., en el que la mejor ecuación para el rango del equipo Master resultó ser la ecuación 2_{Master} , aquella desarrollada a partir del tratamiento matemático 2,6,4,1. Luego, al trimar el rango espectral del equipo Master conforme a los rangos de los equipos Satélite, la ecuación 1_{Master} desarrollada a partir del tratamiento 1,5,5,1 resulta más óptima para la predicción de parámetros nutritivos en los equipos *on-site*.

4.2.1 VALIDACIÓN DE LAS ECUACIONES DE PREDICCIÓN DESARROLLADAS

Una vez obtenidas las ecuaciones de predicción para los rangos de los equipos *on-site* descritos anteriormente y evaluada la capacidad de predicción de las mismas, se ha de proceder a la validación externa de las ecuaciones desarrolladas. Para la validación, se utilizan los colectivos muestrales del Set 2 y del Set 4, descritos en el apartado 3.1.

En las tablas 4.11 y 4.12, se muestran los resultados obtenidos al aplicar cada uno de los modelos de predicción sobre los Sets 2 y 4, en base a los valores de GH. A la vista de los resultados se pone de manifiesto la necesidad de realizar la estandarización

de la información espectral para conseguir una similitud tal que permita aplicar los modelos desarrollados con espectros en el equipo Master, sobre espectros recogidos en los equipos Satélite. En ninguno de los casos se obtienen valores de GH menores que 3 al aplicar los modelos de predicción directamente sobre la información espectral recogida en los instrumentos Satélite.

Los resultados expuestos, justifican la necesidad de estandarización o clonación entre equipos con el fin de posibilitar la transferencia de la biblioteca espectral del equipo Master.

Tabla 4.11. Predicción del colectivo muestral del Set 2 recogido por el equipo Master, equipo Satélite 1 y equipo Satélite 2

RANGO	SET 2	ECUACIÓN	Tto. Mat.	N	GH	NH
400-1098, 1100-1710 nm	Equipo Master	1	1,5,5,1	51	2,542	1,689
		2	2,6,4,1	51	3,013	2,173
	Equipo Corona	1	1,5,5,1	51	132,34	117,34
		2	2,6,4,1	51	71,02	62,41
1100-1710 nm	Equipo Master	3	1,5,5,1	51	1,519	0,789
		4	2,6,4,1	51	1,611	1,045
	Equipo Corona	3	1,5,5,1	51	367,233	333,589
		4	2,6,4,1	51	199,09	181,092
1596-2396 nm	Equipo Master	5	1,5,5,1	51	1,61	0,78
		6	2,6,4,1	51	2,06	1,12
	Equipo Phazir	5	1,5,5,1	51	197,06	177,58
		6	2,6,4,1	51	150,23	132,73
1596-2090 nm	Equipo Master	7	1,5,5,1	51	2,06	0,85
		8	2,6,4,1	51	2,20	1,04
	Equipo Phazir	7	1,5,5,1	51	45,20	34,32
		8	2,6,4,1	51	45,82	36,77

Tto Mat.: Tratamiento Matemático; **N:** número de muestras; **GH:** Distancia de Mahalanobis Global; **NH:** Distancia vecinal

Tabla 4.12 Predicción del colectivo muestral del Set 4 recogido por el equipo Master equipo Satélite 1 y equipo Satélite 2

RANGO	SET 4	ECUACIÓN	Tto. Mat.	N	GH	NH
400-1098, 1100-1710 nm	Equipo Master	1	1,5,5,1	20	3,20	1,92
		2	2,6,4,1	20	3,11	2,14
	Equipo Corona en posición "up-view"	1	1,5,5,1	20	130,65	116,11
		2	2,6,4,1	20	68,62	60,17
	Equipo Corona en posición "down-view"	1	1,5,5,1	20	130,09	115,40
		2	2,6,4,1	20	68,85	61,06
1100-1710 nm	Equipo Master	3	1,5,5,1	20	1,62	0,84
		4	2,6,4,1	20	2,18	1,42
	Equipo Corona en posición "up-view"	3	1,5,5,1	20	393,43	358,89
		4	2,6,4,1	20	207,98	189,77
	Equipo Corona en posición "down-view"	3	1,5,5,1	20	350,06	317,21
		4	2,6,4,1	20	211,92	192,16
1596-2396 nm	Equipo Master	5	1,5,5,1	20	2,09	1,05
		6	2,6,4,1	20	1,68	0,86
	Equipo Phazir	5	1,5,5,1	20	231,82	210,34
		6	2,6,4,1	20	160,33	140,14
1596-2090 nm	Equipo Master	7	1,5,5,1	20	2,35	1,00
		8	2,6,4,1	20	2,03	0,95
	Equipo Phazir	7	1,5,5,1	20	68,35	55,88
		8	2,6,4,1	20	59,40	48,93

Tto Mat.: Tratamiento Matemático; N: número de muestras; GH: Distancia de Mahalanobis Global; NH: Distancia vecinal

4.3 CLONACIÓN / ESTANDARIZACIÓN DE INSTRUMENTOS Y TRANSFERENCIA DE CALIBRACIONES

La posibilidad de llevar a cabo procedimientos de estandarización y/o clonación de instrumentos NIRS que permitan realizar la transferencia de las ecuaciones de calibración NIRS desarrolladas a nivel de laboratorio, nos permite mostrar definitivamente el potencial real de aplicación de la tecnología NIRS a nivel de las explotaciones ganaderas y de la industria en general.

En este apartado se abordará el estudio de los procesos de estandarización entre los equipos utilizados y posterior transferencia de ecuaciones entre instrumentos NIRS.

4.3.1 SELECCIÓN DE LOS COLECTIVOS DE ESTANDARIZACIÓN

Para llevar a cabo la transferencia de la biblioteca espectral y por consiguiente, de los modelos quimiométricos desarrollados, es necesario tomar como punto de partida

el conjunto de muestras de estandarización, a partir de las cuales se desarrollan las diferentes matrices de estandarización planteadas. Siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.5., se han evaluado diferentes estrategias para el desarrollo de las correspondientes matrices de estandarización.

En una primera etapa se seleccionaron las muestras a intervenir en el desarrollo de las matrices de estandarización, en base a los valores crecientes del parámetro $RMS(C)$ (ver apartado 3.5). Los resultados obtenidos para el citado estadístico se presentan en las Tablas 4.13 - 4.16, clasificadas en función de los distintos rangos espectrales estudiados. Dichas tablas muestran los valores medios de $RMS(C)$ entre los espectros de 2 submuestras de los diferentes colectivos de estandarización empleados, obtenida una de ellas en el equipo Master y la segunda en cada uno de los respectivos equipos Satélite, para los diferentes colectivos de estandarización planteados.

En todos los casos se observan valores de $RMS(C)$ similares independientemente del modo de homogeneización, por lo que es posible unificar los Sets 2 y 3 e incluir muestras de ambas poblaciones para desarrollar las matrices de estandarización. Por otra parte, tampoco se aprecian diferencias cuando la toma de espectros en el equipo Corona se realiza con el equipo en posición normal (“*up-view*”) o en posición invertida (“*down-view*”), demostrando la similitud de la información espectral independientemente del modo de recogida de la información espectral. En base a los resultados obtenidos para el estadístico $RMS(C)$, los colectivos muestrales del Set 2 y del Set 3, se combinan en los colectivos de estandarización B1 y B2 que son utilizados en el proceso de estandarización B.

Tabla 4.13. Evaluación de los métodos de homogeinización y posición del equipo mediante el estadístico $RMS(C)$ para el Rango 400-1098,1100-1710 nm

	Método de homogeinización	SEGMENTO	$RMS(C)$
Master vs. Corona (Rango 400-1098,1100-1710 nm)	A	1	127776
		2	45134
Master vs. Corona “up-view” (Rango 400-1098,1100-1710 nm)	B	1	144401
		2	45134
Master vs. Corona “down-view” (Rango 400-1098,1100-1710 nm)	B	1	163217
		2	38773

Tabla 4.14. Evaluación de los métodos de homogeneización y posición del equipo mediante el estadístico RMS(C) para el Rango 1100-1710 nm

	Método de homogeneización	SEGMENTO	RMS(C)
Master vs. Corona (Rango 1100-1710 nm)	A	1	48814
Master vs. Corona “up-view” (Rango 1100-1710 nm)	B	1	44764
Master vs. Corona “down-view” (Rango 1100-1710 nm)	B	1	38763

Tabla 4.15. Evaluación de los métodos de homogeneización y posición del equipo mediante el estadístico RMS(C) para el Rango 1596-2396 nm

	Método de homogeneización	SEGMENTO	RMS(C)
Master vs. Phazir (Rango 1596-2396 nm)	A	1	69759
Master vs. Phazir (Rango 1596-2396 nm)	B	1	71153

Tabla 4.16. Evaluación de los métodos de homogeneización y posición del equipo mediante el estadístico RMS(C) para el Rango 1596-2090 nm

	Método de homogeneización	SEGMENTO	RMS(C)
Master vs. Phazir (Rango 1596-2090 nm)	A	1	76715
Master vs. Phazir (Rango 1596-2090 nm)	B	1	78506

4.3.2 ESTANDARIZACIÓN / CLONACIÓN

Se ha llevado a cabo una estandarización directa mediante el algoritmo incorporado en el software WinISI ver. 1.05 y desarrollado por Shenk y Westerhaus (1989). Siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.5., se construyeron 8 algoritmos de estandarización, constituidos por 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 y 60 muestras, a partir de diferentes colectivos de estandarización, los cuales se presentan en la Tabla 4.17.

Tabla 4.17. Procesos de estandarización y algoritmos desarrollados.

Estandarización	Colectivo de Estandarización	Ficheros de Estandarización	Colectivo de Validación
A	Set 3 (N=1)	STD _{1st}	Set 2 y Set 4
	Set 3 (N=2)	STD _{2st}	Set 2 y Set 4
	Set 3 (N=3)	STD _{3st}	Set 2 y Set 4
	Set 3 (N=4)	STD _{4st}	Set 2 y Set 4
	Set 3 (N=5)	STD _{5st}	Set 2 y Set 4
	Set 3 (N=10)	STD _{10st}	Set 2 y Set 4
B	Set 3 + 10 muestras del Set 2 (N=20)	STD _{20st}	Set 4
	Set 3 + 50 muestras del Set 2 (N=60)	STD _{60st}	Set 4

La elección de las muestras integrantes de cada uno de los archivos utilizados para desarrollar las correspondientes matrices de estandarización, se realizó en base al menor valor de $RMS(C)$.

4.3.3 PREDICCIÓN DE LOS COLECTIVOS DE VALIDACIÓN TRAS LA ESTANDARIZACIÓN

Una vez desarrolladas la matrices de estandarización descritas en la Tabla 4.17, el siguiente paso fue aplicar cada una de las matrices a su correspondiente set de validación, y en una primera aproximación evaluar, en base a la GH, la mejora en la capacidad de predicción satisfactoria de los modelos desarrollados.

En la Estandarización A, se crearon 6 matrices de estandarización constituidas por 1, 2, 3, 4, 5 y 10 muestras, respectivamente, y los resultados obtenidos se recogen en las Tablas 4.18 - 4.20. De todas las matrices aplicadas, aquella constituida por 10 muestras es la que permite obtener mejores resultados, teniendo en cuenta el porcentaje de muestras predichas ($H < 3$) y el valor promedio de la distancia de Mahalanobis. Aún así, en este segundo planteamiento de estandarización se decide no incluir el rango 400-1098, 1100-1710 nm (Rango Corona Completo) en vista del bajo porcentaje de muestras predichas, con valores de $GH < 3$. Este hecho parece deberse a la presencia del rango visible dentro del espectro electromagnético considerado.

Tabla 4.18. Predicción de los colectivos de validación Set 2 y Set 4 recogidos en el rango 400-1098, 1100-1710 nm, tras el proceso de estandarización A.

ESTANDARIZACIÓN A (Rango 400-1098, 1100-1710 nm)					
• SET 2 (N=51)					
ST	Muestras GH<3 (%)	Muestras 3<GH<4 (%)	Muestras GH>4 (%)	GH promedio	NH promedio
1st	2	12	86	7,04	4,96
2st	0	0	100	1954,67	1910,19
3st	2	0	98	184,29	171,63
4st	0	12	88	298,12	286,73
5st	19	16	65	21,42	18,07
10st	39	31	30	4,75	3,23
• SET 4 EN POSICIÓN "UP-VIEW" (N=20)					
ST	Muestras GH<3 (%)	Muestras 3<GH<4 (%)	Muestras GH>4 (%)	GH promedio	NH promedio
1st	5	15	80	7,11	4,98
2st	0	0	100	2797,10	2744,32
3st	0	0	100	183,17	168,81
4st	0	0	100	377,76	362,68
5st	0	5	95	24,43	20,54
10st	5	45	50	4,82	3,15
• SET 4 EN POSICIÓN "DOWN-VIEW" (N=20)					
ST	Muestras GH<3 (%)	Muestras 3<GH<4 (%)	Muestras GH>4 (%)	GH promedio	NH promedio
1st	0	5	95	9,31	6,75
2st	0	0	100	4609,84	4540,65
3st	0	0	100	1520,18	1467,45
4st	0	0	100	2485,81	2442,85
5st	0	0	100	150,37	137,56
10st	0	5	95	13,78	10,52

Tabla 4.19. Predicción de los colectivos de validación Set 2 y Set 4 recogidos en el rango 1100-1710 nm, tras el proceso de estandarización A.

ESTANDARIZACIÓN A (Rango 1100-1710 nm)					
• SET 2 (N=51)					
ST	Muestras GH<3 (%)	Muestras 3<GH<4 (%)	Muestras GH>4 (%)	GH promedio	NH promedio
1st	2	12	86	17,37	13,65
2st	0	0	100	165,16	152,88
3st	2	0	98	24,47	19,60
4st	0	12	88	27,20	22,52
5st	19	6	75	38,61	33,80
10st	25	22	53	30,44	26,25
• SET 4 EN POSICIÓN "UP-VIEW" (N=20)					
ST	Muestras GH<3 (%)	Muestras 3<GH<4 (%)	Muestras GH>4 (%)	GH promedio	NH promedio
1st	0	20	80	15,30	11,59
2st	0	10	90	32,25	26,22
3st	25	5	70	12,69	9,41
4st	35	20	45	8,56	6,14
5st	30	30	40	7,27	5,12
10st	55	10	35	8,29	6,20
• SET 4 EN POSICIÓN "DOWN-VIEW" (N=20)					
ST	Muestras GH<3 (%)	Muestras 3<GH<4 (%)	Muestras GH>4 (%)	GH promedio	NH promedio
1st	0	5	95	23,11	17,86
2st	0	0	100	75,48	62,21
3st	0	5	95	17,63	13,59
4st	0	5	95	19,84	15,42
5st	0	0	100	26,19	21,00
10st	0	0	100	28,48	22,44

Tabla 4.20. Predicción de los colectivos de validación del Set 2 y del Set 4 recogidos en el rango 1596-2396 nm, tras el proceso de estandarización A.

ESTANDARIZACIÓN A (Rango 1596-2396 nm)					
• SET 2 (N=51)					
ST	Muestras GH<3 (%)	Muestras 3<GH<4 (%)	Muestras GH>4 (%)	GH promedio	NH promedio
1st	0	0	100	32,41	23,25
2st	0	0	100	46775,68	46353,65
3st	8	6	86	24,35	19,19
4st	2	4	94	40,24	32,89
5st	14	4	82	26,24	20,66
10st	22	2	76	28,47	22,38
• SET 4 (N=20)					
ST	Muestras GH<3 (%)	Muestras 3<GH<4 (%)	Muestras GH>4 (%)	GH promedio	NH promedio
1st	15	5	80	7,69	4,86
2st	0	0	100	36363,31	35938,50
3st	5	5	90	20,05	15,06
4st	10	5	85	26,67	20,25
5st	15	0	85	30,72	23,10
10st	10	5	85	30,72	23,10

Atendiendo a los resultados podemos afirmar que 10 muestras no son suficientes para llevar a cabo una matriz de estandarización entre equipos instrumentalmente tan diferentes como el Master y los dos Satélites, por ello se incrementó el número de muestras y se desarrollaron nuevas matrices con 20 y 60 muestras respectivamente. Para ello, unificando los Sets 2 y 3, se construyen dos nuevas matrices de estandarización (20_{st} y 60_{st}) que son aplicadas exclusivamente sobre el Set 4, colectivo de validación externa B.

Los resultados de predicción obtenidos al aplicar las matrices desarrolladas sobre el colectivo de validación (Set 4), analizadas en base a la distribución de la población o porcentaje de muestras predichas satisfactoriamente se recogen en las Tablas 4.21., 4.22. y 4.23.

Tabla 4.21. Predicción del colectivo de validación del Set 4 en el rango 1100-1710 nm, tras el proceso de estandarización B.

ESTANDARIZACIÓN B (Rango 1100-1710 nm)					
• SET 4 EN POSICIÓN "UP-VIEW" (N=20)					
ST	Muestras GH<3 (%)	Muestras 3<GH<4 (%)	Muestras GH>4 (%)	GH promedio	NH promedio
20st	85	0	15	1,96	1,17
60st	35	15	50	6,73	4,29
• SET 4 EN POSICIÓN "DOWN-VIEW" (N=20)					
ST	Muestras GH<3 (%)	Muestras 3<GH<4 (%)	Muestras GH>4 (%)	GH promedio	NH promedio
20st	65	15	20	2,93	1,45
60st	15	5	80	9,46	6,25

Tabla 4.22. Predicción del colectivo de validación del Set 4 en el rango 1596-2396 nm, tras el proceso de estandarización B.

ESTANDARIZACIÓN B (Rango 1596-2396 nm)					
Set 4 (N=20)					
ST	Muestras GH<3 (%)	Muestras 3<GH<4 (%)	Muestras GH>4 (%)	GH promedio	NH promedio
20st	45	15	40	4,77	2,99
60st	45	20	35	4,43	2,42

Tabla 4.23. Predicción del colectivo de validación del Set 4 en el rango 1596-2090 nm, tras el proceso de estandarización B.

ESTANDARIZACIÓN B (Rango 1596-2090 nm)					
Set 4 (N=20)					
Set 4 en posición "up-view"					
ST	Muestras GH<3 (%)	Muestras 3<GH<4 (%)	Muestras GH>4 (%)	GH promedio	NH promedio
20st	25	15	60	6,99	3,90
60st	100	0	0	1,46	0,55

En los resultados obtenidos puede apreciarse un comportamiento distinto en los dos equipos Satélite estandarizados:

1. Corona 45 VisNIR 1.7.: presenta resultados satisfactorios cuando el colectivo de validación es estandarizado con un algoritmo de estandarización constituido por 20 muestras. Observándose un aumento significativo del porcentaje de muestras predichas, con distancia H de Mahalanobis por debajo del límite máximo establecido. Los resultados son favorables, cuando los espectros son tomados en la posición normal de laboratorio o "up-view", así como cuando son recogidos en la misma situación que a nivel industrial o "down-view", lo que confirma su potencial

aplicabilidad a nivel industrial, así como la posibilidad de predecir parámetros nutritivos de ensilados de maíz *in-situ*, a nivel de las explotaciones ganaderas .

- Phazir 1624 Handheld NIR: los resultados difieren cuando se estudia el rango espectral completo de este equipo Satélite: 1596-2396 nm, frente al rango trimado: 1596-2090 nm. En ambos casos, se corrobora la necesidad de un colectivo muestral de estandarización mayor que en el caso del equipo Corona, presentando resultados óptimos cuando se aplica un algoritmo de estandarización constituido por 60 muestras. Sin embargo, cuando éste es aplicado sobre el rango completo del equipo la distancia H de Mahalanobis está en torno a 4, por encima del límite de 3, establecido como valor máximo. El mejor resultado para este equipo se obtiene en el rango trimado, donde con un colectivo de estandarización constituido por 60 muestras se alcanza un porcentaje del 100 % de muestras predichas ($GH < 3$). Este hecho puede estar relacionado con el ruido observado en los extremos del rango de recogida de longitud de onda espectral de este equipamiento.

En la Tabla 4.24., se muestran comparadamente los resultados obtenidos antes y después de la estandarización de ambos equipos.

Tabla 4.24. Predicción del colectivo de validación del Set 4 antes y después de la estandarización B.

RANGO	VALIDACIÓN	ECUACIÓN	Tto. Mat.	GH	NH
1100-1710 nm	Equipo Corona en posición “ <i>up-view</i> ” Previa STD	3	1,5,5,1	393,43	358,89
	Equipo Corona en posición “ <i>up-view</i> ” Tras STD (20 _{ST})	3	1,5,5,1	1,96	1,17
	Equipo Corona en posición “ <i>down-view</i> ” Previa STD	3	1,5,5,1	350,06	317,21
	Equipo Corona en posición “ <i>down-view</i> ” Tras STD (20 _{ST})	3	1,5,5,1	2,93	1,45
1596-2396 nm	Equipo Phazir Previa STD	5	1,5,5,1	231,82	210,34
	Equipo Phazir Tras STD (60 _{ST})	5	1,5,5,1	4,43	2,42
1596-2090 nm	Equipo Phazir Previa STD	7	1,5,5,1	68,35	55,88
	Equipo Phazir Tras STD (60 _{ST})	7	1,5,5,1	1,46	0,55

A continuación, se detalla en las Tablas 4.25 y 4.26 los resultados de validación externa obtenidos para las muestras incluidas en el Set 4. En lo referente al equipo satélite Corona, los resultados son no satisfactorios para MS y CZF, mientras que para el Phazir, la MS posee una buena correlación, sin embargo las fibras y la proteína no mostraron correlaciones aceptables para su uso en rutina.

Tabla 4.25. Estadísticos de validación externa obtenidos al predecir el Set 4 (N=20) con el modelo de calibración 1,5,5,1. Equipo: Corona VisNIR (Rango 1100-1710 nm)

Corona en posición "up-view"		
Parámetro	SEP (C)	RSQ
MS real	4,932	0,109
CZF	0,251	0,007
PBF	0,248	0,529
FNDF	0,890	0,702
FADLCF	0,830	0,610
ALMF	4,081	0,462
FBF	0,569	0,777
Corona en posición "down view"		
Parámetro	SEP (C)	RSQ
MS real	4,930	0,098
CZF	0,265	0,139
PBF	0,275	0,450
FNDF	0,867	0,742
FADLCF	0,846	0,503
ALMF	3,965	0,338
FBF	0,554	0,800

SEP(C): Error estándar de predicción corregido por el sesgo; RSQ: Medida de bondad de ajuste del modelo de regresión utilizado.

Tabla 4.26. Estadísticos de validación externa obtenidos al predecir el Set 4 (N=20) con el modelo de calibración 1,5,5,1. Equipo: Phazir 1624 Handheld (Rango 1596-2090 nm)

Parámetro	SEP (C)	RSQ
MS real	2,890	0,774
CZF	0,224	0,169
PBF	0,333	0,104
FNDF	1,787	0,133
FADLCF	0,645	0,530
ALMF	2,410	0,673
FBF	0,495	0,475

SEP(C): Error estándar de predicción corregido por el sesgo; RSQ: Medida de bondad de ajuste del modelo de regresión utilizado.

En las Figuras 4.1 y 4.2., se presenta de manera gráfica el efecto de la estandarización sobre la información espectral recogida con los equipos satélite.

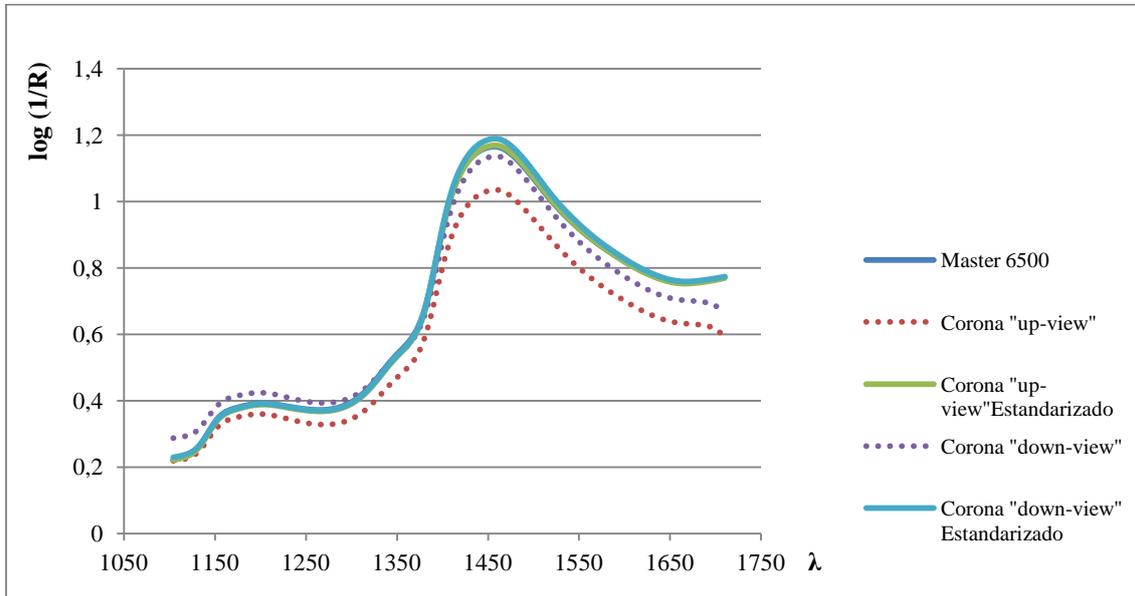


Figura 4.1. Representación gráfica de los espectros tomados por el equipo Master y el equipo Corona antes y después de estandarizar (Rango 1100-1710 nm).

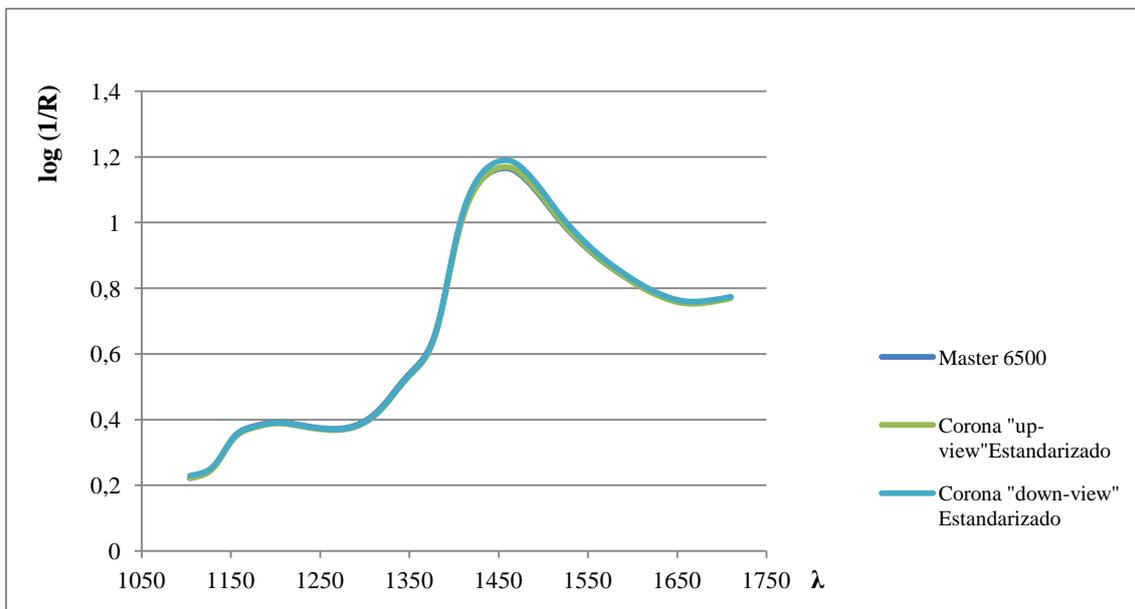


Figura 4.2. Representación gráfica de los espectros tomados por el equipo Master y por el equipo Corona tras ser estandarizado (Rango 1100-1710 nm).

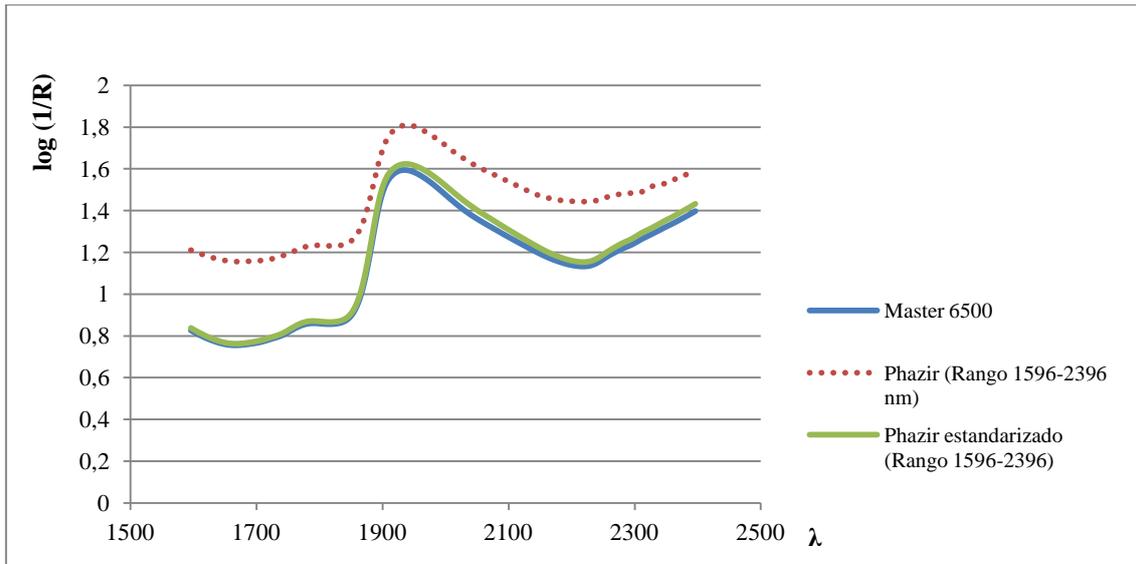


Figura 4.3. Representación gráfica de los espectros tomados por el equipo Master y por el equipo Phazir antes y después de ser estandarizado (Rango 1596-2396 nm).

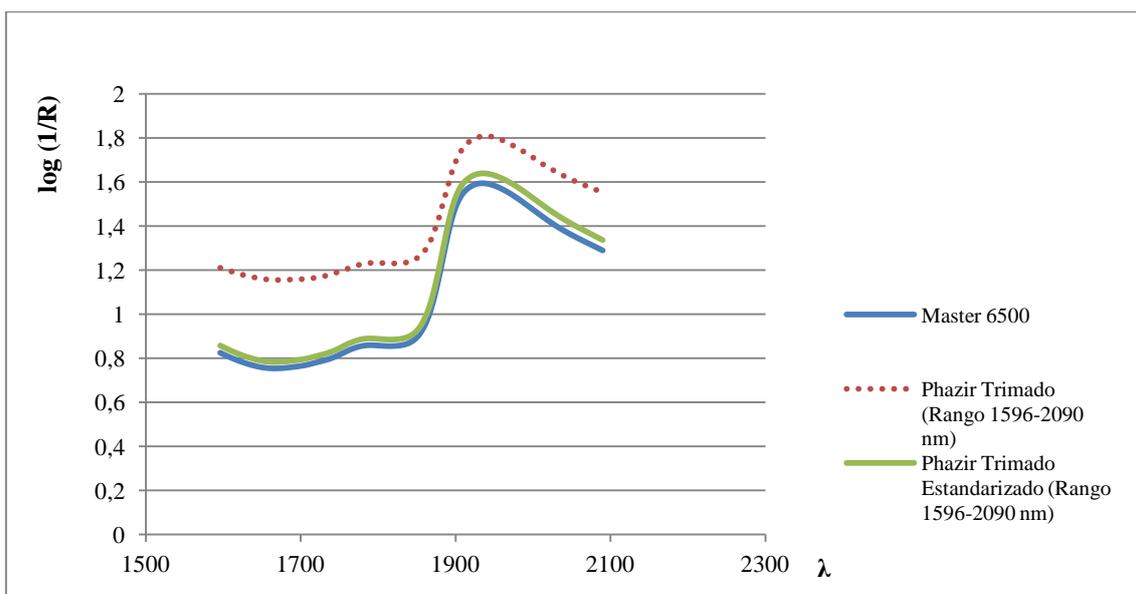


Figura 4.4. Representación gráfica de los espectros tomados por el equipo Master y por el equipo Phazir antes y después de ser estandarizado (Rango 1596-2090 nm)

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que es posible transferir ecuaciones NIRS para predecir parámetros nutritivos de ensilados de maíz en fresco, de un instrumento Master (*at-line*) (Foss-NIRSystems 6500) a los dos instrumentos Satélite (*on-site*) considerados (Corona 45 VisNIR 1.7 y Phazir 1624 Handheld NIR). El proceso llevado a cabo posibilita la aplicación *in-situ* de ambos instrumentos, con las

numerosas ventajas que ello supone, tanto desde el punto de vista económico como en cuanto a la rápida obtención de resultados que favorece la adecuada estimación de las raciones, para su directa aplicabilidad.

5 ESTUDIO ECONÓMICO

En este punto se estudiará el presupuesto necesario para llevar a cabo la implantación de la tecnología NIR a nivel de la industria en general, o de una explotación ganadera en particular.

El presente estudio económico se ha elaborado en base a los precios públicos del Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA) para el ejercicio 2012, aprobados en Consejo de Gobierno y publicados en el Boletín Oficial del Principado de Asturias (BOPA núm. 29 de 6-ii-2012).

A continuación, se presentan los equipos y accesorios utilizados en el presente estudio, el coste por unidad y el precio total, expresado en euros (€).

5.1 EQUIPAMIENTO CIENTÍFICO TÉCNICO NECESARIO

5.1.1 CORONA 45 VISNIR 1.7

Este equipamiento permite la monitorización de los procesos de control de calidad y trazabilidad de ingredientes y mezcla final, gracias a su tecnología por red de diodos, con alta precisión óptica, para trabajar en el rango espectral de 400-1710 nm. La supresión de movilidad en sus componentes mecánicos, hace que sea factible la instalación de este equipamiento en condiciones tan adversas como puede ser en un carro mezclador a nivel de explotación.

Se necesita la adquisición de un equipo Diode Array portátil, para su instalación en carro mezclador para el control “*on-line*” de ensilados de maíz, como sensor compacto de uso universal.

- Corona 45 Vis-NIR 1.7.....	12.000 €
- Accesorios Corona 45 vis-NIR.....	12.000 €
- Software Corona 45 NIR	11.130 €
TOTAL 1er año	35.130 €
TOTAL 1er año + 21% IVA	42.507 €

5.1.2 PHAZIR 1624 HANDHELD NIR

Se trata de un equipamiento NIRS portátil, de nueva generación y ligero, que permite la recogida de información espectral de ingredientes y forrajes “*on-line*” y “*on-site*” para el posterior desarrollo de modelos quimiométricos que permitan cualificar y cuantificar atributos relevantes que impulsen la innovación y calidad en las producciones primarias.

- Equipo NIR PHAZIR31.320 €
- Accesorios Phazir (lámparas, capuchón de aislamiento.....2.000 €

TOTAL 1er año 33.320 €

TOTAL 1er año + 21% IVA 40.317 €

5.2 DESARROLLO DEL MODELO DE CALIBRACIÓN

El desarrollo de un modelo de calibración específico para muestras de interés supone un coste de unos 5000 euros (sin IVA). Teniendo en cuenta que, para el desarrollo del presente estudio dicho modelo para la predicción de parámetros nutritivos existía con anterioridad, este coste no se tiene en cuenta en el presente trabajo. Esta misma situación se implantaría en el caso de que una explotación decidiera instaurar dicha tecnología para el análisis de ensilados.

5.3 ANÁLISIS NIRS VS ANÁLISIS QUÍMICO

En el trabajo desarrollado se han empleado un total de 322 muestras de ensilado de maíz, divididas en cuatro colectivos muestrales. El Set 1 constituido por 241 muestras destinadas a la calibración del modelo de predicción; los Sets 2 y 3, constituidos por un total de 61 muestras, de las cuales 60 muestras han sido empleadas para la estandarización de los equipos *on-site* estudiados, 20 muestras para la estandarización del equipo Corona 45 VisNIR 1.7. y 60 muestras para la estandarización del instrumento Phazir 1624 Handheld NIR; y finalmente, el Set 4 incluye 20 muestras para la validación externa. Cada una de las muestras utilizadas fueron analizadas posteriormente por vía húmeda.

Las 241 muestras empleadas en la calibración no se incluyen en el estudio económico, como ya se ha comentado en el apartado 5.2., puesto que éstas han sido utilizadas para el desarrollo del modelo de predicción de parámetros nutritivos de

ensilados de maíz, previamente existente. Lo que se pretende es evaluar en este apartado, es el coste del análisis NIR una vez desarrollado el modelo, en comparación con el coste que supone el análisis químico. Por tanto, en este sentido, 80 son las muestras analizadas mediante NIRS y mediante vía húmeda.

Las tarifas consideradas incluyen: amortización de equipos, gasto corriente, gastos de personal y fungible.

ANÁLISIS	Nº DE MUESTRAS	COSTE POR MUESTRA (€/u)	COSTE TOTAL (€)	COSTE TOTAL (€) (con IVA)
Recogida de espectros NIR	81	13,28	1075,68	1301,57
Análisis Vía Húmeda	81	72,27	5853,87	7083,18
			6929,55	8384,75

El coste total de este proyecto asciende a ocho mil trescientos ochenta y cuatro euros y setenta y cinco céntimos.

6 CONCLUSIONES

1. La capacidad predictiva que presentan las calibraciones desarrolladas para la determinación del valor nutritivo de ensilado de maíz en su forma intacta es similar para todos los tratamientos matemáticos ensayados, tanto de primera como de segunda derivada.
2. La precisión y exactitud de las calibraciones NIRS desarrolladas puede considerarse excelente en términos de RSQ, 1-VR y RER para todos los parámetros, con la excepción de las cenizas, que deben considerarse limitadas aunque de utilidad práctica.
3. La reducción del rango espectral limita el éxito de las calibraciones, se observa una disminución de los estadísticos de calibración, RSQ, 1-VR y RER, y este efecto afecta en mayor medida a las cenizas y a las fibras.
4. No es posible transferir de manera directa la biblioteca espectral del equipo Master (Foss-NIRSystems 6500) a los equipos Satélite (Corona 45 VisNIR 1.7 y Phazir 1624 Handheld NIR), para evaluar parámetros nutritivos de ensilados de maíz debido a las diferencias instrumentales (óptica, configuración, etc.) existentes entre los equipos.
5. El algoritmo de estandarización descrito por Shenk y Westerhaus ha hecho posible realizar la transferencia entre instrumentaciones NIRS con grandes diferencias ópticas, electrónicas y de presentación de la muestra.
6. La estandarización de los equipos Satélite (Corona 45 VisNIR 1.7 y Phazir 1624 Handheld NIR) con el equipo Master (Foss NIRSystem 6500) exige desarrollar protocolos de estandarización específicos para cada equipamiento, tanto en lo referente al número de muestras necesarias para una transferencia satisfactoria, como a las características de las mismas.
7. En la transferencia al equipo Corona 45 VisNIR 1.7, la matriz de estandarización construida con 20 muestras (20_{st}), y en el rango 1.100-1.710 nm permite llevar a cabo la predicción del 85 % de las muestras.

8. En la transferencia al equipo Phazir 1624 Handheld NIR la matriz de estandarización construida con 60 muestras (60_{st}), y en el rango 1596 – 2090 nm permite llevar a cabo la predicción del 100 % de las muestras.
9. La metodología desarrollada ha sido validada externamente y ha mostrado su potencial aplicabilidad para obtener resultados analíticos en tiempo real y a pie de campo. Concluyendo la viabilidad del método estudiado para la predicción in-situ de parámetros nutritivos de ensilados de maíz de forma intacta.

7 SÍMBOLOS

A: Absorbancia

AGV's: Ácidos Grasos Volátiles

ALM: Almidón

BAL: Bacterias Ácido Lácticas

CPs: Componentes Principales

CZ: cenizas

CZF: cenizas frescas

DA: Diodo-arrays

DEMO: Digestibilidad de la Materia Orgánica

DS: *Direct Standardisation* o Estandarización Directa

DT: *Detrending*

EE: Extracto Etéreo o Grasa Bruta

ETC: Error típico o estándar de calibración

ETP(C): Error Típico de Calibración corregido por el sesgo

ETVC: Error típico o estándar de la validación cruzada

FAD: Fibra Ácido Detergente

FB: fibra bruta

FBF: Fibra Bruta Fresca

FIR: *Far Infrared Spectroscopy*

FND: Fibra Neutro Detergente

GH: Distancia de Mahalanobis Global

InAs: Arseniuro de Indio

InGaAs: Arseniuro de indio y galio.

InSb: Antimoniuro de Indio

IR: Infrarrojo

LEDs: *Light Emiting Diodes* o Diodos Emisores de Luz

LV: *Latent Variables*

MCS: *Multiplicative Signal Correction*

MEMS: Sistemas micro electromecánicos

MIR: *Middle Infrared Spectroscopy*

MLR: *Multiple Linear Regression* o Regresión Lineal Múltiple

MPLS: Modificación de la regresión por mínimos cuadrados parciales

MS: Materia Seca

NH: Distancia Vecinal

NH₃: Nitrógeno Amoniacal

NIR: *Near Infrared Spectroscopy*

NIRS: Espectroscopía de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano

OSC: *Orthogonal Signal Correction*

PB: Proteína Bruta

PBF: Proteína bruta fresca

PbS: Sulfuro de Plomo

PCA: Análisis de componentes principales

PCR: *Principal Component Regression* o Regresión por componentes principales

PDS: Estandarización Directa Paso a Paso

PLS: *Partial Least Squares* o Mínimos Cuadrados Parciales

R: Reflectancia

R²: Coeficiente de determinación de la calibración

r²: Coeficiente de determinación de la validación cruzada

RSQ: Medida de bondad de ajuste del modelo de regresión

SEC: Error Estándar de Calibración

SECV: Error de residuales de la validación cruzada o Error estándar de la validación cruzada

SEL: Error Estándar de laboratorio

SEP: Error Estándar de Predicción

SNV: *Standard Normal Variate*

SNVD: *Standard Normal Variate and Detrend*

TOP: Transferencia por Proyección Ortogonal

8 BIBLIOGRAFÍA

ARGAMENTERÍA A., DE LA ROZA B., MARTÍNEZ FERNÁNDEZ A., SÁNCHEZ L. Y MARTÍNEZ A. (1997). El ensilado en Asturias. Servicio de Publicaciones del Principado de Asturias. Consejería de Agricultura. 127.

ARGAMENTERÍA, A., DE LA ROZA, B., MARTÍNEZ, A. Y ALFAGEME, L.A., (1995). Ensilado de hierba. Programación y técnica de ensilaje para obtener un forraje nutritivo y estable. Ensilado en rotopacas. En: Tecnología Agroalimentaria. Edición Especial. Consejería de Medio Rural y Pesca. 40-44.

ARGAMENTERÍA, G.A. (2012). Variedades de maíz. SERIDA, 33.

ASTM, (1994). *Standard practices for infrared, multivariate, quantitative analysis*. ASTM Annual book of standards. Standard E1655-94. ASTM, West Conshohocken, PA, USA.

BARBER, G.D., GIVENS, D.I., KRIDIS, M.S., OFFER, N.W. Y MURRAY, I. (1990). *Prediction of the organic matter digestibility of grass silage*. *Animal Feed Science and Technology* 28, 115-128.

BARNES, R.F. Y BAYLOR, J.E. (1995). *Forages*, Vol. 1. *An Introduction to Grassland Agriculture*. R.F. Barnes, D.A. Miller, C.J. Nelson (Eds.), pp 3-13. Iowa State University Press, Ames, Iowa.

BARNES, R.J., DHANOA M.S. Y LISTER, S.J. (1989). *Standard normal variate transformation and de-trending of near-infrared diffuse reflectance spectra*. *Appl. Spectrosc.* 43 pp. 772-777.

BARNES, R.J., DHANOA, M.S. Y LISTER, S.J. (1994). *Correction to the description of Standard Normal Variate (SNV) and De-Tren (DT) transformations in practical spectroscopy with applications in food and beverage analysis*. *NIR News*, 5, 3:6.

BEEBE, K.R., PELL, R.J. Y SEASHOLTZ, M.B. (1998). *Chemometrics. A practical guide*, John Wiley & sons, New York.

BEN-GERA, I. Y NORRIS K.H. (1968). *Direct spectrophotometric determination of fat and moisture in meta products*. *Journal of Food Sciences* 7, p. 240.

- BERTRAND, D. (1993). *Data pre-treatment and original analysis in spectroscopy. Advanced Comet Chemometrics School*. Libramont Belgium, April 26-28, 1993.
- BERTRAND, D. Y DUFOUR, E. (2000). *La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques*. Editions TEC & DOC, Paris, France.
- BRIMMER, P.J., DETHOMAS, F.A. Y HALL, J.W. (2001). *Near infrared technology in the agricultural and food industries*. Ed. American association of cereal chemist.
- BURNS, D.A. Y CIURCZAK, E.W. (1992). *Handbook of near infrared analysis*. Burns, D. A. and Ciurczak, E.W. (eds.) Marcel Dekker, New York, NY, USA.
- CALSAMIGLIA, S.A. (2004). Tablas FEDNA de valor nutritivo de Forrajes y Subproductos fibrosos húmedos. Fundación para el desarrollo de la nutrición animal, 70.
- CAÑEQUE, V. Y SANCHA, J. L., (1998). Ensilado de forrajes y su empleo en la alimentación de rumiantes. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. 260 pp.
- CEN, H. Y HE, Y. (2007). *Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality*. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 72-83.
- CIURCZAK, E.W. (2001). *Principles of near-infrared spectroscopy. Handbook of near infrared analysis*. Marcel Dekker, 2nd edition, New Cork, p. 7-9.
- COZZOLINO, D., FASSIO, A. Y FERNANDEZ, E. (2003). Uso de la espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano para el analisis de calidad de ensilaje de maiz. *Agricultura Tecnica (Chile)* 63: 387-394.
- DAMI, M., DE VIDDI, R., AROLDI, G., BELLI, F., CHICARELLA, L., PIEGARI, A., SYTAHKOVA, A., BULIR, F., LEMARQUIS, F., LEQUIME, M., ABEL TIBERINE, L., Y HARNISCH, B. (2010). *Ultra compact spectrometer using linear variable filters*. *International Conference on Space Optics*. Greece.
- DARDENNE, P. Y BISTON, R. (1990). *Standardization procedure and NIR instrument network*. En *Proceedings of the 3rd International Conference on Near Infrared*

Spectroscopy. Biston, R. y Bartiaux-Thill, N. (Eds.). Agricultural Research Centre, Gembloux, Belgique, p. 655-662.

DARDENNE, P., BISTON, R. Y SINNAEVE, G. (1992). *Calibration transferability across NIRS instruments*. En *Near infra-red spectroscopy. Bridging the Gap between Data Analysis and NIR Applications*. Hildrum, K.I., Isaksson, T, Naes, T. and Tandberg, A. (eds.). Ellis Horwood, Chichester, UK. p. 1-10.

DAVIES, A.M. Y GRANT, A. (1987). *Review: Near infra-red analysis of food*. *International Journal of Food Science and Technology*, 22, 191-207.

DAVIES, T. (1998). *The history of near infrared soectroscopic analysis: past, present and future from sleeping technique to the morning star of spectroscopy*. *Analysis* 26 4 p. 17-19.

DEAVILLE, E.R. Y FLINN, P.C. (2000). *Forage Evaluation in Ruminant*. pp. 301-320.

DE BLAS, C., GONZÁLEZ, G., Y ARGAMENTERÍA, A. (1987). *Nutrición y alimentación del ganado*. Ediciones Mundiprensa.

DE LA ROZA, B. (2005). *El ensilado en zonas húmedas y sus indicadores de calidad*. IV Jornadas de Alimentación Animal. Laboratorio de Mouriscade. Lalín (Pontevedra), pp. 1-20.

DE LA ROZA, B. Y ARGAMENTERÍA, A. (2009). *Importancia del control de calidad, trazabilidad y seguridad en las raciones completas (unifeed) para ganado vacuno lechero. Aplicación de la tecnología NIRS*. *Tecnología Agroalimentaria* nº6.

DE LA ROZA, B., MARTÍNEZ, A. Y ARGAMENTERÍA, A. (1999). *Elaboración, control y calidad de lo ensilados. Estabilidad aeróbica*. En: *IV Jornadas Vacuno Lechero*. La Esperanza. Tapia S.V. 21 pp.

DE LA ROZA, B., MARTÍNEZ, A., MODROÑO, S. Y ARGAMENTERÍA, A., (2002). *Measurements of metabolic parameters in lactating dairy cows with near infrared reflectance spectroscopy analysis using cattle faecal samples*. *Near Infrared Spectroscopy*. *Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 10th International Conference*. Ed.: A.M.C. Davies and R.K, Cho. NIR Publications, Chichester, UK: 371-375.

DE LA ROZA, B., MARTÍNEZ, A., MODROÑO, S., FLORES, G. Y ARGAMENTERÍA, A., (1999b). *A comparison of NIR spectroscopy with neutral detergent cellulase technique to predict the in vivo digestibility of grass silages*. Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 9th International Conference. Ed: A.M.C. Davies and R. Giangiaco. NIR Publications, Chichester, UK: 661-665.

DE LA ROZA, B., SOLDADO, A., MODROÑO, S. GONZÁLEZ, M.A., ARGAMENTERÍA, A. Y MARTÍNEZ FERNÁNDEZ, A. (2012). *Evolución da calidade dos ensilados de millo elaborados nas explotacións leiteiras da cornixa catábrica nos últimos anos*. En: Afriga nº 100.

DE LA ROZA-DELGADO, B., SOLDADO, A., GOMES DE FARIA, A.F., MARTÍNEZ FERNÁNDEZ, A. Y ARGAMENTERÍA, A. (2013). *Assesing the value of a portable Near Infrared Spectroscopy sensor for predicting pork meat quality traits of "Asturcelta Autochthonous swine breed"* *Food Analytical Methods*. DOI 10.1007/s12161-013-9611.

DESPAGNE, F., WALCZAK, B. Y MASSART, D.L. (1998). *Transfer of calibration of near infrared spectra using neural networks*. *Appl. Spectrosc.*, 52:732-745.

DHANOVA, M.S., LISTER, S.J. Y BARNES, R.J. (1995). *On the Scales Associated with Near-Infrared Reflectance Difference Spectra*. *Appl. Spectrosc.*, 49:765-772.

DHANOVA, M.S., LISTER, S.J., SANDERSON, R. Y BARNES, R.J. (1994). *The link between Multiplicative Scatter Correction (MSC) and Standard Normal Variate (SNV) transformations of NIR spectra*. *J. Near Infrared Spectrosc.*, 2:43-47.

DIRECTIVA 2002/32/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 7 de mayo de 2002 sobre sustancias indeseables en la alimentación animal (DO L 140 de 30.5.2002, p. 10).

FEARN, T. (2001). *Standardisation and calibration transfer for near infrared instruments: A review*, *J. Near Infrared Spectrosc.*, 9, 229-224.

FERNÁNDEZ-AHUMADA, E., GARRIDO VARO, A., GUERRERO-GINEL, J.E., PÉREZ-MARÍN Y FEARN, T. (2008). *Taking NIR calibrations of feed compounds from the laboratory to the process: calibration transfer between predispersive and*

postdispersive instruments. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 56(21), 10135-10141.

FERNÁNDEZ-CABANÁS, V Y GARRIDO-VARO, A. (1999). *The use of “standard normal variate” and “detrending” as signal improvement tools for the interpretation of near infrared spectra of agro-food products.* *Química Analítica*, 18:113-118.

FERRET, A. (2003). Control de calidad de forrajes. FEDNA p.137

GARBISU, C., ALONSO, E., LUENGAS, I., ARISTEGIETA, A. y MURUA, G. (2005). Determinación de parámetros nutricionales por espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRS). Informe técnico final FEEDNIRS.

GARRIDO-VARO, A., GÓMEZ-CABRERA, A., GUERRERO-GINEL, J.E. Y FERNÁNDEZ, V. (1996). NIRS: una tecnología de apoyo para un servicio integral en alimentación animal. En *Avances en Alimentación y Nutrición Animal*. De Blas C., Mateos G. y García-Rebollar P. (Eds.). FEDNA, Madrid, España, pp. 375-300.

GAT, N. (2000). *Imaging spectroscopy using tuneable filters: a review. Proceedings of the International Society for Optical Engineering*, 4056, 50-64.

GELADI, P. (1996). *An overview of multivariate spectral data analysis.* En: *Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves*. Davies, A.M.C. and Williams, P.C. (eds.). NIR Publications, Chichester, UK p. 165-173.

GIVENS, D.I., AXFORD, R.F.E. Y OMED H.M. (2000). *Forage evaluation in ruminant nutrition.* Eds. CAB International, Wallingford, Oxon.

HENRY, C.M. (1999). *Near-IR gets the job done. Analytical Chemistry* 71 17 p. 625A-628A.

HERSCHEL, W. (1800). *Investigation of the powders of the prismatic colours to heat and illuminate objects; with remarks, that prove the different refrangibility of radiant heat. To which is added, and inquiry into the method of viewing the sun advantageously, with telescopes of large apertures and high magnifying powers. Philosophical transactions of the Royal Society* 90 pp. 255-283.

- HORLICK, G. (1972). *Digital data handling of spectra utilizing Fourier transformations*. *Anal. Chem.* 44 p. 943-947.
- I. N. R. A. (*Institut National de la Recherche Agronomique*), (1981). *Prévision de la valeur nutritive des aliments des ruminants*. Ed.: I.NR.A publications. Versailles (France). 590 pp.
- IWAMOTO, M., (1991). *Application of Near Infrared Spectroscopy for quality control in food and feed industries*. En *Proceedings of the 3rd International Conference on Near Infrared Spectroscopy*. Biston, R. and Bartiaux-Thill, N. (eds.). Agricultural Research Centre, Gembloux, Belgium. pp. 175-186.
- JENSEN, E.P. (1993). *Use of NIRS for on-line process control during the manufacture of animal feed stuffs*. *NIR Spectroscopy Developments in Agriculture and Food. International Conference*. ADAS. Drayton Birmingham. U.K.
- KAFFKA, K. Y GIARMATI, L.S. (1995). *Quality determination in the food industry. Leaping ahead with near infrared spectroscopy*. Batten, G.D., Flinn, P.C., Welsh, L.A. and Blakeney, A.B. (eds.). *NIR Spectroscopy Group*, Royal Australian Chemistry Institute, Melbourne, Australia. p. 261-269.
- KAYE, W. (1954). *Near Infrared Spectroscopy: Spectral Identification and analytical applications*. *Spectrochimica. Acta* 6. p. 257.
- MARK, H. (1989). *Chemometrics in near-infrared spectroscopy*. *Anal. Chimica Acta* 223 pp. 75-93.
- MARK, H. Y WORKMAN, Y. (1991). *Statistics in Spectroscopy*. Academic Press Inc., New York, NY, USA.
- MARTENS, H. Y MARTENS, M. (2000). *Multivariate analysis of quality: an introduction*. John Wiley and Sons Inc., Chichester, UK.
- MARTENS, H. Y NAES, T. (1989). *Multivariate calibration*. John Wiley and Sons Inc., Chichester, UK.
- MARTÍNEZ FERNÁNDEZ, A., SOLDADO, A., DE LA ROZA-DELGADO, B., VICENTE, F., GONZÁLEZ-ARROJO, M.A. Y ARGAMENTERÍA, A. (2013).

Modelling a quantitative ensilability index adapted to forages from wet temperate areas. En: *Spanish Journal of Agricultural Research* 11 (2), pp. 455-462.

MARTÍNEZ FERNÁNDEZ, A., SOLDADO, A., GONZÁLEZ, A., MODROÑO, S. Y DE LA ROZA-DELGADO, B. (2010a). Transferencia de ecuaciones NIRS desarrolladas en equipos de laboratorio (*at-line*) a equipos portátiles para el control de calidad en campo de ensilados de hierba. En: Calleja A. et al. (eds) *Pastos: Fuente natural de energía*, pp. 161-167. Zamora, España: Sociedad Española para el Estudio de los Pastos.

MARTÍNEZ, A. Y PEDROL, N. (2006). No sólo de maíz viven las vacas. *Tecnología agroalimentaria*, 2

MARTÍNEZ, A.; DE LA ROZA, B. Y FERNÁNDEZ, O., (1998). Nuevas técnicas para determinar la calidad de los ensilados. *Tecnología Agroalimentaria*. CIATA N° 2.

MARTÍNEZ, A.; DE LA ROZA, B., MODROÑO, S. Y ARGAMENTERÍA, A., (1998). Principios nutritivos y pH de ensilados de hierba en función del tipo de pradera y del aditivo empleado en su elaboración. En *Actas de la XXXVIII Reunión Científica de la SEEP*: 274-278.

MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, A., SOLDADO, A., GONZÁLEZ, A., VICENTE, F. Y DE LA ROZA-DELGADO, B. (2010b). *NIRS on site vs. at-line: Transferability and robustness of chemometric models on fresh silages.* En: *Proceedings of NIR on the GO IV Conference*. 53-55. Pádova, Italia.

MASSART, D.L., VANDEGINSTE, B.G.M., BUYDENS, L.M.C., DE JONG, S., LEWI, P.J. Y SMEYERS-VERDEKE, J. (1997). *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics* (2 vol.). Elsevier Science Pub., Amsterdam, The Netherlands.

MASSART, D.L., VANDEGINSTE, B.G.M., DEMING, S.N., MICHOTTE, Y. Y KAUFMAN, L. (1988). *Chemometrics: a textbook*. Elsevier Science Pub., Amsterdam, The Netherlands.

MERRY, R.J., LOWES, K.F., Y WINTERS, A. (1997). *Current and future approaches to biocontrol in silage.* *Proceedings of the 8th International symposium Forage conservation*. Research Institute of Animal Nutrition, Ltd. Pohorelice, 17-27.

MIDDELHOEK, S. (2000). Celebration of tenth transducers conference: the past, present and future of transducer research and development. *Sensors and Actuators B*, 82, 2-23.

MILLMIER A; LORIMOR J; HURBURGH JR, C; FULHAGE C; HATTEY J; ZHANG H (2000). *Near-infrared sensing of manure nutrients. Transactions of the ASAE*, 43 (4), 903–908.

MURRAY, I. (2004). *Scattered information: philosophy and practice of near infrared spectroscopy. Proceedings of the 11th International Conference on Near Infrared spectroscopy. NIR Publications* (2004) 2.

NAES, T., ISSAKSSON, T., FEARN, T. Y DAVIES, T. (2002). *A user-friendly guide to multivariate calibration and classification. NIR Publications*, Chichester, UK.

NICOLAÏ, B.M., BEULLENS, K., BOBELYN, E., PEIRS, A., SAEYS, W., THERON, K.I Y LAMMERTYN, J. (2007). *Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review. Postharvest Biology and Technology*, 46, 99-118.

NOBLE, D. (1995). *Illuminating near-IR. Analytical Chemistry* 67 23 p. 735A-740A.

NORRIS, K. H. (1964). *Simple spectroradiometer for 0.4 to 1.2-micron region. Trans. ASAE* 7(3), pp. 240-242

NORRIS, K.H. Y WILLIAMS, P.C. (1984). *Optimization of mathematical treatments of raw nearinfrared signal in the measurement of protein in hard red spring wheat. I. Influence of particle size. Cereal Chemistry* 61 2 pp. 158-165.

NORRIS, K.H., BARNES, R.F., MOORE, J.E. Y SHENK, J.S. (1976). *J. Anim. Sci.* 43 (4): 889-897

OSBORNE, B.G. Y FEARN, T. (1986). *Near Infrared Spectroscopy in Food Analysis Longman Scientific and Technical*, Halow, Essex, UK.

OSBORNE, B.G., FEARN, T. Y HINDLE, P. (1993). *Practical NIR Spectroscopy with Applications in Food and Beverage Analysis. Longman Scientific and Technical London*, UK.

OTTO, M. (1998). *Chemometrics: statistics and computer application in analytical chemistry*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.

OUDE ELFERINK, S.J.W.H., DRIEHUIS, F., GOTTSCHAL, J.C. Y SPOELSTRA S.F. Los procesos de fermentación del ensilaje y su manipulación. Depósito de documentos de la FAO.

PARK, R.S., AGNEW, R.E. Y BARNES, R.J. (1999). *The development of near infrared reflectance spectroscopy calibrations for undried grass silage and their transfer to another instrument using multiple and single sample standardisation*. J. Near Infrared Spectrosc., 7:117-131.

PÉREZ-MARÍN, D., PAZ, P., GUERRERO, J.E., GARRIDO-VARO, A., SÁNCHEZ, M.T. (2011). *Postharvest shelf-life discrimination of nectarines produced under different irrigation strategies using NIRS-spectroscopy*. LWT-Food Science and Spectroscopy. 2010. Market profile: Handheld and Portable NIR. Spectroscopy Online. Diciembre 2010. pp. 2859-2876.

PNT-001-FND (1990). Fibra Neutro Detergente. Rev. 1. Laboratorio de Nutrición Animal. SERIDA.

PNT-005-FAD (1990). Fibra Ácido Detergente. Rev. 1. Laboratorio de Nutrición Animal. SERIDA.

PNT-AGV's (2000). Determinación de ácidos grasos y ácido láctico por HPLC. Rev. 1. Laboratorio de Nutrición Animal. SERIDA.

PNTNA-G-008 (2008). Determinación de pH por potenciometría. Rev. 6. Laboratorio de Nutrición Animal. SERIDA.

PNTNA-G-012 (2008). Determinación de nitrógeno total/proteína bruta por método Kjeldahl. Rev. 7. Laboratorio de Nutrición Animal. SERIDA.

PNTNA-G-015 (2007). Determinación de glucosa y almidón por método electroquímico. Rev. 7. Laboratorio de Nutrición Animal. SERIDA.

PNTNA-G-019 (2007). Determinación de fibra bruta con Fibertec. Rev. 7. Laboratorio de Nutrición Animal. SERIDA.

PNTNA-G-025 (2007). Determinación de humedad y cenizas por termogravimetría. Rev. 6. Laboratorio de Nutrición Animal. SERIDA.

PUIGDOMÉNECH, A. (1998). *Optimització del control de qualitat en productes agrícoles mitjançant espectrometria d'infraroig proper (NIR): aplicació als farratges de Catalunya. Transferència d'equacions de calibratge multivariant en xarxes instrumentals*. Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona.

REAL DECRETO 1144/2006, de 6 de octubre, por el que se regulan las condiciones de aplicación de la normativa comunitaria en materia de higiene de los piensos (Publicado en BOE núm. 249 de 18 de Octubre de 2006).

REGLAMENTO (CE) No 178/2002 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 28 de enero de 2002 por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria (DO L 31 de 1.2.2002, p. 1).

REGLAMENTO (CE) No 183/2005 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 12 de enero de 2005 por el que se fijan requisitos en materia de higiene de los piensos (DO L35/1 de 8/2/2005).

REGLAMENTO (CE) No 1831/2003 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 22 de septiembre de 2003 sobre los aditivos en la alimentación animal (DO L 268 de 18.10.2003, p. 29).

RIVEROS, E. Y ARGAMENTERIA, A. (1987). Métodos enzimáticos de la predicción de la digestibilidad in vivo de la materia orgánica de forrajes. I. Forrajes verdes. II. Henos. III. Ensilados y pajas. *Avances en Producción Animal*, 12, 49-75.

SAEYS, W., DARIUS, P. Y RAMON, H. (2004) *Potential for on-site analysis of hog manure using a visual and near infrared diode array reflectance spectrometer*. *J. Near Infrared Spectrosc*, 12, 299-309.

SAVENIJE, B., GEESINK, G.H., VAN DER PALEN, J.G.P. Y HEMKE, G. (2005). *Prediction of pork quality using visible/near-infrared reflectance spectroscopy*. En: *Meat Science* 73 (2006) pp. 181-184.

SAVITZKY A. AND GOLAY, M.J.E. (1964). *Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures*. Anal. Chem. 36 pp. 1627-1639.

SHENK, J.S AND WESTERHAUS, M.O. (1991a). *Population definition sample selection and calibration procedures for near infrared spectra and modified partial least squares regression*. Crops Sci., 31:469-474.

SHENK, J.S Y WESTERHAUS, M.O. (1991a). *Population definition sample selection and calibration procedures for near infrared spectra and modified partial least squares regression*. Crops Sci., 31:469-474.

SHENK, J.S. (1990). *Standardizing NIRS instruments*. En *Proceedings of the 3rd International Conference on Near Infrared Spectroscopy*. Biston, R. and Bartiaux-Thill, N. (eds.). Agricultural Research Centre, Gembloux, Belgium. p. 649-654.

SHENK, J.S. AND WESTERHAUS, M.O. (1991b). *New standardisation and calibration procedure for NIRS Analytical Systems*. Crop Sci., 31:1694-1696.

SHENK, J.S. Y WESTERHAUS, M.O. (1989). U.S. Pat., 4866644, Sept 12 1989.

SHENK, J.S. Y WESTERHAUS, M.O. (1995) *Analysis of Agriculture and Food Products by Near Infrared Reflectance Spectroscopy*. Monograph, NIRSystems.

SHENK, J.S. Y WESTERHAUS, M.O. (1995a). *Analysis and Food Products by Near Infrared Reflectance Spectroscopy*. Monograph. NIRSystems Inc., Silver Spring, MD, USA.

SHENK, J.S. Y WESTERHAUS, M.O. (1995b). *Routine operation, calibration, development and network system management manual*. NIRSystems Inc., Silver Spring, MD, USA.

SHENK, J.S. Y WESTERHAUS, M.O. (1996). *Calibration the ISI way. Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves*. Davies, A.M.C. and Williams, P.C. (eds.). NIR Publications, Chichester, UK. pp. 198-202.

SHENK, J.S., WORKMAN, J.J. AND WESTERHAUS, M.O. (1992). *Application of NIR Spectroscopy to Agricultural Products*. En *Handbook of near infrared analysis*.

Burns, P.A. and Ciurczak, E.W. (eds.). Marcel Dekker, New York, NY, USA. pp. 383-427.

SHENK, J.S., WORKMAN, J.J. Y WESTERHAUS, M.O. (1992). *Application of NIR Spectroscopy to Agricultural Products*. En: *Handbook of near infrared analysis*. Burns, P.A. and Ciurczak, E.W. (eds.). Marcel Dekker, New York, NY, USA. pp. 383-427.

SOLDADO, A., FEARN, T., MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, A. Y DE LA ROZA-DELGADO B. (2013). *The transfer of NIR calibrations for undried grass silage from the laboratory to on-site instruments: Comparison of two approaches*, *Talanta*, 105, 8-14.

SOLDADO, A., FERNÁNDEZ, O., MARTÍNEZ, A. Y DE LA ROZA DELGADO, B. (2003). Estudio comparativo de métodos analíticos para la determinación del contenido en almidón en ensilados de maíz. En: Robles A. *et al.* (eds) *Pastos, desarrollo y conservación*, pp. 297-303. Granada, España: Sociedad Española para el Estudio de los Pastos.

SOLDADO, A., FONSECA, I., MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, A., MODROÑO, S. Y DE LA ROZA DELGADO, B. (2013). Del laboratorio al campo: Caracterización de ensilados de maíz con sensores NIRS portátiles. En: *Los Pastos: nuevos restos, nuevas oportunidades* pp. 195-202

SOMARRIBAS, M. (2007). Efecto de diferentes densidades de maíz y diferentes agotamientos del agua disponible en el suelo sobre la producción de forraje de maíz asociado con mucuna. Tesis de maestría. Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 90 p.

STARK, E. Y LUTCHER, K. (2004). *Diversity in NIR Instrumentation. Proceedings of the 11th International Conference of Near Infrared Spectroscopy*. NIR Publications 13.

STONE, M. (1974). *Cross-validation choice and assessment of statistical prediction*. *J. R. Statist. Soc. B*, 39:111-133.

TECATOR (1995). *Application Note, AN 300. The determination of nitrogen according to Kjeldahl using block digestion and steam distillation*. Sweden: Perstoorp Analytical.

TECATOR (2000). *Application Note, AN 304*. Fibre determination using Fibertec I&M Systems. Sweden: Perstorp Analytical.

VAN DER MEER, J. M. (1983). *C.E.C. Workshop on methodology of feedingstuffs for ruminants. European in vitro Ringtest Statistical Report*. Concept Report 155. The Netherlands

VAN SOEST P.J., ROBERTSON J.B. Y LEWIS B.A. (1991). *Methods for dietary, neutral detergent fiber and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. Journal of Dairy Science*, 74, 3583-3597.

VAN SOEST, P.J. (1963). *Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for determination of fiber and lignin. J. Assoc.Off. Agric. Chem.*, 46: 829-835.

WANG, Y., VELKAMP, D. Y KOWALSKI, B.R. (1991). *Multivariate instrument standardization. Anal. Chem.*, 63:2750-2756.

WANG, Z., DEAN, T., Y KOWALSKY, B.R. (1995). *Additive Background Correction in Multivariate Instrument Standization. Analytical Chemistry* 67 (14): 2379-2385.

WEINBERG, Z.G., Y MUCK, R.E. (1996). *New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. FEMS Microbiol. Rev.*, 19: 53-68.

WILKINS, R.J. 2000. *Forage Evaluation in Ruminant*. p.1-14. D.I. Givens, R.F.E. Axford and H.M. Omed (Eds.), CAB International, Wallingford, Oxon.

WILKINSON, J.M., WADEPHUL, F., Y HILL, J. (1996). *Silage in Europe: a survey of 33 countries*. Welton, UK: Chalcombe Publications.

WILLIAMS, P., (2003). *Near-infrared Technology—Getting the Best Out of Light*. PDK Grain. Nanaimo, Canada

WILLIAMS, P.C. (2001). *Near Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries. 2nd edition*. American Association of Cereal Chemist. Inc. St. Paul. En: PK Williams & K. Norris (Ed.). Minnesota. USA. P. 145.

WILLIAMS, P.C. Y NORRIS, K., (1987a). *Near-infrared technology in the agricultural and food industries*. Williams, P.C. and Norris, K. (eds.) American Association of Cereal Chemist Inc., St. Paul, MN, USA.

WILLIAMS, P.C. Y NORRIS, K., (1987b). *Qualitative applications of NearInfrared Reflectance Spectroscopy*. American Association of Cereal Chemist Inc., St Paul, MN, USA. p. 241-246.

WILLIAMS P.C. Y SOBERING D.C. (1996). *How do we do it: a brief summary of the methods we use in developing near infrared calibrations*. En: Davies A.M.C. y Williams P.C. (eds) *Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves*, pp. 185-188. NIR Publications, Chichester, U.K.

WOLD, S., SJÖSTRÖM, M. Y ERIKSSON, L. (2001). PLS- regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 58 (2001) 109–130

WOLD, S. Y SJÖSTRÖM, M. (1998). *Chemometrics, present and future success*. *Chem. Intell. Lab. Syst.*, 44:3-14.

WOLD, S., ANTII, H. LINDGREN, F., Y OHMAN, J. (1998). *Orthogonal signal correction of near-infrared spectra*. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 44 (1-2): 175-185.

WORKMAN JR., J., KOCH, M. Y VELTKAMP D.J. (2003). *Process analytical chemistry*. *Anal. Chem.* 75. pp. 2859–2876.