

**UNIVERSIDAD DE OVIEDO**

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA**

**Potencial de datos espectrales NIRS  
“*on-site*” para la detección de  
desviaciones de producto en leche  
respecto al estándar de calidad y  
seguridad**

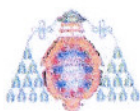
TRABAJO FIN DE MASTER

POR

Zafra Chillerón Isabel

JULIO, 2014





Master en Biotecnología Alimentaria  
Universidad de Oviedo  
C/Julián Clavería s/n. 33071 Oviedo, España  
Tel. 985106226. Fax 985103434. <http://www.unioviado.es/MBTA>



**PROFESOR TUTOR:**

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

Dra. Dña. Ana Soldado Cabezuelo (SERIDA)

**CERTIFICA:**

Que D. **Isabel Zafra Chillerón** 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, 8ª promoción curso 2013-2014.

Oviedo, de 11 de Julio 2014

Dña. Begoña de la Roza Delgado

Dña. Ana Soldado Cabezuelo

VºBº

Manuel Rendueles de la Vega

Coordinador del Master en Biotecnología Alimentaria

## **AGRADECIMIENTOS**

A Begoña de la Roza y Ana Soldado, por todos los conocimientos que compartieron, el tiempo dedicado, preocupación y la ayuda continua durante el desarrollo de este trabajo.

A Adela, por sus consejos y alegría continua.

A Mara por su infinita paciencia

A Isa y Sagrario por los ratitos de compañía.

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

Al proyecto INIA: RTA2012-00063-C02-01 "*Instrumentos NIRS portátiles de nueva generación para el análisis de leche "on site" en explotaciones ganaderas*", que permitió el desarrollo de este trabajo.

A todas las personas que he conocido durante este año y que han convertido mi estancia en inolvidable.

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

A mi familia por apoyarme y darme todo lo que tienen.

GRACIAS

## ÍNDICE

RESUMEN.....	I
ABSTRACT .....	II
LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE TABLAS .....	VII
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y EXPERIMENTALES.....	5
2.1 Parámetros de calidad de la leche de vaca.....	5
2.1.1 Leche .....	5
2.1.2 Calidad higiénica de la leche. ....	9
2.1.3 Necesidad del control inmediato de la calidad físico-química de la leche.....	9
2.2 Espectroscopía NIR.....	10
2.2.1 Introducción a la Espectroscopía NIR.....	10
2.2.2 Bases teóricas de la absorción NIR.....	12
2.2.3 Instrumentación y modos de análisis.....	15
2.2.4 Equipos NIR de reducido tamaño y portátiles .....	21
2.2.5 Análisis NIRS: Establecimiento de las bases metodológicas para la recogida de información espectral NIR.....	25
2.2.6 Repetibilidad espectral .....	26
2.2.7 Pretratamiento de la señal espectral.....	27
2.2.8 Ventajas e inconvenientes de la tecnología NIR.....	29
2.2.9 Métodos analíticos tradicionales de leche empleados en el sector lácteo. ....	30
2.3 El uso de la espectroscopía de infrarrojo cercano en leche .....	32
3 METODOLOGÍA UTILIZADA .....	41
3.1 Descripción y origen de las muestras de leche .....	41

3.2	Análisis e instrumentación NIRS .....	44
3.2.1	Instrumentos NIR para el análisis de leche líquida .....	44
3.2.2	Cubetas para la toma de espectros NIR .....	47
3.2.3	Pretratamiento de la leche para su análisis .....	48
3.2.4	Dilución de leche con agua.....	50
3.2.5	Filtración y dilución de leche.....	51
3.3	Optimización del análisis espectral con el equipo <i>on-site</i> .....	52
3.3.1	Aplicaciones de microPHAZIR.....	52
3.3.2	Softwares .....	56
3.3.3	Modelos estadísticos .....	59
3.3.4	Pretratamiento SNV y SNVD .....	60
4	RESULTADOS EXPERIMENTALES.....	61
4.1	Efecto de la dilución sobre el espectro de leche .....	61
4.2	Efecto de la filtración sobre el espectro de la leche.....	65
4.3	Equipo de referencia 6500 NIR y microPHAZIR.....	70
4.4	Evaluación de los métodos instrumentales de microPHAZIR .....	74
4.5	Repetibilidad y reproducibilidad espectral .....	83
4.5.1	Estudio de factores que afectan a la repetibilidad espectral .....	83
4.5.2	Estudio de factores que afectan a la reproducibilidad espectral.....	89
5	ESTUDIO ECONÓMICO.....	93
6	CONCLUSIONES .....	96
7.	ABREVIATURAS .....	97
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	100
	ANEXO I.....	112
	ANEXO II.....	128

## RESUMEN

La leche aporta nutrientes esenciales de gran relevancia nutricional para los seres humanos, sobre todo durante la infancia y la edad avanzada. Es una excelente fuente de proteínas, vitaminas, minerales, calcio y otros componentes bioactivos. Su composición no es uniforme y por eso es importante su análisis a tiempo real.

El presente proyecto trata de obtener una mayor comprensión científica de las posibilidades de un nuevo instrumento NIRS (*Near Infrared Spectroscopy*) portátil basado en la tecnología MEMS (*Microelectronic Mechanical System*) para su aplicación en el análisis de muestras de leche como un sensor rápido, no destructivo y de bajo coste para la toma de decisiones en tiempo real en la producción de leche, incluso en las propias explotaciones.

Se optimizaron las condiciones experimentales para la recogida de espectros de calidad en el infrarrojo cercano en leche líquida, mediante el uso de instrumentos MEMS-NIR portátiles de nueva generación, que podrían tener aplicación en el análisis físico-químico de la leche producida por las vacas individuales en explotaciones lecheras. Para ello se utilizaron dos instrumentos NIRS, un equipo portátil, *on-site* (microPHAZIR) y un equipo de referencia de laboratorio, *at-line* (FOSS NIRSystems 6500), y se analizaron un total de 256 muestras de leche cruda. Se evaluaron diferentes pretratamientos de muestra (dilución en agua, filtrado de muestras) y se diseñaron 8 modos de análisis instrumental para el equipo de estudio. Los análisis se realizaron en el rango espectral NIR 1600-2400 nm. Una vez seleccionadas las aplicaciones más adecuadas se estudió la repetibilidad y reproducibilidad espectral de los modos de análisis de microPHAZIR que presentaron las mejores características de análisis (*Spectro80 E0* y *Spectro80 E0 +A*) mediante el estadístico *Root Mean Square and Correction* (RMSC).

El posterior desarrollo de modelos robustos exige tener datos espectrales de elevada repetibilidad y fiabilidad, que garanticen que la calidad de los espectros sea adecuada para poder obtener la información de interés.

Las dos aplicaciones seleccionadas recogen 80 escaneos/muestra, lo que reduce el ruido espectral en gran medida. El protocolo diseñado con adaptador de líquidos (*Spectro80 E0*) asegura mejor repetibilidad y reproducibilidad de los datos espectroscópicos NIRS en leche cruda de bovino.

## ABSTRACT

The milk provides essential nutrients of great nutritional importance to humans, especially during childhood and old age. It is an excellent source of protein, vitamins, minerals, calcium and other bioactive components. Its composition is not uniform and therefore it is important real-time analysis of milk samples.

The specifications for tuning and optimizing collection of high quality spectra in the near infrared of liquid milk were established by using a new generation of portable near infrared spectrometers based on MicroElectro Mechanical Systems (MEMS-NIRS). It could be used in the physico-chemical analysis of the milk produced by individual cows on dairy farms. Two NIRS instruments were employed in this research work, the first one, an *at-line* laboratory equipment (FOSS NIRSystems 6500) and the second one a portable *on-site* (microPHAZIR). A total of 256 samples of raw milk were analyzed. Two different sample pretreatments were evaluated (dilution with water and filtering) and 8 instrumental modes of analysis were designed and tested. Analyzes were performed in the NIR spectral range between 1600 to 2400 nm. After selection of the best instrumental methods (*Spectro80 E0* and *E0 + Spectro80 +A*), repeatability and reproducibility were calculated comparing both methods with the statistic *Root Mean Square and Correction* (RMSC) .

Further development of robust chemometrical models with NIR spectral data requires high repeatability and reliability of measures, in order to ensure that quality of the spectra is adequate to obtain reliable NIR information.

Two methodologies, one using liquid adapter and 1mm pathlength cuvette and the other one with a 17 mm pathlength cuvette, were selected for further researches. To minimize the spectral noise each spectrum was the mean of 80 scans collected in transreflectance mode. The protocol adapter designed with liquids (*Spectro80 E0*) ensures better repeatability and reproducibility of the NIRS spectral data in raw bovine milk.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Producción integrada en una explotación agroganadera con control in-situ del producto final. ....	2
<b>Figura 2.1.</b> Regiones del espectro electromagnético.....	12
<b>Figura 2.2.</b> Fenómenos de interacción radiación-materia.....	14
<b>Figura 2.3.</b> Bandas de absorción en la región NIR asignadas a grupos funcionales. .	14
<b>Figura 2.4.</b> Esquema de un espectrofotómetro con sistema monocromador. ....	16
<b>Figura 2.5.</b> Esquema de los modos de análisis NIRS de transmitancia, reflectancia, doble transmisión e interactancia.....	19
<b>Figura 2.6.</b> Rejilla de difracción basada en un sistema MEMS (arriba). Esquema de un diseño instrumental post-dispersivo que incorpora tecnología MEMS (abajo).....	24
<b>Figura 2.7.</b> Equipo para análisis de leche, CombiFoss <sup>TM</sup> FT+, combina el instrumento MilkoScan FT y Fossomatic FC. ....	31
<b>Figura 2.8.</b> Espectros de leche cruda.....	38
<b>Figura 3.1.</b> Sistema de ordeño automático (AMS) del SERIDA empleado en la recolección de muestras de leche.....	43
<b>Figura 3.2.</b> Esquema de recogida de muestras de leche líquida para su análisis del SERIDA. ....	43
<b>Figura 3.3.</b> Equipo portátil microPHAZIR. (a) Esquema de modo de incidencia de la luz sobre la muestra y (b) Adaptador para líquidos acoplado a microPHAZIR.....	45
<b>Figura 3.4.</b> Equipos <i>on-line</i> FOSS NIRSystems 6500 y cápsula para líquidos opacos.	46
<b>Figura 3.5.</b> Cubeta de cuarzo para líquidos con paso óptico de 17 mm FOSS (izquierda) y cubeta de cuarzo para líquidos con paso óptico de 1mm (derecha). Llenado y presentación de las distintas cubetas. ....	47
<b>Figura 3.6.</b> Muestras de leche en baño de agua a $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ con agitación suave (izquierda) y agitación manual durante 20-30 segundos (derecha).....	49



<b>Figura 3.7.</b> Esquema de los métodos de preparación de muestras para los análisis NIR. ....	50
<b>Figura 3.8.</b> Esquema y cálculo de las diluciones de leche y agua. ....	51
<b>Figura3.9.</b> Filtro de celulosa (izquierda) y filtro de jeringa (derecha). ....	51
<b>Figura 3.10.</b> FOSS-NIRSystem 6500 trabajando a tiempo real a través del software ISIScan.....	57
<b>Figura 3.11.</b> Espectros de leche típicos recogidos en el equipo portátil microPHAZIR (izquierda) y espectros de leche recogidos en el equipo de laboratorio FOSS NIRSystems 6500 (derecha). ....	57
<b>Figura 3.12.</b> Pantalla de visualización del software PHAZIR Method Generator v.1.5.6.1.....	58
<b>Figura 4.1.</b> Espectro promedio de muestra de leche en dilución al 75%, al 100% y muestra de leche comercial semidesnatada, analizadas en modo <i>Spectro10 D2 +A</i> . ..	62
<b>Figura 4.2.</b> Espectro de 3 muestras de leche individuales con distinto % de grasa con un pretratamiento de dilución al 300%, analizadas con el modo <i>Spectro10 D2 +A</i> . ....	64
<b>Figura 4.3.</b> Espectro de 3 muestras de leche individuales con distinto % de grasa con un pretratamiento de dilución al 300%, analizadas con el modo <i>Spectro10 D2 +A</i> , representadas en segunda derivada sin tratamiento (ST) (a) y con tratamiento SNVD (b). ....	64
<b>Figura 4.4.</b> Espectro promedio de 21 muestras de leche individuales con pretratamiento (filtro 1 $\mu\text{m}$ y dilución 100%) en modo <i>Spectro80 D2 +A</i> y el espectro promedio del conjunto.....	66
<b>Figura 4.5.</b> Promedio de 6 muestras de leche individualesseleccionadas por su contenido en grasa (réplica I). Muestras filtradas y diluidas a 100%, 125%, 150% y 200%. Modo <i>Spectro80 D2 +A</i> .....	68
<b>Figura 4.6.</b> Espectro promedio de 6 muestras de leche individuales, analizadas en modo <i>Spectro80 D2 +A</i> , con pretramamiento de filtración y dilución a 150% (I) y su réplica (II). ....	68

**Figura 4.7.** Espectros promedio de 6 muestras de leche individuales seleccionadas por su porcentaje en grasa (réplica II) con pretratamiento de filtración y dilución a 100% (a), 125% (b) y 150% (c), analizadas en el modo *Spectro80 D2 +A* de microPHAZIR. 69

**Figura 4.8.** Espectro promedio de 24 muestras de leche individuales analizadas con los modos: *6500 NIR* y *Spectro5 E0*(a) y sus correspondientes primeras derivadas sin tratamiento (ST)(b) y con tratamiento SNVD (c)..... 71

**Figura 4.9.** Espectros de una muestra de leche individual (V112) medida con tres modos de análisis distintos: *Spectro5 E0 +A*, *Spectro5 E0* y *6500 NIR*. ..... 72

**Figura 4.10.** Espectro promedio de 4 muestras de leche individuales analizadas con tres modos: *Spectro5 E0 +A*, *Spectro5 E0* y *6500 NIR*(a) y sus correspondientes primeras derivadas sin tratamiento (b) y con tratamiento SNVD (c)..... 73

**Figura 4.11.** Espectro de leche del tanque general analizada por diferentes modos de análisis y diferentes formas de presentación de muestra: *Spectro5 E0*, *Spectro5 E0 +A*, *6500 NIR* (Leche entera), *Spectro80 D2b +A* y *Spectro80 D2c +A*(Leche diluida al 100%). ..... 75

**Figura 4.12.** Espectro promedio de tres réplicas en tres días consecutivos (d1, d2 y d3) para una muestra de leche individual (V721M) analizada en el modo *Spectro5 E0*. ..... 76

**Figura 4.13.** Espectro promedio de tres réplicas en tres días consecutivos (d1, d2 y d3) para una muestra de leche individual (V723M) analizada en el modo *Spectro5 E0 +A*. ..... 77

**Figura 4.14.** Espectro promedio de tres réplicas en tres días consecutivos (d1, d2 y d3) para una muestra de leche individual (V110M) analizada en el modo *Spectro80 E0*. ..... 78

**Figura 4.15.** Espectro promedio de tres réplicas en tres días consecutivos (d1, d2 y d3) para una muestra de leche individual (V721M) analizada en el modo *Spectro80 E0 +A*. ..... 79

**Figura 4.16.** Espectro promedio de tres réplicas en tres días consecutivos (d1, d2 y d3) para una muestra de leche individual (V721T) analizada en el modo *Spectro80 D0 +A*. ..... 81

**Figura 4.17.** Estudio comparativo de diferentes modos NIRS: *6500 NIR*, *Spectro5 E0*, *Spectro5 E0 +A*, *Spectro80 E0*, *Spectro80 E0 +A*, *Spectro80 D0 +A* y *Spectro80 D1 +A*. Espectros promedio de 54 espectros de leche, agrupados por modo de análisis. . 81

**Figura 4.18.** Rango de valores en  $\log(1/R)$  de siete espectros NIR correspondientes siete modos de análisis..... 82

**Figura 4.19.** Espectros NIR de tres muestras de leche individual: 110T2 (a), 110M2 (b) y 721M2 (c) y tres réplicas analizadas en modo *Spectro80 E0*. ..... 84

**Figura 4.20.** Espectros NIR de tres muestras de leche individuales: 721M3 (a), 723T3 (b) y 723M3 (c) y tres réplicas analizadas en modo *Spectro80 E0 +A*. ..... 87

**Figura 4.21.** Espectros promedio NIR de muestras de leche individual: 110T (a) y 721T (b) analizados en tres días consecutivos en modo *Spectro80 E0 +A*. ..... 91

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 2.1.</b> Componentes principales (g/100 g) de la leche en diferentes especies de mamíferos.....	6
<b>Tabla 2.2.</b> Composición proteica de la leche de vaca.....	7
<b>Tabla 2.3.</b> Composición de ácidos grasos en los lípidos de la leche de vacuno. ....	8
<b>Tabla 2.4.</b> Sistemas de selección de longitudes de onda. ....	17
<b>Tabla 2.5.</b> Detectores clásicos empleados en espectroscopía NIR.....	18
<b>Tabla 2.6.</b> Equipos NIRS para aplicación en muestras líquidas.....	22
<b>Tabla 2.7.</b> Asociación de bandas NIR a componentes principales de la leche.....	40
<b>Tabla 3.1.</b> Descripción y pretratamiento (homogeneización de la materia grasa y calentamiento a 40°C, filtración y/o dilución con agua) de los conjuntos de muestras de leche utilizados para la puesta a punto de la metodología NIRS <i>on-site</i> . ....	42
<b>Tabla 3.2.</b> Principales características de los instrumentos utilizados. ....	45
<b>Tabla 3.3.</b> Modos de análisis de microPHAZIR para realizar medidas sobre muestras de leche cruda de vaca y sus características.....	52
<b>Tabla 3.4.</b> Modos de análisis NIR, forma de preparación y presentación de las muestras a los equipos NIRS ( <i>Near Infrared Spectroscopy</i> ). ....	56
<b>Tabla 3.5.</b> Características de los distintos tratamientos matemáticos: ST (sin tratamiento), SNV ( <i>Standard Normal Variate</i> ) y SNVD ( <i>Standard Normal Variate and Detrending</i> ). 1. Primera derivada de los espectros; 2. Segunda derivada. ....	60
<b>Tabla 4.1.</b> Espectros analizados con el equipo PHAZIR para un grupo de 25 muestras ( <i>Set 2</i> ) de leche procedente de vacas individuales clasificadas por su contenido en grasa. ....	63
<b>Tabla 4.2.</b> Valores de la raíz cuadrada del error cuadrático medio, la media y la desviación estándar de espectros NIR para 6 muestras de leche individuales analizadas durante 3 días con el modo <i>Spectro80 E0</i> de microPHAZIR. ....	86

<b>Tabla 4.3.</b> Valores de la raíz cuadrada del error cuadrático medio, la media y la desviación estándar de espectros NIR para 6 muestras de leche individuales analizadas durante 3 días con el modo <i>Spectro80 E0 +Ade</i> microPHAZIR.....	89
<b>Tabla 4.4.</b> Valores de RMSC, MEDIA y SD de espectros promedio NIR para 6 muestras de leche individuales analizadas durante 3 días con el modo <i>Spectro80 E0</i> de microPHAZIR.....	90
<b>Tabla 4.5.</b> Valores de RMSC, MEDIA y SD de espectros promedio NIR para 6 muestras de leche individuales analizadas durante 3 días con el modo <i>Spectro80 E0 +Ade</i> microPHAZIR. ....	91
<b>Tabla 4.6.</b> Valores promedio de RMSCy SD de espectros promedio NIR con los modos <i>Spectro80 E0y Spectro80 E0 +Ade</i> microPHAZIR. ....	92
<b>Tabla 5.1.</b> Precios aproximados de equipos de análisis de leche para el año 2002 a partir de datos facilitados por Foss Electric S.A.) .....	93
<b>Tabla 5.2.</b> Coste inicial del instrumento microPHAZIR y accesorios. ....	94
<b>Tabla 5.3.</b> Cálculo de Tiempo de amortización de la inversión inicial en el equipo portátil microPHAZIR para una explotación ganadera con 50 vacas.....	95
<b>Tabla 5.4.</b> Penalización y primas económicas a los ganaderos establecidos por el Grupo CAPSA para el año 2014. ....	95

# 1 INTRODUCCIÓN

En la actualidad, en la industria láctea se apuesta por el desarrollo de nuevos productos y el establecimiento de controles de calidad y seguridad alimentaria para transmitir a los consumidores los beneficios y valor añadido de los artículos de su marca. Para ello, es tan importante la implantación de técnicas innovadoras de producción integrada y la mejora continua desde su proceso hasta el consumidor, como los controles de calidad en todos los niveles de la cadena alimentaria (ver Figura 1.1). Por otro lado, es necesario incluir la reducción de costes de producción como garantía de competitividad del sector productor de leche, pero siempre ligado al compromiso con la calidad y seguridad alimentaria. Por todo ello se plantea la introducción de la tecnología NIRS (espectroscopia del infrarrojo cercano) con sensores portátiles en el establecimiento de controles de calidad y seguridad en cualquier punto de la cadena alimentaria o procesado del alimento. Actualmente se están dando los primeros pasos para su implementación *in-situ* en las explotaciones ganaderas.

A pesar del enorme potencial de la tecnología NIRS para dar respuestas a las demandas del control del sector agroalimentario, aún existe una amplia necesidad de generación de conocimiento multidisciplinar para ampliar las posibilidades de uso real de estos sensores a nivel *on-site*, es decir, en explotaciones, campo, plantas industriales, etc., de forma que permitan la toma de decisiones para la gestión de sistemas agroganaderos complejos en tiempo real.

Investigaciones realizadas en el SERIDA, han puesto de manifiesto diferentes restricciones para el análisis *on-site* con equipamientos portátiles MEMS-NIR. Concretamente para el análisis de materias primas y piensos no molidos, debido al tamaño limitado de su ventana óptica (Modroño *et al.*, 2012). Sin embargo, la información relacionada con el empleo de este equipamiento para análisis de líquidos es escasa. De ahí que nuestro planteamiento sea desarrollar una sistemática para la implementación de sensores MEMS-NIR *on-site*, que permite llevar a cabo un control de calidad y seguridad en leche en su forma natural por el propio ganadero. Esta metodología sería un pilar básico como herramienta para dicho control cuyos beneficios serían de un elevado valor socio-económico y representarían una importante contribución al aseguramiento de la calidad y seguridad en los sistemas de producción, permitiendo dar respuestas inmediatas de la calidad de las producciones,

reforzando las ganaderías, incorporando herramientas de gestión para la reducción del coste de litro de leche, e incluso posibilitando la búsqueda de nichos para la producción de leche con valor añadido, mitigando los inputs medioambientales.



**Figura1.1.** Producción integrada en una explotación agroganadera con control *in-situ* del producto final.

La combinación de sistemas micro-electro-mecánicos (MEMS, por sus siglas en inglés) es una de las aportaciones más novedosas que se ha realizado en la integración de sensores con tecnología NIRS. Esta tecnología incorpora dispositivos MEMS consistentes en una red lineal de microespejos que actúa como una red de difracción microprogramable, lo que posibilita la selección de onda a escala de microsegundos (Day *et al.*, 2005). A pesar de la existencia en el mercado de algunos equipos MEMS-NIRS, la información científica disponible sobre estas aplicaciones en el sector agroalimentario es escasa. En lo que se refiere al análisis de leche, Santos *et al.* publicaron en 2013 un trabajo sobre el análisis de leche bovina con el equipo de mano PHAZIR (microPHAZIR, Termo Fisher Scientific Inc., USA), actualmente el único equipo portátil NIR para evaluar la adulteración de la leche de marcas comerciales en USA, arrojando resultados prometedores en su discriminación o dosificación.

Como se ha comentado, antes de la implantación de una aplicación es necesario profundizar en algunos aspectos relacionados con la interacción de la radiación sobre las diferentes muestras (líquidas), con el fin de poder conocer con exactitud la forma óptima de presentación de muestra, optimización de la intensidad de

la luz, optimización de la región del infrarrojo cercano a utilizar en cada caso, dependiendo del parámetro a determinar, conexión de datos del sensor con bases de datos de gestión, diferentes adaptaciones ergonómicas para cada producto y ambiente, etc.

En el análisis de leche, una de las complejidades que se nos plantean es la heterogeneidad de la muestra (Schmilovich *et al.*, 2000; Tsenkova *et al.*, 2000) y su elevado contenido en agua. Aunque existen publicaciones que ponen de manifiesto la utilidad de la tecnología NIRS para predecir parámetros de calidad y microbiológicos en muestra intacta (Tsenkova *et al.*, 1999; Drackova *et al.*, 2008), estas evaluaciones se han realizado con equipos NIRS de laboratorio con amplio rango espectral y diversas posibilidades de presentación de muestra. En lo referente a la caracterización de las producciones lácteas como alimento funcional, como puede ser la determinación de los ácidos grasos insaturados, investigaciones preliminares han puesto de manifiesto la viabilidad de cuantificación de ácidos grasos (AG) en leche con coeficientes de correlación de 0,9 para algunos ácidos grasos de interés (CLA, ácido linoleico conjugado) (de la Roza *et al.*, 2010), analizando la leche en estado líquido. Más aún, los resultados obtenidos por Coppa *et al.* (2010) muestran modelos quimiométricos capaces de predecir hasta 50 ácidos grasos, pero con mejores resultados para leche desecada que líquida. Sin embargo, ambas investigaciones se han realizado utilizando un equipo *at-line* (FOSS NIRSystems 6500). Este equipo de red dispersiva es un espectrofotómetro monocromador, que realiza medidas entre 400-2500 nm, con un intervalo de 2 nm, en los que los análisis se realizarán por doble transmisión en una celda de aluminio como material reflectante. En lo relacionado con la determinación *on-site*, Kawasaki *et al.* (2008) desarrollaron un sensor NIRS para un robot de ordeño capaz de controlar de manera directa la calidad de la producción láctea.

La recogida de la información espectral NIRS en muestras de leche de vaca, esta influenciada por las características intrínsecas del producto a analizar, y del equipamiento NIRS portátil (microPHAZIR, Polychromix). Este instrumento NIRS es uno de los primeros de nueva generación de equipos portátiles que utiliza sistemas micro-electro-mecánicos combinados con espectroscopía digital transformada (MEMS-DTS). Los MEMS son chips que llevan a cabo la dispersión de la luz, bloqueando secciones discretas, y reflejando otras, con pérdidas mínimas de intensidad. La DTS es una nueva técnica en la que aplicando un apropiado voltaje a cada píxel individual, es posible controlar que pixels son los responsables de la difracción de la luz y su



correspondiente región espectral. En microPHAZIR, la luz reflejada es recogida y recombinada sobre un único foto-detector. Este equipo trabaja en un rango espectrofotométrico entre 1600-2400 nm, con una resolución de 8,7 nm (variables), carece de elementos móviles que confieren una mayor robustez en la medida, necesaria para el trabajo de recogida espectral *on-site*. Es un equipo compacto, con forma de pistola y batería recargable a red, con referencia integrada que posibilita una fácil calibración en campo y que dispone de la dualidad para el análisis de muestras sólidas en su estado natural y mediante un adaptador al análisis de muestras en estado líquido.

Un aspecto importante a tener en cuenta en la puesta a punto de esta metodología para el análisis de la leche fresca es el efecto de dispersión de la luz debido a las partículas en suspensión, principalmente glóbulos grasos y micelas de proteínas que podrían marcar gran variabilidad espectral.

Ante la necesidad de establecer controles de calidad de la leche en las explotaciones, y en el marco del proyecto RTA 2012-00063-CO2-01 (Instrumentos NIRS portátiles de nueva generación para el análisis de leche *on-site* en explotaciones ganaderas, se ha desarrollado este trabajo fin de máster, en el Área de Nutrición, Pastos y Forrajes del SERIDA (Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario del Principado de Asturias), con el objetivo de poner a punto una metodología de muestreo y recogida de espectros de calidad en el infrarrojo cercano en leche líquida, mediante el uso de instrumentos MEMS-NIRS portátiles de nueva generación incluyendo la evaluación del muestreo necesario.

Siendo objetivos específicos del presente trabajo los siguientes:

- I. Establecimiento de un procedimiento de análisis para muestras de leche de vacas individuales *on-site*.
- II. Análisis de la repetibilidad y reproducibilidad de los espectros obtenidos por análisis con el equipo portátil microPHAZIR.
- III. Establecimiento de las pautas generales para la construcción de una base de datos espectrales NIRS con muestras de leche en su estado natural, como fase previa al desarrollo de modelos de predicción NIRS.

## **2 CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y EXPERIMENTALES**

### **2.1 Parámetros de calidad de la leche de vaca**

En los últimos años, la calidad de la leche ha cobrado una mayor importancia, debido a la gran exigencia por parte de la industria de un producto con las características adecuadas para su transformación, y también un mayor requerimiento del consumidor.

#### **2.1.1 Leche**

La leche cruda se define como la leche producida por la glándula mamaria de vacas, ovejas, cabras o búfalas, que no haya sido calentada a una temperatura superior a 40°C ni sometida a un tratamiento de efecto equivalente (Real Decreto 1679/94 de 22 de julio, por el que se establecen las condiciones sanitarias aplicables a la producción comercialización de leche cruda, leche tratada térmicamente y productos lácteos).

La calidad de la leche cruda está relacionada con su composición y parámetros físico-químicos, sus características organolépticas, así como otros factores relacionados con la higiene de la leche (Buxadé, 1996).

Algunos de los parámetros físico-químicos presentan un especial interés, ya que han sido y son utilizados para detectar de forma rápida posibles fraudes por alteración de la leche (como adición de agua), o bien como indicadores de la calidad de la leche (como pH). Tradicionalmente, era considerada la leche de mayor calidad aquella que contenía más nutrientes básicos, como materia grasa, proteínas, lactosa y sales minerales (Buxadé, 1996).

Los constituyentes mayoritarios de la leche de vaca son proteína, lactosa, grasa y sólidos totales o materia seca. Desde el punto de vista cualitativo, la leche de todas las especies (Tabla 2.1) tiene una composición semejante, aunque cuantitativamente, la composición de las diversas fracciones como proteína y grasa varían en cada una de ellas, lo cual puede ser debido a diferentes factores: raza, periodo de lactación, alimentación, manejo, etc. Por ello es difícil hablar de una composición constante.

**Tabla 2.1.** Componentes principales (g/100 g) de la leche en diferentes especies de mamíferos

	<b>Sólidos totales</b>	<b>Grasa</b>	<b>Caseína</b>	<b>Proteínas del suero</b>	<b>Proteín a total</b>	<b>Lactosa</b>	<b>Cenizas</b>
<b>Mujer Bóvidos</b>	12,4	3,8	0,4	0,6	1,0	7,0	0,2
<b>Vaca</b>	12,7	3,7	2,8	0,6	3,4	4,8	0,7
<b>Cebú</b>	13,5	4,7	2,6	0,6	3,2	4,9	0,7
<b>Búfala</b>	17,2	7,4	3,2	0,6	3,8	4,8	0,8
<b>Oveja</b>	19,3	7,4	4,6	0,9	5,5	4,8	1,0
<b>Cabra</b>	13,2	4,5	2,5	0,4	2,9	5,1	0,8
<b>Équidos</b>							
<b>Yegua</b>	11,2	1,9	1,3	1,2	2,5	6,2	0,5
<b>Burra</b>	11,7	1,4	1,0	1,0	2,0	7,4	0,5
<b>Camélidos</b>							
<b>Dromedaria</b>	13,6	4,5	2,7	0,9	3,6	5,0	0,7
<b>Camella</b>	15,0	5,4	2,9	1,0	3,9	5,1	0,7

Warwick (1980)

La leche es un complejo en dispersión acuosa heterogénea que contiene grasa en emulsión, proteínas en estado coloidal (caseína, albúminas, globulinas y proteínas del suero en solución) y otros compuestos solubles de naturaleza orgánica e inorgánica que incluyen minerales, vitaminas hidrosolubles y compuestos nitrogenados no proteicos (Gravert, 1987).

### **Proteína**

Aproximadamente el 95% del nitrógeno de la leche se encuentra en forma de proteína, el resto se encuentra en forma de urea, creatina, glucosalina, amoniaco, etc. Este porcentaje supone un valor de contenido en proteínas de 35 g por Kg de leche. La fracción proteica más importante, tanto cuantitativa como cualitativamente, es la caseína, ya que supone un 80% de las proteínas totales de la leche ( $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  y K-caseínas), el 20% restante corresponde a proteínas solubles ( $\beta$ -lactoalbúminas,  $\alpha$ -lactoalbuminas, inmunoglobulina, albúmina de suero sanguíneo y proteasas) (Mephram, 1982). El perfil y la concentración de proteína total varía entre vacas, número y fases de lactación, estación de ordeño, etc...(ver Tabla 2.2).

**Tabla 2.2.** Composición proteica de la leche de vaca.

<b>Proteínas</b>	<b>g/Kg de leche</b>
Caseínas	28,1
Proteína del suero	6,1
Caseínas $\alpha_{s1}$	11,5
Caseínas $\alpha_{s2}$	3,0
$\beta$ -caseínas	9,5
K-caseínas	3,4
$\gamma$ -caseínas	1,2
$\alpha$ -lactoalbuminas	1,2
$\beta$ -lactoalbuminas	3,1
Albuminas séricas	0,4
Inmunoglobulinas	0,8
Proteosa-peptona	1,0
<b>Proteína total</b>	<b>35,1</b>

Swaisgood (1973)

### **Grasa**

La grasa es el principal componente energético en la leche, responsable de muchas de las propiedades físicas y cualidades organolépticas de la leche y los productos lácteos. La mayor parte de los lípidos se encuentran en forma de glóbulos grasos de 2 a 3  $\mu\text{m}$  de diámetro, el resto lo constituyen fragmentos de membrana de los glóbulos de grasa que contienen una gran cantidad de ácidos grasos (AG) saturados e insaturados.

La leche típicamente contiene entre 35 y 40 g por Kg de leche, de los cuales un 70-75% son ácidos grasos saturados (AGS); un 20-25% son ácidos grasos monoinsaturados (AGM); y un 5% de ácidos grasos poliinsaturados (AGP) (Lock, 2004). En la tabla 2.3 se expone la composición más completa de los AG presentes en la grasa de la leche de ganado vacuno.

Los AG de la leche difieren entre especies y entre razas dentro de una misma especie. Así, entre las principales razas de vacuno lechero, la raza *Holstein* presenta la menor proporción media de AG (37,0 g/Kg) frente a razas mantequeras tipo *Guernsey Jersey* (48,7 y 51,3 g/Kg respectivamente) (Gibson, 1989). Además, dentro de cada raza, se han descrito variaciones individuales con la fase de lactación y edad. En una fase inicial de lactación, el porcentaje en grasa en leche es elevado, reduciéndose posteriormente en un plazo de 2 a 3 meses, para incrementar posteriormente de forma gradual. Finalmente hay un ligero incremento en el porcentaje de grasa con la edad, hasta que el animal alcanza su madurez, en torno a los 3 años. Posteriormente va a declinar paulatinamente, con valores próximos a 0,2 % por lactación, siendo esta disminución paralela a la de los sólidos no grasos.

**Tabla 2.3.** Composición de ácidos grasos en los lípidos de la leche de vacuno.

Ácido graso	g/100g	Ácido graso	g/100g
<b>C4:0</b>	1,61	<b>C15:0</b>	1,38
<b>C6:0</b>	1,90	<b>C16:0<sup>a</sup></b>	0,35
<b>C8:0</b>	1,30	<b>C16:0</b>	32,31
<b>C10:0</b>	3,25	<b>C16:1</b>	3,55
<b>C10:1</b>	0,32	<b>C17:0</b>	1,11
<b>C12:0</b>	3,66	<b>C18:0<sup>a</sup></b>	0,50
<b>C12:1</b>	0,12	<b>C18:0</b>	7,82
<b>C13:0</b>	0,21	<b>C18:1</b>	22,44
<b>C14:0</b>	11,28	<b>C18:3</b>	1,33
<b>C14:1</b>	1,34	<b>C20:0</b>	0,15

a: ácidos grasos de cadena ramificada

Adaptado de Jensen *et al.* (1992)**Lactosa**

La lactosa es un disacárido presente en la leche de los mamíferos que supone la mayor fuente de hidratos de carbono durante la lactancia. La lactosa es principal carbohidrato de la leche de vaca y su contenido varía en las diferentes especies entre un 4,8 y un 5,2% (Johnson, 1978), y constituye entre un 50 y 52% de los sólidos totales de la leche. Los principales precursores de la lactosa son D-glucosa plasmática (80%) y la D-galactosa, en menor medida se encuentran galactolípidos, cerebrósidos y galactoproteínas.

**Otros componentes**

Las vitaminas liposolubles (A, D, E y K) están asociadas al componente graso, mientras que las vitaminas hidrosolubles (B y C) se encuentran en la parte no grasa. La concentración de las vitaminas liposolubles depende de su presencia en la dieta animal. Otras sustancias con actividad enzimática también han sido descritas en leche, cuyo origen es diverso. Estas enzimas se encuentran en el suero, aunque la mayor parte de su actividad está localizada en otras fracciones, como las caseínas o la grasa, además, afectan a las propiedades físicas de la leche y por ello son habitualmente utilizadas como indicadores en la tecnología relativa al tratamiento y conservación de la leche.

Los minerales representan una pequeña fracción de los sólidos de la leche. Su concentración se encuentra entre 7 y 9 g/kg de leche. Esta fracción tiene una gran importancia nutricional, en particular por los aportes de calcio y fósforo. En una leche sin alteraciones, el 65% del calcio, el 60% del magnesio y el 50% del fósforo se

encuentran asociados a las caseínas en forma coloidal. El sodio, el potasio y el cloruro están en solución completamente. La leche contiene además oligoelementos (zinc, silicio, aluminio, hierro, etc.) cuyas variaciones están asociadas a cambios en la alimentación y a aportes externos (contaminación atmosférica, por el material de ordeño, etc.). El hierro también es esencial en la leche, donde limita el crecimiento bacteriano.

### **2.1.2 Calidad higiénica de la leche.**

En la leche existe una cantidad normal de células formada por células epiteliales de descamación y leucocitos. La respuesta inmunológica del animal ante un proceso infeccioso de la glándula mamaria, por ejemplo mamitis, se manifiesta por un incremento del recuento normal de células de la leche (RCS, Recuento de Células Somáticas). Una leche mamítica, con elevado número de células, presenta, además, alteraciones físico-químicas como aumento de los constituyentes procedentes de la sangre y reducción de grasa y lactosa, así como un aumento de pH, que puede alterar las características organolépticas del producto acabado (Dohoo y Meek, 1982).

### **2.1.3 Necesidad del control inmediato de la calidad físico-química de la leche**

En 2011, la producción mundial de leche ascendió a 749 millones de toneladas. Esto equivale a un consumo per cápita de 107,3 kg de leche líquida, una cifra que ha crecido, en promedio, un 1% anualmente en los últimos seis años (Summer, 2012). La mayor parte de esta leche se consume en forma líquida y es una fuente importante de la nutrición a nivel mundial, aunque grandes volúmenes de leche también son procesados para generar una amplia gama de alimentos e ingredientes de otros alimentos sólidos y semisólidos. Por consiguiente, al tratarse de un alimento ampliamente consumido y comercializado, la medición rápida y fiable de la composición es básica asegura el valor de la leche y los productos lácteos. La espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR) *at-line* se ha aplicado de manera rutinaria para este propósito en la industria láctea durante más de 30 años. Las aplicaciones iniciales fueron para el análisis de productos en polvo y queso (Ahmed y Goldstein, 1976; Frank y Brith, 1982), pero el desarrollo de nuevos hardware, software y quimiometría han ampliado el área de aplicación para incluir toda la gama de productos lácteos a lo largo de la cadena de producción. Se han realizado numerosos estudios tales como procedimientos de calibración (Frankhuizen, 2008), correlaciones bidimensionales espectroscópicas (Giangiacomo y Cattaneo, 2007) e incluso en el control de procesos, análisis en línea y la creación de redes de aplicación (Fagan *et*

*al.*, 2009). En los últimos cinco años ha aumentado considerablemente el número de trabajos sobre la tecnología NIR aplicada a leche y productos lácteos con gran énfasis en la evaluación de calidad, demostración de origen y el uso de la quimiometría para fomentar el conocimiento más allá de los parámetros de composición tradicionales tales como humedad, grasa y proteína (Wang *et al.*, 2010).

Sin embargo a pesar de la rapidez del análisis NIRS, su forma tradicional de aplicación (*at-line*) produce una demora entre el proceso de producción y el resultado, que en muchas ocasiones no permite un uso adecuado de la información así producida en la toma de decisiones en los diferentes niveles de la cadena de producción (Brennan *et al.*, 2003; Garrido, y Pérez-Marín., 2007). Actualmente, la tendencia de la instrumentación NIRS es hacia equipos portátiles ligeros, de alta velocidad de respuesta (milisegundos) y de bajo coste, que pueden ser instalados en diferentes puntos de la cadena alimentaria, para el análisis *on-site*. No obstante, la mayoría de estos instrumentos están diseñados para aplicaciones médicas y farmacéuticas, y no han sido evaluados científicamente por su potencial de aplicación en productos agroalimentarios y en condiciones reales de campo e industria.

La tecnología NIRS *on-site* tiene un elevado potencial para la caracterización en tiempo real de parámetros analíticos clásicos, como herramienta de clasificación de la materia prima en categorías de calidad y, asimismo, para el control de la calidad final de las producciones. Así mismo es interesante poner en conocimiento la posibilidad de conexión en red de los equipos de análisis NIRS *on-site* y el sistema informático

## **2.2 Espectroscopía NIR**

### **2.2.1 Introducción a la Espectroscopía NIR**

La región espectral de infrarrojo cercano se descubrió en 1800, cuando William Herschel fue capaz de tomar la temperatura de la región contigua a la zona rojiza del espectro visible al hacer pasar la luz solar por un prisma, esta medida demostró la existencia de una forma de luz invisible más allá del color rojo (Herschel, 1800). El desarrollo de aplicaciones y métodos espectroscópicos en esta región no ocurrió hasta años después de la mano de Abney y Festing (1881). Estos investigadores documentaron los primeros espectros en el intervalo de 700 a 1200 nm de la región NIR (*Near Infrared*) de líquidos orgánicos. No fue hasta la mitad del siglo XX que

aparecieron las primeras aplicaciones analíticas, a raíz de la aparición de los primeros espectrofotómetros comerciales.

En 1954, Wilbur Kaye fue el primero en presentar un estudio en el cual se registraron espectros de diferentes líquidos orgánicos en el intervalo de 700 a 3500 nm, asignando los grupos funcionales de moléculas a diferentes bandas de absorción. Una década más tarde, Birth y Norris (1958) publicaron trabajos donde se orientó la aplicabilidad de la espectroscopía NIR hacia el campo agroalimentario, mediante la aplicación de técnicas quimiométricas para el estudio de matrices complejas de origen vegetal.

La rápida evolución de la tecnología electrónica y óptica, permitieron a partir del año 1970 la incorporación de nuevos instrumentos en el campo de la espectroscopía NIR que permitirían la obtención de espectros completos, de calidad, con mayor rapidez y reproducibilidad (Noble, 1995; Henry, 1999). Paralelamente, los avances en el campo de la informática permitieron usar ordenadores con más y mejor capacidad de cálculo, con la posibilidad de obtener y almacenar gran cantidad de información espectral, que a su vez podría ser tratada quimiométricamente para extraer información analítica importante.

En la actualidad se han desarrollado múltiples aplicaciones de esta tecnología, entre las que 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; Nicolaï *et al.*, 2007; Cen y He, 2007, ).

La tecnología NIRS se define como la emisión de un haz de luz sobre la muestra, la cual, en función de su composición y/o naturaleza de los enlaces presentes en sus moléculas (-CH, -NH, -OH y -CO) interaccionará con ellos absorbiendo una determinada cantidad de radiación NIR. Esta se puede considerar como un sensor fiable donde un mismo espectro proporciona información multivariante, tanto física como química, de una sustancia o producto, la cual necesita un adecuado análisis matemático o quimiométrico para poder ser interpretada o de utilidad. Así mismo, el desarrollo continuo de nuevas técnicas quimiométricas, la minituarización de componentes instrumentales 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) se encuentra en el intervalo del espectro electromagnético comprendida entre la región visible y la región microondas, en el intervalo espectral  $780\text{-}10^6$  nm. Esta región se divide en tres zonas (Figura 2.1.):

- Infrarrojo cercano (NIR):  $770\text{-}2500$  nm
- Infrarrojo medio (MIR):  $2500\text{-}4\cdot 10^4$  nm
- Infrarrojo lejano (FIR):  $4\cdot 10^4\text{-}10^6$  nm

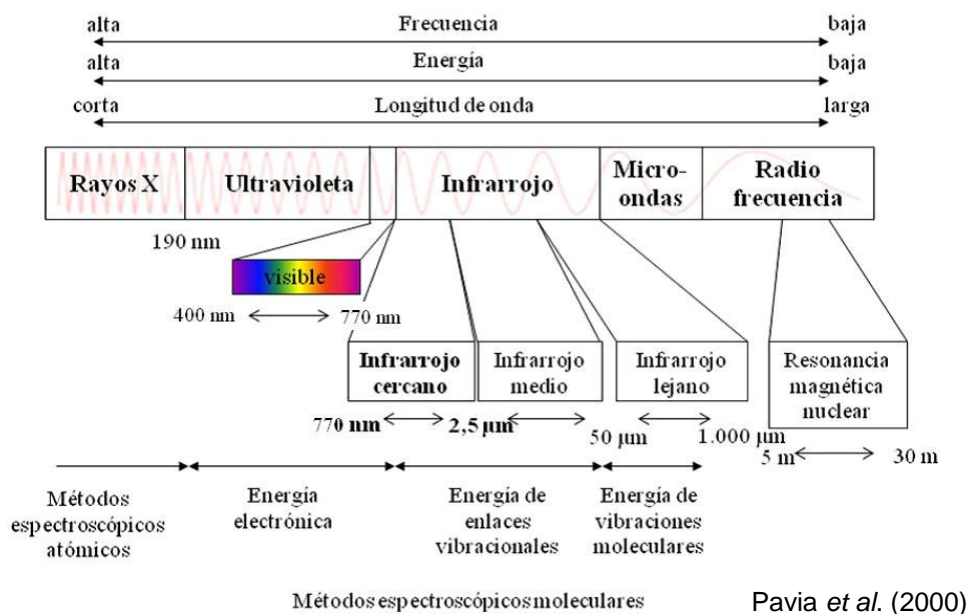


Figura 2.1. Regiones del espectro electromagnético.

Cada zona se diferencia por el fenómeno espectroscópico que provoca la absorción de energía por parte de la materia. La absorción en la región FIR se debe a rotaciones moleculares, la absorción en la región MIR se debe a vibraciones moleculares y la absorción en la región NIR se debe a los armónicos y bandas de combinación de vibraciones fundamentales de las moléculas orgánicas.

A consecuencia del propio movimiento vibracional o rotacional de las moléculas, estas pueden experimentar cambios netos en su momento dipolar y en

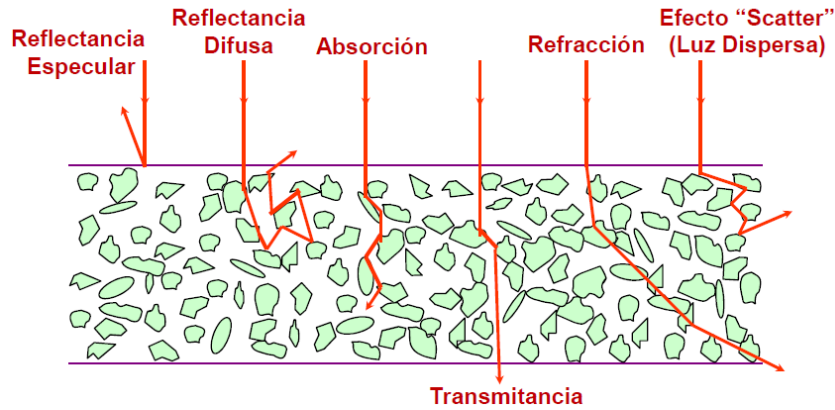
consecuencia absorber radiación infrarroja. En este caso el campo eléctrico asociado a la radiación puede interactuar con el campo eléctrico originado por la fluctuación del momento dipolar de la molécula y tener lugar una transferencia neta de energía que origina un cambio en la amplitud de la vibración molecular y por tanto la absorción de radiación (Burns y Ciuzark, 1992).

La radiación absorbida (o absorción absoluta) no puede ser medida directamente y en su lugar se mide la absorción relativa respecto a una referencia estable, en este caso se recurre a medir la transmitancia o reflectancia difusa para correlacionarla con la luz absorbida. Tanto la energía reflejada como la transmitida se expresan en unidades de absorbancia según la ecuación de Lambert-Beer (Williams y Norris, 1987; Burns y Ciuczak, 1992); Osborne *et al.*, 1993; ASTM, 1994; Bertrand y Dufour, 2000):

$$Absorbancia = \log\left(\frac{I_0}{I_t}\right) = -\log T = \varepsilon(\lambda) \cdot b \cdot c$$

$$Absorbancia = \log\left(\frac{1}{R}\right) = -\log\left(\frac{I_0}{I_r}\right) = \frac{\varepsilon(\lambda) \cdot b \cdot c}{s}$$

Los términos de la ecuación de Lambert-Beer corresponden con: la intensidad de la radiación incidente en la muestra ( $I_0$ ), intensidad transmitida a través de la muestra ( $I_t$ ), transmitancia ( $T$ ), reflectancia ( $R$ ), Intensidad reflejada ( $I_r$ ), coeficiente de absorción molecular ( $\varepsilon$ ), longitud de onda ( $\lambda$ ), paso óptico de la luz a través de la muestra ( $b$ ), coeficiente de dispersión ( $s$ ) y concentración de las moléculas absorbentes ( $c$ ). Esta ecuación relaciona la absorbancia de una muestra con la concentración de una molécula o analito capaz de absorber radiación presente en la misma muestra (Osborne *et al.*, 1993; Shenk y Westerhaus, 1995a; Bertrand y Dufour, 2000). No obstante, esta teoría no es aplicable al 100% a la espectroscopía NIR, ya que sólo es válida en ausencia de luz dispersa, pero es ampliamente utilizada (Osborne, 2000). En la Figura 2.2. se muestran los diferentes fenómenos a que da lugar la interacción de la radiación con la materia.

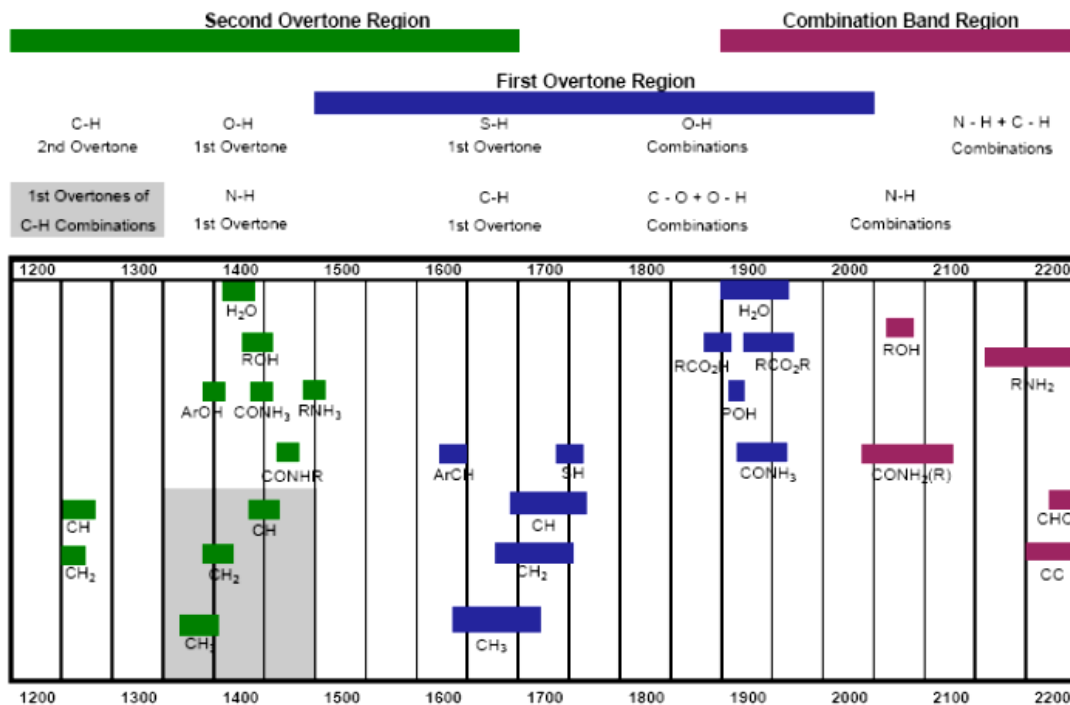


Adaptado de Shenk *et al.* (1992)

**Figura 2.2.** Fenómenos de interacción radiación-materia.

El espectro NIRS se define como una representación gráfica de la intensidad reflejada o transmitida (o absorbida) por la muestra en función de las longitudes de onda. El espectro está compuesto por sobretonos y combinaciones de bandas que se caracterizan por ser anchas, solapadas y de baja intensidad, pero que no pueden ser asignadas a un compuesto químico determinado. En la figura 2.3 se muestran los enlaces químicos principales y sus regiones espectrales de absorción NIRS correspondientes.

### NIR Absorptions in the 1200-2200 nm Range



**Figura 2.3.** Bandas de absorción en la región NIR asignadas a grupos funcionales.

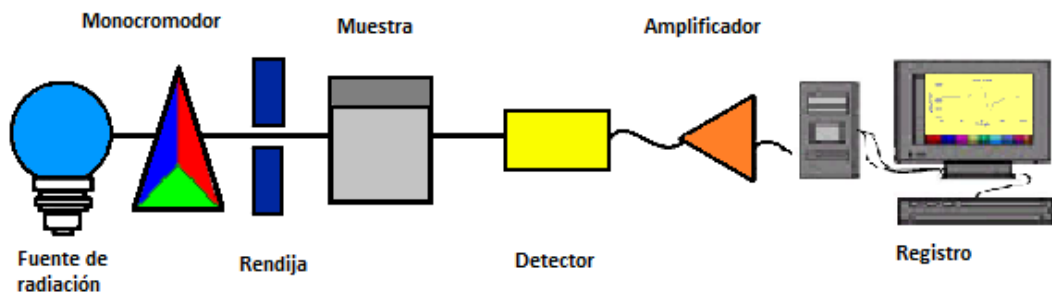
En las bandas de la región NIR se encuentran principalmente enlaces moleculares del tipo X-H, donde X puede ser: un átomo de carbono, un nitrógeno, un oxígeno, un azufre o grupos C=O, que se traducen en una huella físico-química o espectro muy complejo propio de cada material analizado (Williams y Norris, 2001a, Osborne *et al.*, 1993). Además, entre dos espectros de un mismo material puede haber variaciones debido a características de la muestra (temperatura, humedad, cristalinidad, tamaño de partículas, forma, distribución de las partículas, índice de refracción, etc...) y características físicas del instrumento (óptica del equipo, compartimento para el análisis de la muestra) que pueden producir errores de medida y operación durante los análisis (William y Norris, 2001b).

No obstante, a pesar de lo difícil que puede resultar la interpretación de los espectros generados, se sabe que varios enlaces moleculares están implicados en los diferentes tipos de absorciones de la radiación NIRS, esto significa que dichas absorciones pueden ser utilizadas para proporcionar información analítica de enlaces moleculares o de grupos funcionales específicos.

En definitiva, la interpretación espectral de las bandas de absorción obtenidas de los espectros NIR es muy compleja debido a la gran variedad de modos vibracionales de cada compuesto orgánico presente en una muestra. Esta complejidad es mayor si se analiza una matriz compleja constituida por multitud de moléculas de diferente naturaleza.

### **2.2.3 Instrumentación y modos de análisis**

El esquema que sigue el instrumento y sus componentes es muy sencillo y funciona de forma similar a otros espectrofotómetros (Figura 2.4), sin embargo, debido a la baja intensidad de las bandas NIR, se exige una mayor calidad respecto a ruido y estabilidad del instrumento. Todos los equipos espectroscópicos cuentan con cinco componentes básicos: fuente de energía radiante, sistema de dispersión de longitudes de onda (filtros o rendijas), zona de presentación de la muestra, detector y procesador de la señal. De esta forma, tras la incidencia de la radiación sobre la muestra, la radiación reflejada o transmitida a través de la muestra es recogida por los detectores y finalmente convertida en una señal eléctrica amplificable y convertida en una señal digital, que será almacenada y procesada por un ordenador (Shenk y Westerhaus, 1995a).



**Figura 2.4.** Esquema de un espectrofotómetro con sistema monocromador.

- I. **Fuente de radiación:** se distinguen dos tipos, térmicas y no térmicas. Las primeras cubren un amplio espectro, pero pueden calentar la muestra, las más utilizadas en espectroscopía NIR son las lámparas halógenas de tungsteno por su buen funcionamiento, coste y robustez. Las lámparas no térmicas emiten radiación en un rango estrecho de longitudes de onda, los más típicos son los diodos emisores de luz tipo LED (*Light-Emitting Diode*) o láser.
  
- II. **Selector de longitudes de onda:** A excepción de 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 descompone 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. Se pueden diferenciar dos grandes grupos de instrumentos NIRS, en función del tipo de dispositivo utilizado para la selección de la radiación: equipos de filtros e instrumentos monocromadores (Davies, 1999; Barton, 2002). Ambos equipos se distinguen en el número de longitudes de onda que son capaces de obtener a partir de la radiación emitida por la fuente de energía radiante. En la Tabla 2.4 se muestran los distintos sistemas de selección de longitudes de onda.
  - Los equipos de filtros llevan acoplado un sistema compuesto por un número de filtros determinado (de 5 a 20). Cada filtro permite seleccionar tan solo un pequeño rango de longitudes de onda de 10 a 20 nm de amplitud, partiendo de la radiación procedente de la lámpara.
  - Los sistemas monocromadores permiten obtener un rango continuo de longitudes de onda en toda la región NIRS. Estos instrumentos son

actualmente los más utilizados, ya que aportan mayor información espectral que los sistemas de filtros (Davies, 1999; Barton, 2002). Se trata de una red de difracción móvil, formada por materiales ópticos reflectantes en cuya superficie se encuentran numerosos surcos que separan espacialmente la radiación incidente policromática en longitudes de onda monocromáticas discretas.

- Las nuevas tecnologías han permitido la creación de nuevos instrumentos que incorporan dispositivos dispersivos de selección de longitud de onda, como son los ETF o filtros sintonizables eléctricamente (*Electronically Tuneable Filter*) y los filtros lineales variables o LVF (*Linear Variable Filter*), con el objetivo de separar espacialmente o temporalmente la luz policromática en longitudes de onda monocromática.

Los LVF se basan en un sustrato cubierto por capas orientadas en una dirección, donde cada una filtra una determinada longitud de onda, mientras que los ETF (*Electronica Tuneable Filters*) utilizan distintas tecnologías en función del modo de selección de la longitud de onda: filtros acústico-ópticos modulables AOTF (*Acuosto-Optical Tuneable Filters*); filtros de líquido de cristal sintonizables LCTF (*Liquid Crystal Tuneable Filters*) y filtros ópticos modulables basados en sistemas micro-electro-mecánicos MEMS (*Micro-Electro-Mechanical Systems*).

**Tabla 2.4.** Sistemas de selección de longitudes de onda.

<b>Selector de longitud de onda</b>	
Prismas	
Rejilla	
Red de difracción	
Filtros sintonizables eléctricamente (ETF)	Filtros acústicos ópticos (AOTF)
	Filtros de líquidos de cristal sintonizables (LCTF)
	Filtros basados en sistemas micro-electro-mecánicos (MEMS)
Filtros lineales variables (LVF)	

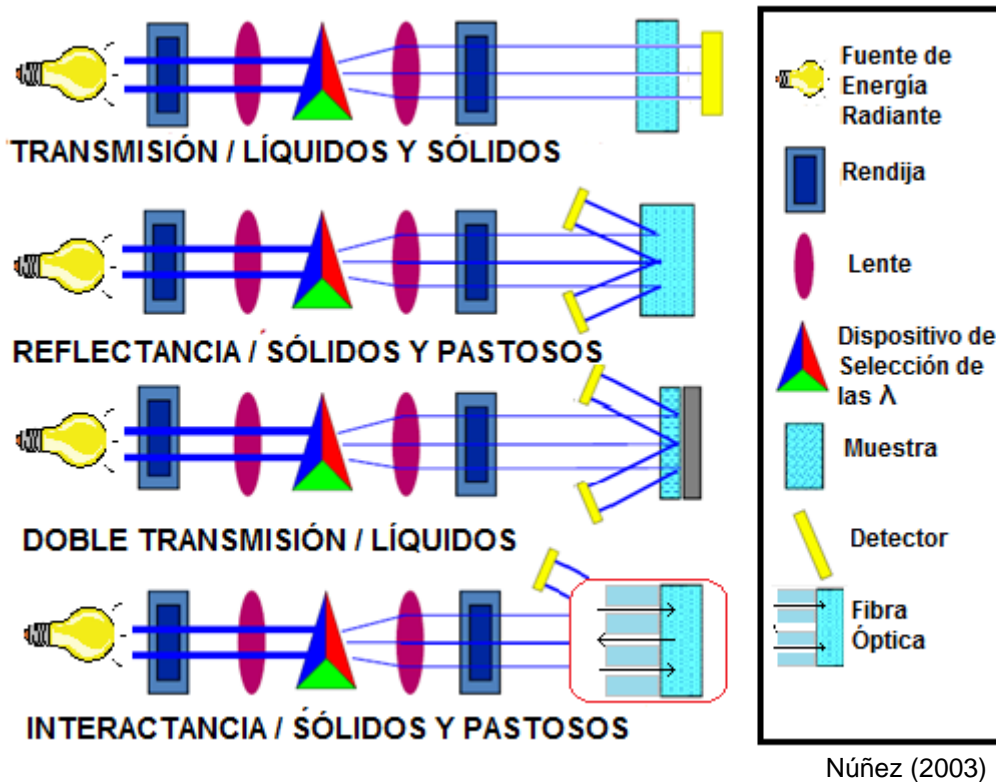
- III. **Zona de presentación de la muestra:** o lugar donde se produce la interacción entre la radiación NIR y el producto analizado. El compartimiento de presentación de muestra es la parte del espectrofotómetro que más depende de la aplicación. La espectroscopía NIR tiene una gran versatilidad y adaptabilidad 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* (muy sensibles y de gran tamaño), *on-line* (situados en el lugar de predicción) y *on-site* (insertados en el lugar de producción) para múltiples tipos de muestra, 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.
- IV. **Detector:** Los detectores empleados en espectroscopía NIR se elaboran con materiales semiconductores como InGaAs (Indio, Galio y Arsénico), InAs (Indio y Arsénico), InSb (Indio y Antimonio), PbS (Plomo y Azufre) o Si (Silicio). El material más utilizado en la región NIR 1.100- 2.500 nm es el PbS, mientras que en la región más próxima al visible (780-1100 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 -40°C (Stark y Luchter, 2004). En la Tabla 2.5. se detallan los detectores clásicos empleados en espectroscopía NIR (Workman *et al.*, 2003).

**Tabla 2.5.** Detectores clásicos empleados en espectroscopía NIR.

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

Workman *et al.* (2003)

La situación del detector con respecto a la muestra determina si el instrumento realizará medidas en reflectancia (detector situado en el mismo plano que la muestra) o en transmitancia (detector situado detrás de la muestra) (Shenk y Westerhaus, 1995a). En la Figura 2.5 se muestran los diferentes modos de análisis NIRS.



**Figura 2.5.** Esquema de los modos de análisis NIRS de transmitancia, reflectancia, doble transmitancia e interactancia.

Existen tres modos de análisis NIRS tradicionales reflectancia, transmitancia, transflectancia (Shenk y Westerhaus, 1995a) y un cuarto modo de análisis de nueva generación, la interactancia, que utiliza fibra óptica (Kawano, 2002).

En el modo de análisis en reflectancia, el detector mide la reflectancia difusa o luz reflejada por la muestra irradiada y está situado delante de la muestra. Es utilizado principalmente para el análisis de muestras sólidas y semisólidas.



En la transmisión (productos líquidos) o transmitancia (productos sólidos) la radiación incidente atraviesa la muestra y es recogida por el detector situado en el lado opuesto a la fuente de energía radiante. Es frecuente utilizar este modo para el análisis de muestras en estado gaseoso, líquido, semilíquido y sólido. Cuando se trata de medidas en transmitancia, se habla del término transmisión difusa.

El modo de análisis en transflectancia o doble transmisión, tiene características del modo reflectancia y transmitancia, en el cual la radiación atraviesa la muestra, es reflejada por una superficie reflectante (normalmente oro o aluminio) de forma que se transmite de nuevo a lo largo de toda la muestra, para finalmente incidir sobre el detector en reflectancia (Osborne *et al.*, 1993; Shenk y Westerhaus, 1995b; Kawano, 2002).

La interactancia es un modo de análisis que utiliza fibra óptica y relativamente nuevo, fue desarrollada por Karl Norris para el análisis de tejido vegetal y humano (Kawano, 2002). La técnica se basa en hacer incidir la luz sobre una muestra y tan solo la radiación que se transmita a través de la muestra podrá ser detectada. Esta técnica tiene un tiempo mínimo de manipulación de muestra, ya que no es necesario llenar cubetas o cápsulas ni moler las muestras, además la presencia de fibra óptica supone una reducción de la relación señal/ruido, generando una disminución del rango espectral NIR hasta un máximo de 2200 nm, ya que a longitudes de onda superiores el ruido aumenta. Por último, esta modalidad permite obtener espectros directamente sobre las muestras a través de la sonda (Fernández y Garrido, 2000; Osborne *et al.*, 1993, Shenk y Westerhaus, 1995a).

Los modos de análisis NIR más recomendables para el desarrollo de aplicaciones *in-situ* en líneas de procesado o sensores remotos es la reflectancia e interactancia, debido a la forma de presentación de las muestras y sus características.

La absorción en el rango del espectro NIR es debida a propiedades físico-químicas del material de análisis, pero la dispersión de la luz incidente en la muestra está relacionada con las características estructurales o texturales tanto a nivel micro como macroscópico, en este sentido, las medidas de reflectancia o transmitancia estarían directamente relacionadas con los fenómenos dispersivos y absorptivos del material analizado.

- V. **Unidad de control del instrumento, adquisición y almacenamiento de datos e interacción con el usuario:** normalmente se trata de un microprocesador u ordenador que cuenta con un programa capaz de controlar las principales funciones del espectrofotómetro, traducir las intensidades detectadas en datos espectrales, como por ejemplo, absorbancia en función de la longitud de onda, y almacenar dichos datos. En cuanto al procesamiento de los mismos, existen diversos software de tratamiento de datos multivariantes. El usuario debe tener la precaución de guardar los datos en un formato compatible con el software de tratamiento de datos que vaya a utilizar, ya que actualmente no hay ningún protocolo estandarizado común a todos los fabricantes.

#### **2.2.4 Equipos NIR de reducido tamaño y portátiles**

Los instrumentos NIRS tradicionales de laboratorio (*at-line*) generalmente son equipos de mesa poco móviles, ocupan un gran espacio, 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. Sin embargo poseen altas prestaciones respecto a calidad espectral, rango de longitudes de onda o resolución (Schuler *et al.*, 2009). 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 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 funcionar como interfases entre el proceso o procesos de producción, minimizando la manipulación de muestra previo 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* surgen de forma paralela a los avances en otros campos como la telecomunicación, óptica y electrónica, permitiendo el desarrollo de nuevos dispositivos más versátiles, no móviles, compactos, robustos, ergonómicos, de tamaño reducido y más ligeros, además de bajo coste. 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, concretamente los filtros sintonizables eléctricamente (ETS). Estos dispositivos permiten diseñar instrumentos

múltiples capaces de trabajar simultáneamente con todas o, al menos la mitad de las longitudes de onda y un solo detector, generándose espectros de mayor calidad respecto a la relación señal/ruido (SNR, *Signal to Noise Ratio*). En la Tabla 2.6 se muestran algunos de los equipamientos NIRS portátiles y de laboratorio para el análisis de muestras líquidas.

**Tabla 2.6.** Equipos NIRS para aplicación en muestras líquidas.

Instrumento NIRS	Sistema de muestreo	Rango de longitud de onda (nm)	Adaptador para líquidos	
FOSS NIRSystems 6500	<i>at-line</i>	400-2500		
LabSpec 4 Standard-Res (Lab Analyzers)	<i>on-site</i>	350-2500		
microNIR SDJU	<i>on-site</i>	950-1650		
microPHAZIR™ (Polychromix)	<i>on-site</i>	1000-1800 1600-2400		

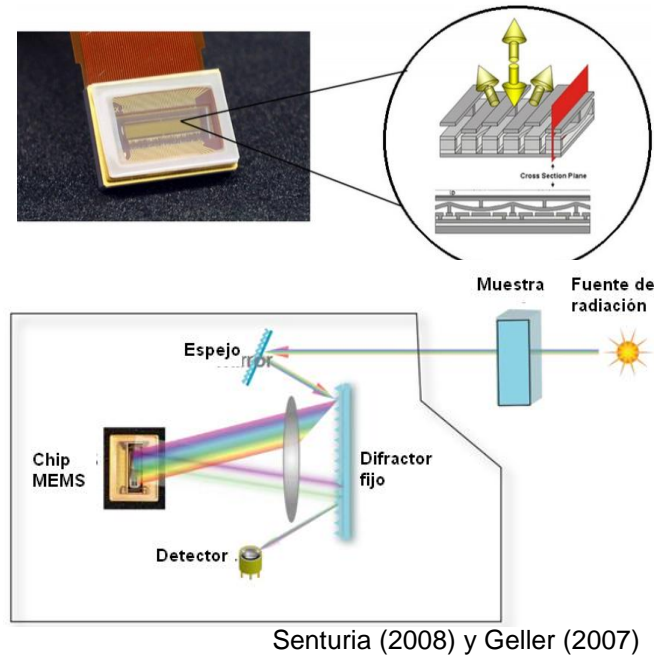
La incorporación de filtros ópticos basados en sistemas micro-electro-mecánicos (MEMS) a la espectroscopía ha sido la mejora más significativa en los últimos años, en cuanto al diseño de equipos NIR portátiles, prácticos de bajo coste y robustos. Estos equipos integran componentes mecánicos, electrónicos y eléctricos sobre una base de silicio en un rango de tamaño de milímetros a micrómetros, lo que ha permitido reducir el tamaño de los instrumentos NIRS (Middelhoek, 2000).

obstante la tecnología no sólo se ha limitado al diseño de equipos dispersivos en miniatura (marcas comerciales: MicroPhazir<sup>TM</sup>, TruProcess<sup>TM</sup> o Anavo<sup>TM</sup>), sino que se han incorporado a otros equipos del tipo interferómetro Frabry-Pérot o Transformada de Fourier (Schuler *et al.*, 2009). Estos filtros modulables eléctricamente aparecieron inicialmente en el mundo del plástico y, más recientemente en la inspección de productos farmacéuticos. Algunos de los equipos basados en esta tecnología son los que más auge han tenido en los últimos tiempos. Esta tecnología MEMS-NIR, 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 *et al.*, 2013).

Los interferómetros Fabry-Pérot son equipos en miniatura que incorporan un sistema MEMS capaz de controlar la distancia entre dos espejos reflectores situados de forma plana y paralela, uno de los cuales es móvil. La inclinación, rugosidad y curvatura de los espejos pueden suponer un factor de variación sobre la exactitud del instrumento (Schuler *et al.*, 2009).

Los equipos que incluyen Transformada de Fourier permiten convertir la señales dependientes del tiempo en función de la longitud de onda. Estos instrumentos incorporan tecnología MEMS y micro-óptica, denominándose sistemas MOEMS (*Micro-Opto-Electro-Mechanical Systems*). Se basa en el acoplamiento de sistemas micro-mecánicos controlados eléctricamente con micro-espejos que funcionan como una red de difracción.

Actualmente los equipos MEMS más versátiles son los instrumentos de medida donde la señal es función del tiempo y el espacio, esto es debido a que el diseño instrumental incluye una red de difracción fija que separa espacialmente las longitudes de onda y un chip MEMS que forma una red de microelementos de difracción (píxeles) controlados eléctricamente, hacia donde llega cada longitud de onda (Senturia, 2008). Cada pixel puede ser bloqueado individualmente siguiendo un código temporal secuencial basado en el algoritmo de Hadamard (transformada DTS). Este algoritmo es capaz de convertir la señal en función del tiempo, dada la secuencia temporal de activación/desactivación de los píxeles, en información espectral (absorbancia frente a longitud de onda) (Day *et al.*, 2005).



**Figura 2.6.** Rejilla de difracción basada en un sistema MEMS (arriba). Esquema de un diseño instrumental post-dispersivo que incorpora tecnología MEMS (abajo).

Como se ha mencionado, este tipo de equipos MEMS utilizan un código temporal secuencial donde la mitad de los píxeles se encuentran activados y la otra mitad desactivados, permitiendo que cada longitud de onda alcance el detector un 50% de las veces cuando inciden en los píxeles activos, resultando el sistema más eficiente y con una señal mayor y un ratio señal/ruido (SNR) más alto (Geller, 2006). Además al tratarse de sistemas *multiplex* la obtención de medias es más rápida y el SNR mayor. En definitiva, el algoritmo DTS de Hadamard permite usar un solo detector, reduciendo el coste del instrumento, eliminación del ruido, resultado de la utilización de varios detectores simultáneamente, el detector es incapaz de detectar luz directa, tan sólo percibe las longitudes de onda con la secuencia adecuada procedente de los píxeles activos del chip MEMS (Day *et al.*, 2005) y no existen partes móviles (Schuler *et al.*, 2009). No obstante hay pérdida de resolución óptica y rango espectral.

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 y de tamaño reducido, no obstante, este no ha sido el único factor, sino también los avances en tecnología óptica y fuentes de radiación o energía, que permiten que todos los elementos sean incorporados a un equipo de

dimensiones reducidas con autonomía para realizar medias que generen datos de calidad.

Estos instrumentos deben contener actuaciones de corrección de posibles variaciones de intensidad de energía de la fuente de radiación para adaptarse a distintas condiciones de luz reflejada durante la lectura de las muestras e incluir estándares de calibración de longitudes de onda para evitar errores o desvíos de la medida, con el fin de obtener instrumentos estables y fiables. No obstante, hay que tener en cuenta un equilibrio en cuanto a la reducción de tamaño de los sensores y el SNR del equipo para que la aplicación tenga éxito (Tadigadapa y Mateki, 2009). Por esta razón es imprescindible evaluar cada instrumento en función de la aplicación a desarrollar para analizar su reproducibilidad, exactitud, precisión y adaptabilidad.

El desarrollo de nuevas aplicaciones hardware y software han permitido mejorar los equipos respecto a rapidez y precisión en la medida de datos espectrales y el tratamiento matemático de estos mediante configuración automática de los dispositivos (*plug and play*). La miniaturización de los procesadores ha permitido mayor portabilidad de los instrumentos mediante la utilización de tecnologías de información remota o ICT (*Information and Communication Technologies*), sistemas móviles universales de telecomunicación o UMTS (*Universal Mobile Telecommunications Systems*), comunicaciones sin cables, como Wi-Fi o *Wireless* o tecnologías de radio frecuencia del tipo Bluetooth.

#### **2.2.5 Análisis NIRS: Establecimiento de las bases metodológicas para la recogida de información espectral NIR.**

La tecnología NIRS, matemáticamente, aporta una colección de datos que porta información tanto física como química sobre la materia analizada. No obstante, el espectro NIRS es una matriz compleja de datos consecuencia de la combinación de distintos compuestos y propiedades de la muestra analizada, por esta razón es fundamental correlacionar los parámetros de interés analizados por métodos de referencia con la información espectral medida mediante distintos tratamientos matemáticos y estadísticos (Martens y Martens, 2001). Este tipo de tratamientos se denomina tradicionalmente quimiometría y se aplica a modelos de calibración multivariantes.

El desarrollo de una metodología NIRS lleva asociado una serie de etapas claves:

1. Recogida de la información espectral.
2. Selección de muestras representativas
3. Cuantificación de los parámetros a evaluar mediante un procedimiento de referencia.

En el presente trabajo se persigue la puesta a punto de la recogida de la información espectral NIRS en muestras de leche de vaca, que vendrá influenciada por las características del producto a analizar y su interacción con el equipamiento NIRS portátil empleado (microPHAZIR...).

La evaluación de la calidad de los espectros recogidos en el equipo NIRS es un pilar básico en el desarrollo de la metodología. Es por ello que será necesario:

- Establecer criterios de comparación de los espectros obtenidos entre el equipamiento NIRS portátil (microPHAZIR) y de referencia (FOSS NIRSystems 6500).
- Evaluar la repetibilidad/reproducibilidad de la señal espectral.
- Evaluar el efecto de los pretratamientos espectrales sobre los espectros recogidos.

### **2.2.6 Repetibilidad espectral**

Para la evaluación de la repetibilidad espectral se evaluará el estadístico Raíz Cuadrática Media o RMS (*Root Mean Square*), que es el valor medio de la raíz cuadrática de las diferencias entre espectros de una muestra analizados en el mismo instrumento para un número de longitudes de onda (Shenk y Westerhaus, 1995b y 1996). Este estadístico permite establecer un límite para evaluar la similitud espectral y suponer un espectro de buena calidad para un determinado instrumento y un modo de análisis y presentación de muestra (Martínez *et al.*, 1998).

Otro estadístico capaz de evaluar la similitud espectral entre muestras distintas de un mismo producto, muestras iguales analizadas con distintos equipos o analizar el nivel de ruido del instrumento de análisis es la desviación estándar o STD

### 2.2.7 Pretratamiento de la señal espectral

El pretratamiento de los datos espectrales permite minimizar o eliminar información redundante y no relevante, no linealidades y reducir el nivel de ruido de los datos espectrales. Existen múltiples técnicas de pretratamiento de datos espectrales: corrección de la línea de base, normalización, mejora de la señal o filtrado estadístico de la señal/ruido.

Los pretratamientos de datos espectrales más utilizados son:

- I. **Promedio de espectros.** Se promedian las señales analíticas de una misma muestra para reducir el ruido, considerado una variación instrumental aleatoria, con el objetivo de mejorar la relación señal/ruido.
- II. **Suavizado Espectral.** Este método es utilizado para reducir el ruido o incrementar la relación señal/ruido mediante un tratamiento matemático (Beebe *et al.*, 1998). Los métodos más utilizados son el de Savitzky-Golay (1964) y el de la Transformada de Fourier (Horlick, 1972). El método se basa en el cálculo de un valor central en torno al cual se desplazan las ventanas de puntos que contienen los datos espectrales.
- III. **Derivadas.** Esta técnica soluciona el solapamiento de bandas y los desplazamientos de la línea de base, uno de los problemas más típicos en la espectroscopía NIR. Se utilizan generalmente las dos primeras derivadas. La primera minimiza o elimina los desplazamientos de la línea de base y la segunda minimiza o elimina los desplazamientos de espectro que varían con la longitud de onda linealmente. Las técnicas más aplicadas son la de Savitzky-Golay (1964) y la de Norris y Williams (1984).

La dispersión de la radiación incidente es un factor que influye directamente sobre la selectividad de la información espectral NIR, este fenómeno se denomina *efecto scatter* (Burns y Ciurczak, 1992; Osborne, 1993; Bertrand y Dufour, 2000). Se debe a las características de las partículas que componen la muestra (textura, tamaño o geometría) (Iwamoto, 1991; Shenk *et al.*, 1992) y a variaciones del índice de refracción del material que interacciona con la radiación, lo cual genera numerosas variaciones no deseadas sobre los espectros NIR (Barnes *et al.*, 1989; Dhanoa *et al.*, 1994; Fernández-Ahumada y Garrido, 2008; Naes *et al.*, 2002). Estas variaciones no aportan información analítica sobre la muestra, por tanto es necesario aplicar tratamientos que separen esta información irrelevante de información que contenga datos espectrales relevantes. Estas correcciones se denominan tratamientos de



corrección de la dispersión de la radiación o *scatter* (Bertrand, 1993; Bertrand y Dufour, 2000). Algunos de los tratamientos más utilizados son:

- I. **SNV (*Standard normal variate*)**. Se aplica para muestras sólidas o líquidas densas, para corregir variaciones de la línea de base generadas por la dispersión de la radiación incidente (Barnes *et al.*, 1989). La técnica se basa en centrar cada uno de los espectros restando el valor medio de absorbancia a los valores individuales de absorbancia a cada longitud de onda en relación a la desviación estándar.

En numerosas referencias bibliográficas, SNV es también denominado como “autoescalado a variación 1”. Su cálculo matemático se realiza de acuerdo con las fórmulas indicadas por Fernández-Cabanás y Garrido-Varo (1999):

$$Y_{SNV,i} = \frac{Y_{\log(1/R),i} - \overline{Y_{\log(1/R)}}}{\sigma_{\log(1/R)}}$$

Donde  $Y_{NSV,i}$  representa el valor de absorbancia a una longitud de onda  $i$  corregido tras el tratamiento SNV,  $Y_{\log(1/R),i}$  es el valor de absorbancia original a una longitud de onda  $i$ ,  $\overline{Y_{\log(1/R)}}$  es el valor medio de los valores de absorbancia para todas las longitudes de onda y  $\sigma_{\log(1/R)}$  representa la desviación típica de los valores de absorbancia para todas las longitudes de onda.

Por el contrario, el pretratamiento SNVD realiza un ajuste polinomial de segundo orden entre los valores espectrales o absorbancias (variables dependientes) y las longitudes de onda (variables independientes). Con ello se corrigen las desviaciones de la línea base en el espectro. El cálculo matemático se realiza de acuerdo con la fórmula:

$$\hat{Y}_{\log(1/R),i} = A + B \cdot W + C \cdot W^2$$

$$Y_{SNVD,i} = Y_{\log(1/R),i} - \hat{Y}_{\log(1/R),i}$$

donde  $Y_{SNVD,i}$  es el valor de absorbancia a una longitud de onda  $i$  corregido tras el tratamiento SNVD,  $Y_{\log(1/R)}$  representa el valor estimado de  $Y_{\log(1/R),i}$

obtenido mediante una función  $W$  y  $W$  es el valor de longitud de onda considerado.

- II. **MSC (*Multiplicative scatter correction*)**. Se aplica para reducir los efectos acumulados del *efecto scattering*. Este tratamiento corrige desplazamientos entre muestras restando a los espectros individuales los parámetros de la recta (calculada por el método de mínimos cuadrados) representando los valores de absorbancia en un intervalo de longitud de onda donde el analito no es capaz de absorber la energía incidente frente a valores de absorbancia de un espectro de referencia.
  
- III. **SNVD (*Standard normal variate and detrending*)**. Esta técnica incluye la aplicación de dos tratamientos de forma conjunta, SNV y *detrending*, elimina los efectos *offset* de la línea de base y la curvatura de los espectros generados por el *efecto scatter*. El cálculo del SNVD se resta a cada uno de los espectros individuales, generándose espectros con tratamiento SNVD.

### 2.2.8 Ventajas e inconvenientes de la tecnología NIR

Por sus buenas características, la tecnología NIRS se puede considerar una técnica fiable para desarrollar múltiples aplicaciones en diversos campos.

- Análisis rápido, de minutos a milisegundos.
- Análisis simple, con escasa o nula preparación de la muestra
- No invasiva, análisis sin contacto con la muestra o con la superficie de la misma.
- No destructiva. La región NIR (770-2500 nm) trabaja en niveles inferiores (40-20 Kcal/mol) a los necesarios para romper enlaces covalentes (50-130 Kcal/mol).
- Multi-producto. Es decir, la misma tecnología puede ser empleada para distintos productos.
- Multi-parámetro. Un espectro NIR puede contener múltiple información físico-química para una misma medida.
- Respetuosa medioambientalmente, ya que no es necesario el uso de agentes químicos y no se generan residuos.
- Reducido coste analítico por muestra en análisis rutinarios

- Diseños instrumentales versátiles y flexibles. Las nuevas tecnologías permiten diseñar instrumentos NIRS adaptados a aplicaciones concretas, miniaturizables, portátiles y con conexión inalámbrica.

No obstante, existen algunos inconvenientes que pueden ser un problema para la implantación de la tecnología NIRS:

- Método analítico secundario. Generalmente es necesario un análisis de referencia por vía húmeda para desarrollar los modelos de calibración.
- No es un método universal. Los modelos desarrollados sólo son aplicables a muestras bien definidas o similares a las muestras de calibración.
- Inversión media-alta en instrumentación.
- Coste medio-elevado del desarrollo de modelos multivariantes.
- Es necesario diseñar y ejecutar un proyecto de innovación/implantación para incorporar la tecnología en la empresa que puede durar de 2 a 3 años.
- La transferencia de modelos desarrollados de un instrumento a otro es complejo.

### **2.2.9 Métodos analíticos tradicionales de leche empleados en el sector lácteo.**

La industria láctea y los laboratorios oficiales y privados que prestan servicios al sector de industrias lácteas utilizan métodos basados en el infrarrojo medio y otros medios automatizados de un elevado coste (ver apartado estudio económico).

El Milkoscan permite llevar a cabo análisis de grasa, proteína, lactosa, extracto seco, sólidos no grasos, acidez total, FFA, FPD, ácido cítrico, urea... y posibles adulteraciones de la leche como mezclas de leches o adición de agua. En la actualidad los laboratorios del control lechero, para su rutina de análisis hacen uso de un equipamiento de Transformada de Fourier que trabaja en infrarrojo medio ( $1000-3000\text{ cm}^{-1}$ ) para el control de calidad de las muestras de leche (Figura 2.7) Estos equipos poseen una elevada capacidad de análisis y cumplen los requisitos establecidos en las normas de control lechero vigente (CE nº 882/2004 de 29 de Abril).



**Figura 2.7.**Equipo para análisis de leche, CombiFoss<sup>TM</sup> FT+, combina el instrumento MilkoScan FT y Fossomatic FC.

Recuento de células somáticas (Fossomatic 5000). Se emplea el método de citometría de flujo, que consiste en inyectar la mezcla de leche ya teñida en el interior de un capilar situado en la célula de lectura y por el que está fluyendo un caudal portador. El diámetro del cordón de líquido que forma la muestra en el centro de la corriente de líquido portador, está calibrado y enfocado, de forma que la radiación azul que produce la lámpara del microscopio va a incidir directamente sobre células individuales pasando por el centro de la corriente portadora. El colorante específico (Bromuro de Etidio) que se añade a la muestra de leche, tiene la propiedad de teñir preferentemente el núcleo de las células (su ADN) y de emitir una fuerte fluorescencia roja al ser excitado por la radiación del microscopio (luz azul). La emisión fluorescente es captada por el fotomultiplicador y será la base para la estimación del número de células somáticas presentes en la muestra.

Estos instrumentos de rutina están implantados en más de 7000 puestos de industrias lácteas y laboratorios de análisis de leche, además permiten obtener resultados para los componentes principales y adulteraciones en la leche de un modo rápido y preciso (90 segundos por muestra), lo que permite una reducción de los costes de producción, sin embargo estos equipos son muy sensibles tienen gran tamaño, son poco móviles y de alto coste, por tanto su uso está restringido.

Desde el descubrimiento de la espectroscopía NIR se han hecho multitud de estudios. Si accedemos a sitio web de búsqueda de artículos científicos como es *Scirus* e incluimos en el motor de búsqueda “*Quality and safety by NIRS*” aparecen unos 223.755 resultados hasta 2013. Algunas de las aplicaciones de la tecnología NIRS más empleadas son: análisis de medicamentos importados; control del estado de maduración de frutas y hortalizas antes, durante y tras la recolección *in-situ*; análisis de los parámetros físico-químicos y control rutinario de calidad de carne *in-situ*

y *on-line*, trazabilidad alimentaria y geográfica; inocuidad de pienso para ganado; control durante el procesado de alimentos etc.. Respecto a leche, se han realizado numerosas publicaciones, sin embargo todas están limitadas a estudios de investigación y ninguno se centra en la aplicación de la tecnología NIR para el análisis a nivel de industria o como método de control de calidad.

### **2.3 El uso de la espectroscopía de infrarrojo cercano en leche**

La leche cruda es un líquido opaco turbio que dispersa la luz en un alto grado debido a la presencia de glóbulos de grasa de leche y micelas de caseína en suspensión. Esto hace que sea una matriz muy problemática para su estudio por espectroscopía NIR. Los trabajos que describen la aplicación de NIR a la leche líquida se pueden dividir en varias áreas que incluyen: la determinación de la composición de la leche, la autenticación de los regímenes de alimentación de la vaca y origen geográfico de la leche, incluyendo la clasificación de la leche, la robustez de calibración, aplicaciones industriales y la medición en la leche de su contenido microbiológico.

En 1957 (Goulden) se publicó el primer estudio sobre la aplicación de la tecnología NIR en leche desecada por reflectancia difusa. En el trabajo se identificaron las bandas para los constituyentes más importantes (caseína, grasa y lactosa). Este mismo autor intentó recoger espectros en transmitancia para leche en polvo, no obstante los resultados fueron mejores para la modalidad en reflectancia.

La aplicabilidad de la tecnología NIRS en el análisis de leche entera (cruda y pasteurizada), leche desnatada, leche en polvo, nata, mantequilla y requesón fue analizada por Weaver (1984). En este estudio se empleó como instrumento un Technicon Infralyzer 400 y como método de calibración RLM (regresión lineal múltiple) para la determinación de grasa y sólidos totales e leche entera. No obstante los resultados no fueron satisfactorios, debido principalmente al bajo número muestral.

Más tarde otros autores (Sato *et al.*, 1987) desarrollaron calibraciones por RLM para la determinación de grasa, proteínas, lactosa, sólidos totales y caseína en leche cruda de vacas, utilizando un equipo Neotec 6350 en modo transreflectancia en el rango de longitudes de onda de 1100 a 2500 nm. A pesar de los bajos errores de calibración obtenidos en los análisis de determinación de caseína, los autores destacan la necesidad de tener que homogeneizar e inyectar las muestras de leche antes de realizar los análisis.

Estos trabajos previos facilitaron la aplicación de nuevos métodos de análisis y desarrollo de calibraciones predictivas. De Boever *et al.* (1990) desarrollaron calibraciones para determinar proteína y grasa en leche cruda de vaca, las muestras de leche fueron previamente calentadas a 40°C y bombeadas a través de un homogeneizador a una “*dairy cell*” o cápsula de productos lácteos con control de temperatura antes de ser analizadas con un instrumento NIR, en este caso Technicon 500 en el rango 1100-2500 nm. Los resultados fueron satisfactorios, probablemente debido al número muestral utilizado y al control de temperatura durante los análisis.

Saranwong *et al.* (2008) desarrollaron un sistema NIR compacto para el análisis de la composición de la leche (grasa, proteínas, lactosa y sólidos totales) y la cuantificación de bacterias aerobias totales. Realizaron un estudio de espectroscopía NIR en modo transmisión para muestras de leche a 40°C en rangos de 400 a 1100 nm y de 600 a 1000 nm, respectivamente. Se obtuvieron valores de coeficientes de determinación de la calibración ( $R^2$ ) para proteína y grasa de 0,99, mientras que el recuento de bacterias totales presentó valores inferiores, en torno a 0,83, sin embargo el trabajo confirmó la importancia de algunos metabolitos resultado de la actividad bacteriana, como el ácido láctico, urea, lactosa o proteínas, en la cuantificación de bacterias por NIR.

La espectroscopía NIR también se ha utilizado para evaluar diferentes tipos de leche, por ejemplo cabra, humana, etc..Drackova *et al.* (2008), realizaron medidas en el modo transflectancia en el rango de 1000 a 2500 nm aplicando el tratamiento Transformada de Fourier para determinar la grasa, proteína, lactosa, sólidos totales, sólidos no grasos, punto de congelación, acidez titulable y predicciones de pH utilizando un conjunto de 60 muestras de leche de cabra.

Corvaglia *et al.* (2008) utilizó un conjunto de 124 muestras de leche humana para el análisis en reflectancia por espectroscopía NIR, los resultados obtenidos fueron satisfactorios frente a las pruebas de referencia.

Múltiples trabajos publicados hacen referencia a la importancia de la aplicabilidad de la tecnología NIRS a nivel de explotación ganadera. Tsenkova *et al.* (1995) investigó la viabilidad de la utilización de esta tecnología en la detección de mamitis o alto contenido de células somáticas en vacas individuales. En sus estudios utilizó un equipo NIRS PSCO 6250 en modo transmitancia con una cubeta de paso óptico de 4 mm en la región 680-1235 nm. Como métodos de referencia se utilizaron las medidas de los equipos NIRS Milkoscan y Fossomatic (Foss-Electric A/S Hillerod,

DK). Los datos se trataron con segunda derivada y presentaron valores de  $R^2$  en torno a 0,53 y 0,74 para los constituyentes mayoritarios de la leche (grasa, proteína y sólidos totales). Con esta metodología, no fue posible cuantificar el nivel de células somáticas presentes, pero si es posible clasificar la leche en función de esta variable y detectar mamitis de forma precoz y comenzar los tratamientos necesarios.

En 2011, un grupo de investigación (Aernouts *et al.*, 2011) evaluó el potencial de la espectroscopía NIR para predecir el contenido en grasa, proteína y lactosa en leche cruda *on-line* durante el ordeño de bovinos. Durante los experimentos se tuvo especial cuidado en el manejo y medición de las muestras, donde se señaló la importancia de lograr una emulsión homogénea. Los datos de reflectancia en el rango de 1000 a 1700 nm presentaron un error aceptable para grasa. Estos resultados permitieron corroborar la hipótesis de que existía un efecto combinado de absorción y dispersión de la luz incidente por los glóbulos de grasa para este rango espectral. En este trabajo también se encontraron altos coeficientes de los vectores de regresión PLS (*Partial Least Squares*), los cuales se correlacionaron con las vibraciones de los triglicéridos. La transmisión se evaluó en el rango de 1000 a 2500 nm y los resultados fueron similares a los anteriores para la grasa, mientras que los de proteína presentaron valores muy dispares. El principal inconveniente del trabajo se debía a problemas de medida en transmisión, debido probablemente al limitado paso óptico de la celda de análisis (1 mm) en el rango de 1000 a 2500 y la alta absorción de los glóbulos de grasa.

La determinación de la composición de ácidos grasos mediante espectroscopia en reflectancia también ha sido evaluada por Coppa *et al.* (2010) que utilizó un rango de longitudes de onda de 700 a 2500 nm para predecir una serie de grupos de ácidos grasos (incluyendo ácidos grasos saturados, ácidos grasos monoinsaturados, ácidos grasos poliinsaturados, ácidos grasos insaturados y ácido linoleico conjugado), así como ácidos grasos de leche individual cuando éstos se encontraban presentes a altas concentraciones. En el trabajo se evaluaron muestras de leche líquida y secada en horno. Los valores fueron mejores para las secadas. Finalmente se observaron correlaciones significativas positivas entre algunos ácidos grasos, mientras que las predicciones para otros ácidos grasos parecían estar basadas únicamente en absorbancias espectrales específicas.

En los últimos cinco años, la creciente demanda de los consumidores por el conocimiento sobre la calidad y las condiciones de producción de los productos alimenticios ha llevado a los proveedores a mejorar la información disponible. Un

aspecto importante sobre este tema es la autenticación del origen geográfico y la dieta de las vacas del que procede la leche. Andueza *et al.* (2010) fueron capaces de distinguir con éxito la leche de vacas alimentadas con ensilado de maíz, frente a la leche de vacas alimentadas con pasto, mediante análisis de muestras de leche desecada por NIR, sin embargo la capacidad de distinguir el origen geográfico no fue tan clara.

Siguiendo una sistemática similar (Coppa *et al.*, 2012) analizaron leches agrícolas a granel de 486 granjas en Francia y en el noroeste de Italia, con el objetivo de correlacionar espectros NIR con el sistema de alimentación de las vacas, principalmente forraje. Los resultados mostraron buena capacidad para distinguir la leche de vacas alimentadas con pastos o forrajes conservados (éxito de predicción superior al 90 %). La fuerte influencia de la dieta sobre la composición de la leche se observó como una característica ligada a la capacidad de la espectroscopía NIR para distinguir estos tipos de leche en las granjas. La amplia gama de tipos de muestras analizadas sugiere que este estudio proporcionó una evaluación realista del potencial de la espectroscopía NIR para la distinción de leche procedente de vacas alimentadas de forma diferente.

En un área relacionada, se evaluó la diferencia entre la leche orgánica y la producida por métodos convencionales (Aulrich y Molquentin, 2009). La característica principal de este trabajo fue la correlación de ácidos grasos específicos en reflectancia difusa para muestras de leche líquida en el rango espectral de 1000 a 2500 nm. Los resultados sugirieron que el NIR tenía alto potencial para ser utilizado como un sistema de cribado comercial para las leches de este tipo.

La medida de forma fiable de leche líquida por NIR supone un reto, debido a esto, en los últimos años ha habido un gran número de artículos dedicados a la mejora de la robustez de los modelos de calibración utilizados en esta técnica. En una serie de trabajos publicados, Melfsen *et al.* (2012abc) han evaluado protocolos de calibración y corrección de dispersión para la predicción de grasa *on-line* de proteína, lactosa y urea en grandes cantidades para leches líquidas individuales usando un espectrómetro de conjunto de diodos en el rango de 851 a 1649 nm por el modo de análisis en reflectancia difusa. Los resultados presentaron los mejores resultados para grasa, seguido de proteína y lactosa. Los valores obtenidos se correlacionaron bien con el método de referencia. No obstante este trabajo podría estar influenciado por conjuntos pequeños e inadecuados de validación.



Aulrich and Molkentin (2009) presentaron un excelente resumen histórico sobre el rendimiento predictivo NIR en leches líquidas. Se investigó la influencia de las diferencias en los espectros de la grasa de leche debido a diferencias de distribución de tamaño de los glóbulos entre animales individuales y se encontró que estas influencias podrían ser corregidas mediante preprocesamiento matemático NIR y mejorar significativamente la precisión para los modelos predictivos de proteína, lactosa y urea. Sobre este tema, Peng *et al.* (2009) utilizaron una combinación de algoritmos, previamente desarrollados, para proponer un nuevo método combinado para mejorar la robustez de calibración ante la posible influencia de la temperatura en los análisis.

Sobre la contribución de la dispersión de la luz en la leche líquida cruda, Cattaneo *et al.* (2009) evaluaron un conjunto de 150 muestras de leche procedentes de animales individuales ordeñados en diferentes momentos y en diferentes días. Encontraron que la leche con diferentes niveles de grasa se comportaba de manera muy diferente con respecto a la ley de Lambert-Beer, debido al efecto dispersivo de los distintos tamaños de los glóbulos de grasa de la leche en el rango de 1000 a 2500 nm. Para eliminar este efecto y mejorar el rendimiento predictivo de los modelos de calibración de grasa y otros componentes se aplicó el algoritmo *scatter correction* (EMSC, del inglés *extended multiplicative scatter correction*), ya que la dispersión supone hasta un 50% de la absorbancia total, en particular en las bandas de absorción: 1454 nm, 1894 nm, 1953 nm, 2048 nm, 2174 nm, 2230 nm y 2100 nm.

Los mismos autores (Cattaneo *et al.*, 2010) también evaluaron la capacidad de la espectroscopía NIR para medir proteínas específicas en leches de vacas individuales. Los resultados confirmaron satisfactoriamente la relación entre los análisis de referencia y los valores de predicción NIR para proteínas  $\alpha$ -S1 y  $\beta$ -caseína. La correlación más alta fue para  $\alpha$ -S1 debido a su estructura primaria característica (hidrófila) y una distribución adecuada en la gama de la muestra analizadas.

El precio de la leche por lo general es fijado por las empresas que compran la leche a las ganaderías, este valor depende principalmente del contenido en proteína grasa de la leche. Chen *et al.* (1994) determinaron cuantitativamente la composición físico-química (grasa, proteínas, sólidos totales...) de la leche mediante el análisis NIRS en modo transmisión para estimar el precio de la misma. Durante los ensayos se utilizó un equipo FOSS NIRSystems 6500, donde se aplicó el estadístico RLM. Los resultados presentaron valores de  $r$  superiores a 0,9, por consiguiente no se

encontraron diferencias entre el precio de la leche mediante predicción por NIRS y el obtenido por el método físico-químico de análisis tradicional.

Por su naturaleza, los instrumentos NIR portátiles tienen un alto potencial para el análisis y la medida NIR de leche líquida en lugares problemáticos como son las explotaciones. Cao *et al.* (2010) desarrollaron métodos de análisis de bajo coste basados en tecnología NIR en el rango 700-1100 nm para la predicción de grasa, proteínas y lactosa con una cubeta de 5 mm. Kalinin y Krasheninnikov (2008) utilizaron un instrumento NIR portátil que trabajaba en el rango de longitud de onda de 800 a 1100 nm para medir el contenido en grasa, proteína y lactosa en tubos de 12 mm de diámetro. Los datos predictivos para el contenido en grasa y proteínas fueron favorables.

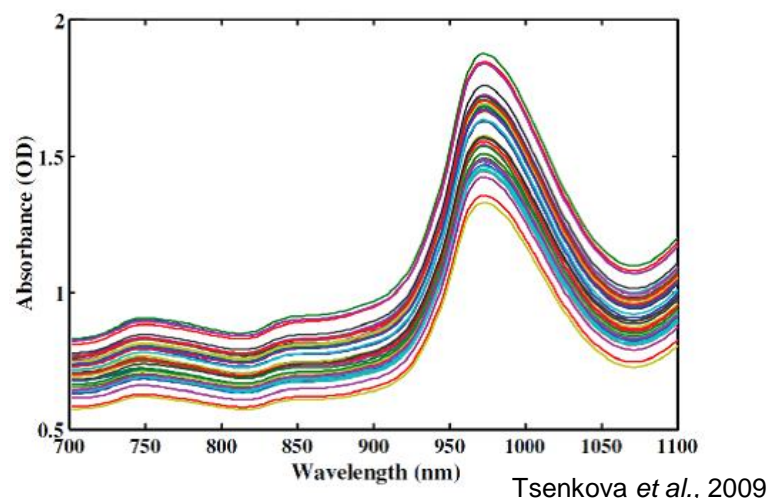
Las aplicaciones industriales de la espectroscopía NIR en el análisis de leche líquida se han centrado en la detección y seguimiento de la coagulación de la leche y los parámetros de calidad de la leche. Lyndgaard *et al.* (2012) evaluaron espectros de reflectancia en el rango 1000-2500 nm y encontraron que, para modelar eficazmente todo el proceso de coagulación de la leche a tiempo real, se requieren dos modelos diferentes pero relacionados.

Leitner *et al.* (2011) utilizaron un enfoque diferente, combinaron la región visible y NIR para evaluar el potencial predictivo de esta tecnología sobre la coagulación de la leche. Al-Qadiri *et al.* (2008) realizaron numerosos estudios en un rango de longitudes de onda similar. Evaluaron la propensión de la leche a la descomposición a diferentes temperaturas. En este estudio se desarrollaron modelos predictivos que se correlacionaron con los cambios medidos en el pH de la leche y el recuento bacteriano real, aunque no se estudiaron los cambios bioquímicos específicos en la leche que dieron origen a estas correlaciones.

Unos años antes, Hall y De Thomas (1993) ya emplearon un equipo FOSS NIRSystems 6500 (400-1100 nm) con una sonda de fibra óptica que fue sumergida en un flujo de leche para aportar información a tiempo real sobre el contenido en grasa de esta. Los resultados de este estudio fueron un alto valor de  $r$  en las calibraciones de regresión LM y segunda derivada, no obstante el número de muestras fue muy bajo. Asimopoulos y Pope (1994) utilizaron una sonda de fibra óptica, en esta ocasión en reflectancia, para el control *at-line* y *on-line* de la composición química de la leche. Usaron el instrumento de espectroscopía Quantum 1200 Plus y desarrollaron calibraciones PLS y aplicación de la primera derivada para los distintos componentes

de la leche (grasa, proteína y sólidos totales). Los resultados presentaron valores de correlación de 0,99, aunque el número de muestras fue muy limitado.

Tsenkova *et al.* (2000) realizaron un trabajo de calibración para la determinación del contenido de los componentes primarios en muestras de leche (grasa, proteína y lactosa) durante el ordeño. También se evaluaron las características individuales de la leche de cada animal. Durante el estudio se muestrearon tres animales cada quince días en el ordeño de mañana y de tarde durante seis meses, finalmente se obtuvieron 260 muestras. Las muestras se analizaron a una temperatura de 40°C con el equipo FOSS NIRSystemss 6500 (1100-2500 nm) y una cubeta de paso óptico 1 mm en transmisión. Para cada uno de los constituyentes se desarrolló un modelo de regresión por PLS. Los resultados respecto al método de referencia fueron muy precisos, no obstante los modelos desarrollados para las muestras individuales presentaron mejores estadísticos que los que se aplicaron a todo el colectivo, esto probablemente se debió a las diferencias existentes en la estructura física y composición química de la leche de cada animal de forma individual. Años más tarde (Tsenkova *et al.*, 2009), estos mismos autores desarrollaron con éxito un modelo basado en espectroscopía NIR en el rango de 700 a 1100 nm para el recuento de células somáticas (SCC) en muestras de leche de vaca individuales. Los resultados revelaron regiones en el espectro NIR importantes: 832 nm, 926 nm, 960 nm y 1004 nm. La correlación más alta y clara fue en la banda 960 nm, debida al segundo sobretono del agua (O-H) (figura 2.8). En esta misma línea, Richmond (1995) publicó una patente en Reino Unido donde describía detalladamente un método de análisis de grasas, proteína y leucocitos en leche mediante NIRS a tiempo real, junto con el equipo y el montaje de la sonda de medida en la línea de producción.



**Figura 2.8.** Espectros de leche cruda.

Una contribución interesante sobre el tema fue aportada por Miyazaki *et al.* (2010), que utilizaron las diferencias espectrales individuales de leches como un marcador para diferenciar cada animal mediante la combinación del análisis NIR y SIMCA (*Soft Independent Modelling of Class Analogy*). Se midieron más de 700 muestras en transreflectancia en el rango de longitudes de onda de 900 a 1700 nm. Los espectros se seleccionaron y derivaron cuidadosamente. Los resultados sugirieron que la dispersión de la luz por los glóbulos de grasa era útil para la identificación de animales individuales. La región NIR de 700 a 1098 nm, demostró ser la más útil para la clasificación.

Dos de los problemas más importantes del análisis NIRS de leche en transmisión son: la necesidad de utilizar cubetas de paso óptico estrecho, lo cual supone una dificultad para la limpieza de las mismas, además un paso óptico inadecuado podría ser razón de valores de absorbancia superiores a 2 (Shenk y Westerhaus, 1995b), por otro lado, se pueden dar problemas de repetibilidad espectral debido a variaciones de temperatura. Para solventar estos inconvenientes Chen *et al.* (1999) desarrollaron un método de análisis NIRS en modo transmisión para leche de vaca, utilizando tubos de ensayo como cápsulas de líquidos y un soporte especial para controlar la temperatura de las muestras en torno a 40°C durante los análisis, esto les permitió utilizar el análisis en el rango espectral de 700 a 1100 nm por un paso óptico de 12 mm. El problema de la suciedad de las cubetas se resolvió utilizando tubos desechables como cápsulas analíticas.

Datos menos reveladores fueron aportados por Laporte y Paquin (1999), quienes al realizar un estudio de análisis de los efectos del homogeneizado sobre la leche al observar que la homogeneización tenía efectos negativos en la determinación de grasa en la leche, no obstante autores posteriores realizaron análisis de muestras de leche en el rango 400-1100 nm a una temperatura de análisis de 25°C donde se evaluó la influencia de la homogeneización sobre los espectros de leche de muestras con contenido en grasa alto y bajo (Bogomolov *et al.*, 2013). Los resultados revelaron que existían diferencias claras entre los espectros en función del tiempo de homogeneización de las muestras.

El análisis de las leches líquidas por espectroscopía NIR supone un reto. Además existe poco consenso sobre la longitud de onda, la elección entre la reflectancia o transmisión y la preparación de la muestra y la presentación. Por otro lado, son pocos los trabajos que dejan claro el conocimiento sobre el impacto de algunos factores físicos sobre las muestras de leche como son la temperatura de la muestra, la homogeneización y el paso óptico de la luz a través de la muestra, los

cuales serían de gran utilidad. Otro tema en el que sería interesante profundizar es el impacto de la distribución del tamaño de los glóbulos de grasa de la leche y su relación con la dispersión de la luz en el rango de longitudes de onda en el infrarrojo cercano. En la Tabla 2.7. se muestra a modo de resumen la relación entre las bandas NIR y los componentes principales de la leche.

**Tabla 2.7.** Asociación de bandas NIR a componentes principales de la leche.

<b>Longitud de onda (nm)</b>	<b>Asociación</b>	<b>Referencias</b>
904, 1014, 1031, 1720, 1758, 2196, 2296, 2334	N-H, proteínas	Coppa <i>et al.</i> , 2012; Al-Qadiri <i>et al.</i> , 2008
2076, 2376	O-H, C-H, lípidos	Coppa <i>et al.</i> , 2012
400-700	Carotenoides	Coppa <i>et al.</i> , 2012
1454, 1984, 1953	O-H, agua	Cattaneo <i>et al.</i> , 2009
1953, 2048	O-H, N-H	Cattaneo <i>et al.</i> , 2009
782, 788, 908, 980, 1068	Alto contenido en células somáticas	Tsenkova <i>et al.</i> , 2009

Holroyd (2013)

No obstante, debido a las múltiples ventajas de la tecnología NIRS (rápida, pretratamiento de muestras mínimo, ausencia de reactivos...), es posible considerar la tecnología NIRS como un método analítico ideal para la determinación de los constituyentes primarios de la leche cruda, el control de la calidad y el análisis en todos los niveles de producción de las industrias lecheras.

### 3 METODOLOGÍA UTILIZADA

El objetivo principal de este trabajo es la puesta a punto y optimización de recogida de espectros de calidad en el infrarrojo cercano en leche líquida, mediante el uso de un instrumento MEMS-NIRS portátil de nueva generación que permita realizar análisis cualitativos y cuantitativos para su uso en rutina.

La industria láctea efectúa el pago y garantiza la calidad del producto acabado mediante pruebas químicas y físicas sobre el producto descargado en sus muelles por la cisterna de recogida. Algunas de las características analizadas son el contenido en grasa total, ácidos grasos, proteínas, lactosa, residuo seco, posibles adulteraciones (agua, fármacos...), pH, opacidad, etc. Las propiedades que determinan la calidad del producto dependen, a modo general, del conjunto de sus características, las cuales están rigurosamente reguladas por organismos nacionales.

En este campo de la aplicación de la tecnología NIR al control de calidad de leches, se han desarrollado diferentes metodologías NIR para cuantificar algunas de las características de la leche ampliamente descritas en el apartado 2.3.

En los apartados que siguen a continuación, se describen las características más relevantes de la metodología empleada para el desarrollo de un nuevo método de análisis *on-site* de leche cruda: las muestras analizadas y las formas de preparación, el registro de los espectros NIR y la optimización de las condiciones instrumentales.

A continuación se hace una descripción en detalle de las muestras utilizadas y su preparación en cada una de las etapas del estudio realizado.

#### 3.1 Descripción y origen de las muestras de leche

En el presente estudio se han empleado un total de 156 muestras de leche cruda, procedentes de 29 vacas del Programa de Investigación en Producción de Leche del SERIDA (Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario) ubicado en Villaviciosa (Asturias) durante el periodo de enero a abril de 2014. Esporádicamente se recolectaron muestras de vacas seleccionadas aleatoriamente de ganaderías de Asturias, procedentes de explotaciones lecheras de Gozón y Carreño, y se utilizó adicionalmente una muestra de leche comercial semidesnatada. Las muestras se agruparon en función de las fechas de ordeño o recogida. El tamaño de cada grupo muestral varió en cada análisis.

En la Tabla 3.1 se describen los diferentes conjuntos de muestras de leche utilizadas:

**Tabla 3.1.** Descripción y pretratamiento (homogeneización de la materia grasa y calentamiento a 40°C, filtración y/o dilución con agua) de los conjuntos de muestras de leche utilizados para la puesta a punto de la metodología NIRS *on-site*.

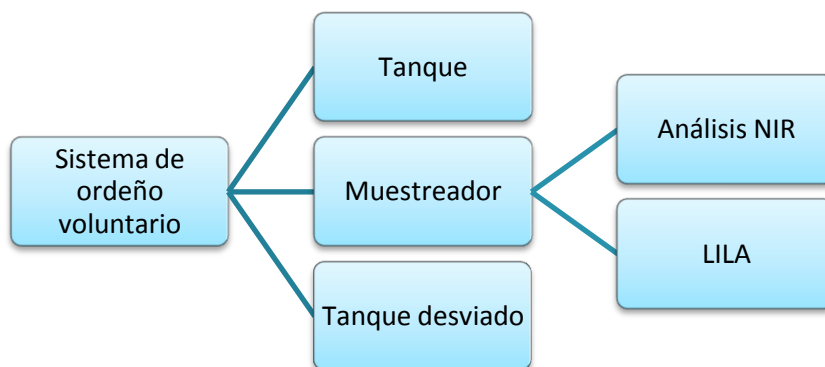
SET	N	PRETRATAMIENTO			Origen de la muestra
		Hom. y T <sup>a</sup> 40°C	Filt.	Dil. con agua	
1	1	SI	NO	SI	Muestra del tanque general SERIDA
2	24	SI	NO	SI	Ordeño de mañana de vacas individuales del SERIDA, seleccionadas por sus diferencias en el porcentaje de grasa de la leche
3	3	SI	NO	SI	Dos de ganaderías de Carreño y Gozón y una 3 <sup>a</sup> de leche semidesnatada comercial
4	20	SI	SI	SI	Ordeño de vacas individuales
5	6	SI	SI	SI	Ordeño de mañana de vacas individuales del SERIDA seleccionadas por sus diferencias en el porcentaje de grasa de la leche
6	23	SI	NO	NO	Ordeño de vacas individuales SERIDA
7	13	SI	NO	NO	Ordeño de vacas individuales SERIDA
8	4	SI	NO	NO	Muestras seleccionadas del Set 7
9	11	SI	NO	NO	Ordeño de vacas individuales SERIDA
10	23	SI	SI	SI	Ordeño de vacas individuales SERIDA, conteniendo el reservorio de muestreo conservante (azidol)
11	10	SI	NO	NO	Ordeño de vacas individuales SERIDA bajo un ensayo de alimentación controlada
12	1	SI	NO/SI	NO/SI	Muestras del tanque general SERIDA
13	1	SI	NO	NO	Muestras del tanque general SERIDA
14	10	SI	NO	NO	Ordeño de vacas individuales SERIDA
15	6	SI	NO	NO	Ordeño de mañana y tarde de 3 vacas individuales del SERIDA
ΣN: 156					

N: Número de muestras empleadas; Hom: Homogeneización; T<sup>a</sup>: Temperatura; Dil.: Dilución

En la recogida de muestras del rebaño experimental del SERIDA, se empleó un robot de ordeño automático (AMS, *Automatic Milking System*, DeLaval) (ver Figura 3.1). Este equipo identifica el número de vaca que va a ordeñar, a continuación y de forma automática ordeña la vaca. La leche se extrae de la ubre y pasa por un sensor que detecta parámetros de calidad: densidad óptica (color) y conductividad eléctrica (presencia de células somáticas); la leche que se encuentra fuera del límite de calidad es desviada hacia un contenedor adicional de leche para otros usos. La leche que cumple los parámetros preestablecidos se dirige hacia un tanque agitado y refrigerado a 4°C donde la leche se almacena hasta su recogida y traslado a la planta procesadora, en la cual, la leche bruta será transformada en una leche comercial que cumpla con los estándares de calidad.



**Figura 3.1.** Sistema de ordeño automático (AMS) del SERIDA empleado en la recolección de muestras de leche.



**Figura 3.2.** Esquema de recogida de muestras de leche líquida para su análisis del SERIDA.



El sistema de ordeño AMS, adicionalmente, desvía parte de la leche hacia un muestreador automático cuyo fin es recopilar muestras individuales de los distintos ordeños para posteriormente ser analizadas. El LILA (Laboratorio Interprofesional Lechero y Agroalimentario de Asturias), realiza controles de rutina sobre la calidad físico-químico y bacteriológica. En la Figura 3.2 se muestra un esquema de la recogida de muestras de leche cruda para su análisis.

Las muestras de leche se recolectaron en recipientes de plásticos de 50 ml de capacidad. Las muestras destinadas al análisis del laboratorio LILA eran recogidas en envases que contienen como conservante unas gotas de azidiol (cloramfenicol, azida sódica, ácido trisódico y azul de bromofenol) para evitar el deterioro de las muestras hasta su análisis, mientras que las muestras destinadas a nuestro estudio NIRS se recogieron, generalmente sin conservante para evitar posibles interferencias de color (ver Tabla 3.1).

Las muestras fueron transportadas desde ganadería experimental del SERIDA al laboratorio en un intervalo de horas desde que las muestras fueron recolectadas. En caso de que los ordeños se realizasen el día anterior al análisis, las muestras se conservaron en condiciones de refrigeración en torno a 4°C. Asimismo, para evaluar la reproducibilidad de las muestras en días sucesivos, la leche se mantuvo entre análisis consecutivos en refrigeración (4°C).

## **3.2 Análisis e instrumentación NIRS**

### **3.2.1 Instrumentos NIR para el análisis de leche líquida**

En el presente trabajo se evaluó el potencial del microPHAZIR para la obtención de espectros de calidad. Para evitar las posibles limitaciones del instrumento se analizaron también las muestras de leche con un equipo NIRS *at-line* de referencia (FOSS NIRSystemss 6500). En la Tabla 3.2 se muestran comparadas las características de ambos equipamientos.

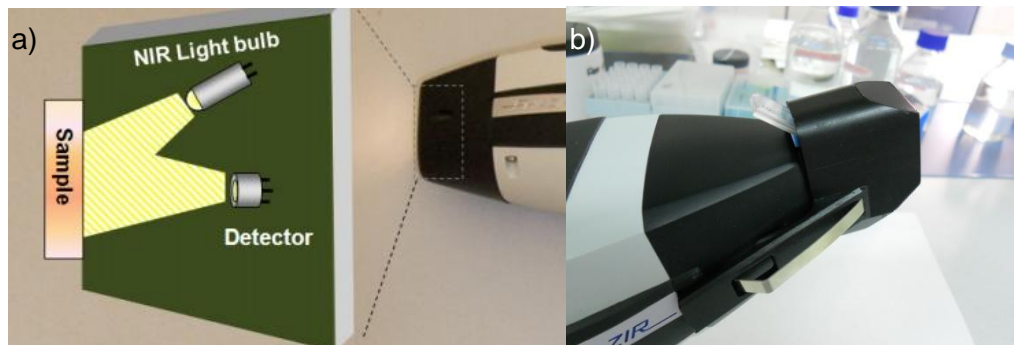
**Tabla 3.2.** Principales características de los instrumentos utilizados.

Características principales	Instrumento	
	FOSS NIRSystems 6500	microPHAZIR
Filtro	Monocromador/Predispersivo	Equipo MEMS/Predispersivo
Rango	400-2500 nm	1600-2.400 nm
Resolución	2 nm	8 nm (no constante)
Tiempo de integración	1.875 ms	600 ms
Tiempo de medida	60 s (32 escaneos/muestra)	3 s (5 escaneos/muestra)
Ventajas	Altas prestaciones Condiciones de trabajo controladas (laboratorio)	Portátil Compacto y robusto

**MicroPHAZIR (Polychromix Inc., Wilmington, MA, USA).**

Se trata de un espectrofotómetro portátil de 1,25 Kg para análisis NIR *on-line*, con filtro óptico de tipo MEMS (Sistemas micro-electro-mecánicos) diseñado para realizar análisis rápidos no destructivos, con lámpara de tungsteno como fuente de radiación. Posee una pantalla LCD y baterías recargables con hasta 4 h de operación.

Dispone de un adaptador para el análisis de muestras líquidas al que se puede acoplar una cubeta de cuarzo de 1 mm de paso óptico (ver Figura 3.3).



**Figura 3.3.** Equipo portátil microPHAZIR. (a) Esquema de modo de incidencia de la luz sobre la muestra y (b) Adaptador para líquidos acoplado a microPHAZIR.

El rango espectral es de 1600 a 2400 nm, con una resolución espectral de 8,7 nm, y pueden trabajar en reflectancia difusa,  $\log(1/R)$ , donde R se refiere a reflectancia. En función del modo de medida, cada espectro será el resultado de promediar diferentes barridos por muestra. Los datos espectrales son almacenados en la memoria interna del equipo y mediante conexión USB se pueden transferir a un PC,

para su posterior análisis y tratamiento. Los datos espectrales pueden visualizarse y modificarse con el software Excel (Microsoft Office).

**FOSS NIRSystemss 6500 SY II (Silver Spring, MD, USA)**

Se trata de un espectrofotómetro de laboratorio (*at-line*) con sistema monocromador de espectro continuo (ver Figura 3.4). Este equipo cuenta con un módulo transport al cual se puede acoplar una cubeta para líquidos opacos de cuarzo con fondo de aluminio reflectante, de paso óptico 17 mm para realizar medidas en transfectancia.

El instrumento recoge la información espectral en el rango 400-2500 nm, con una resolución espectral de 2 nm. Realiza 16 barridos sobre el fondo interno, 32 barridos por muestra y finalmente realiza otros 16 barridos sobre el fondo interno. El espectro final será el promedio de todos los barridos corregido por el fondo interno. De igual modo que en todos los equipos NIRS la referencia interna es el espectro recogido sobre la cerámica interna del instrumento de análisis.

Se utilizó el software de análisis de rutina ISIsScan II ver. 1.5 Infrasoftware International, Port Matilda, PA, USA, 2000) para la recogida de datos espectroscópicos.

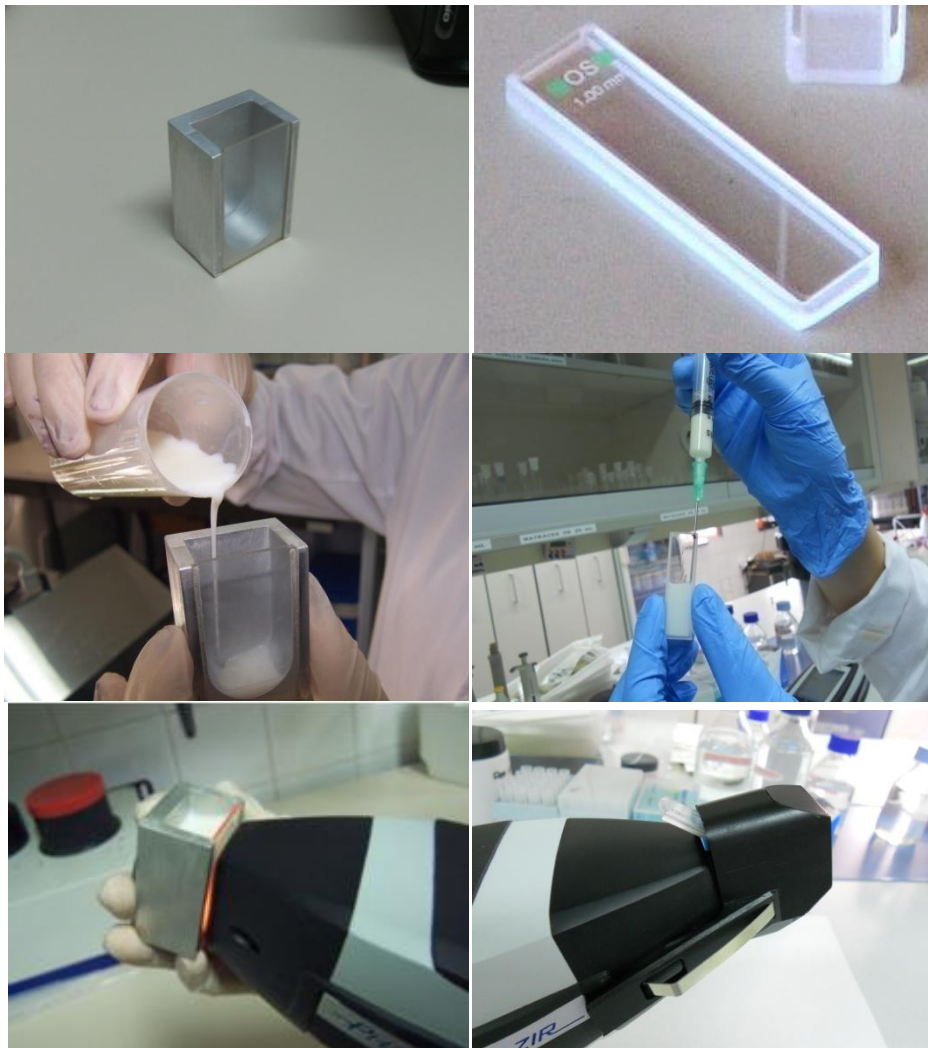


**Figura 3.4.** Equipos *on-line* FOSS NIRSystemss 6500 y cápsula para líquidos opacos.

### 3.2.2 Cubetas para la toma de espectros NIR

Como se comentó anteriormente con el equipo FOSS NIRSystems 6500 se recogieron los espectros con una cápsula adaptable para líquidos opacos FOSS (Ref. US-ISIH-0398), mientras para el equipo portátil microPHAZIR se realizaron las medidas de forma directa sobre la cápsula para líquidos de FOSS o utilizando el adaptador para líquidos y la cubeta de cuarzo de 1 mm (ver Figura 3.5).

La cubeta FOSS tiene un paso óptico de 17 mm, es de cuarzo y posee fondo de aluminio, un material reflectante que permite analizar en transflectancia. Esta cápsula posee un adaptador acoplable al equipo de laboratorio *at-line* mientras que para las medidas con microPHAZIR fue necesario situar la muestra en la cápsula de forma manual frente a la ventana de análisis.



**Figura 3.5.** Cubeta de cuarzo para líquidos con paso óptico de 17 mm FOSS (izquierda) y cubeta de cuarzo para líquidos con paso óptico de 1mm (derecha). Llenado y presentación de las distintas cubetas.

La cubeta de cuarzo de microPHAZIR empleada (paso óptico 1 mm), se acopla mediante el adaptador que permite realizar medidas en reflectancia difusa.

El llenado de cada cubeta fue diferente. La cubeta de paso óptico 1 mm precisa de una jeringa y aguja para su llenado; a continuación se lava dos veces su interior con la propia muestra, evitando burbujas y por último se introduce la muestra. Es necesario limpiar la superficie externa con papel para eliminar suciedad externa y evitar errores en la medida. Es esencial mantener la cubeta en buenas condiciones antes y después del análisis de cada muestra, de este modo, tras cada análisis (todas las réplicas) se limpiaba la cubeta con agua destilada. Con el tiempo la grasa se acumula en las paredes de la cubeta, un lavado con detergente, agua caliente y etanol puede facilitar la higiene de las cubetas.

La cápsula con paso óptico 17 mm resulta más sencilla y recomendable para la aplicación de la técnica. La leche se introduce directamente desde los botes de plástico, que se mantienen en el baño caliente, a la cubeta. Para el buen mantenimiento de la cápsula se aconseja aclarar la superficie con agua destilada y etanol.

### **3.2.3 Pretratamiento de la leche para su análisis**

La leche tras el ordeño se encuentra a una temperatura en torno a 39°C y perfectamente homogénea. Para imitar las condiciones *in-situ* de la leche cruda se realizó un procedimiento de calentamiento y homogeneización de las muestras previo al análisis. La importancia de estos dos tratamientos esta descrita en numerosos trabajos (Bogomolov *et al.*, 2013; Bohren y Huffman, 1983, Cabassi *et al.*, 2013), debido a que la formación de glóbulos de grasa de tamaños y formas variables pueden influir de forma directa sobre los espectros finales

Las muestras de leche eran recolectadas en botes de plástico, que para el análisis NIRS, se mantuvieron en un baño de agua a una temperatura de 40±2°C en agitación continua, para conseguir una dispersión homogénea de la muestra y en concreto de la materia grasa. Se utilizó una sonda de temperatura (Testo 926) para verificar que la temperatura alcanzada en el interior de los botes se encontraba dentro del rango establecido.

Los glóbulos de grasa en la leche cruda se encuentran en torno a 1 y 10 µm de diámetro, tras un homogeneizado la distribución de los tamaños se encuentra en torno a 1 µm (Bogomolov *et al.*, 2013), por ello es recomendable realizar un pretratamiento

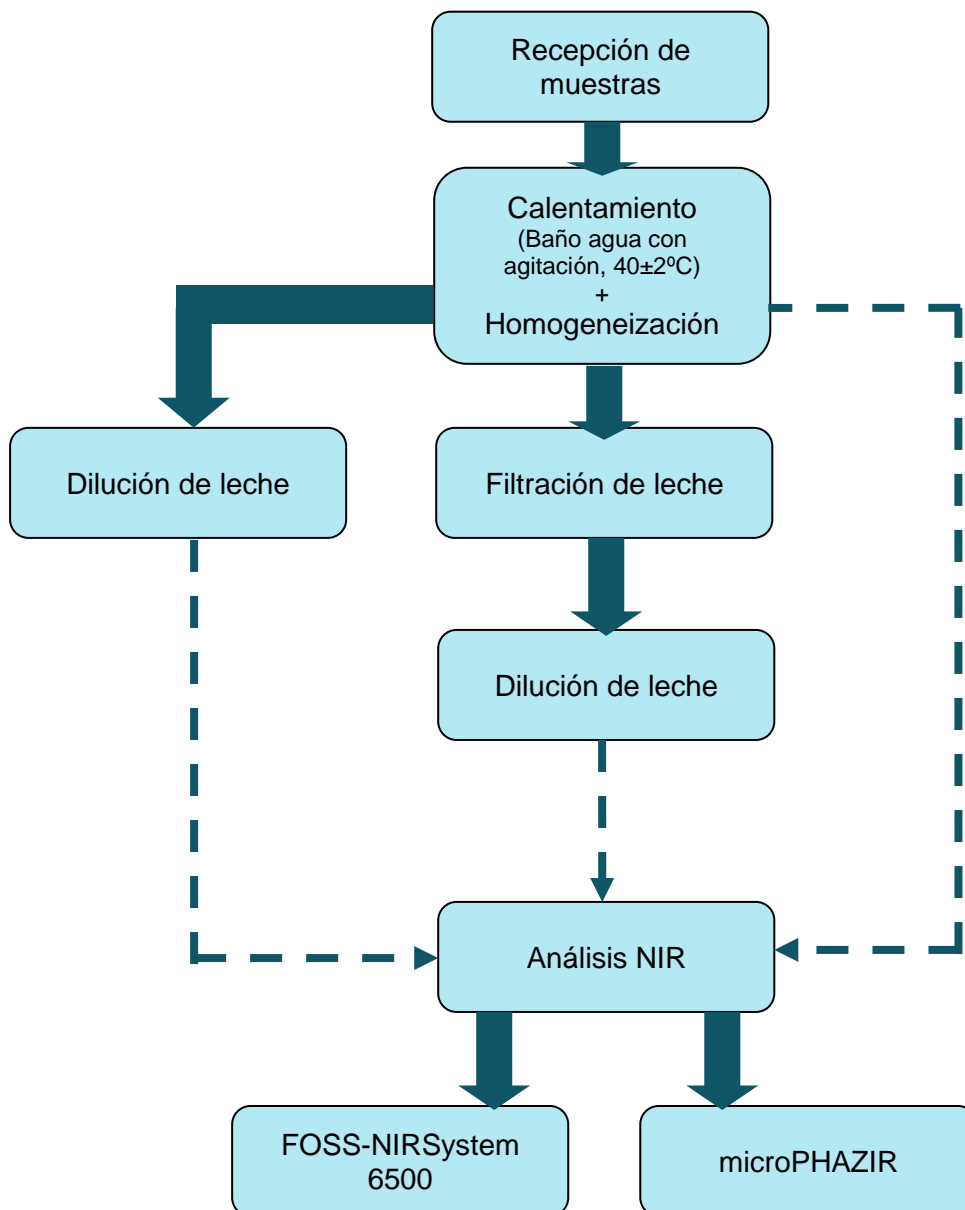
de agitación suave y manual de 20 a 30 segundos antes de llenar las cubetas para realizar las medidas con el instrumento NIR. En la Figura 3.6 se muestran las imágenes de la gradilla conteniendo los reservorios de la leche y en un baño de agua a 40°C, y la técnica de homogeneización manual.



**Figura 3.6.** Muestras de leche en baño de agua a  $40\pm 2^{\circ}\text{C}$  con agitación suave (izquierda) y agitación manual durante 20-30 segundos (derecha).

La obtención de un espectro de calidad y que sea representativo de los parámetros de calidad que caracterizan la leche, exige optimizar y validar el método de presentación de las muestras para su análisis en el equipo de espectroscopía NIR. Con este objetivo se analizaron diferentes formas de presentación de las muestras. A continuación se describe la metodología seguida en la preparación de las muestras.

En la Figura 3.7 se representan esquemáticamente los diferentes procesos de pretratamiento ensayados para la recogida de información espectral NIRS en el equipo Phazir.

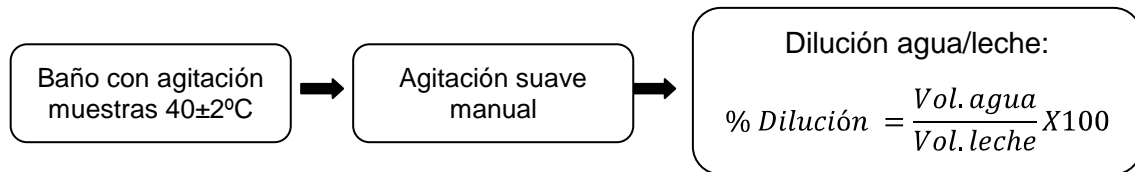


**Figura 3.7.** Esquema de los métodos de preparación de muestras para los análisis NIR.

### 3.2.4 Dilución de leche con agua

La leche se diluyó en un rango amplio de proporciones agua/leche. Inicialmente se preparó un banco de diluciones relativamente pequeño y de amplio rango: 25, 50, 75 y 100% de dilución (Ver Figura 3.8). En función de la calidad de los espectros que se fueron obteniendo, se amplió el número de diluciones y se redujo el rango en torno a la dilución que proporcionaba mejores

espectros (30-125%). Finalmente se ensayaron diluciones en las proporciones: 100%, 200% y 300%.



**Figura 3.8.** Esquema y cálculo de las diluciones de leche y agua.

Tanto la leche como el agua se mantuvieron en el baño de agua con agitación a 40°C durante la preparación de las diluciones. Con ayuda de una micropipeta se tomó el volumen de leche y de agua Milli-Q (ultrapura) para preparar diluciones de 4 ml de volumen final en tubos de 10 ml. El vial se agitó en el vortex durante 30 segundos.

### 3.2.5 Filtración y dilución de leche

Con el fin de evaluar la incidencia de la presencia de partículas sólidas e incluso de los glóbulos de grasa sobre la calidad de los espectros, se estudió la eficacia de tres tipos de filtros: filtros de jeringa con membrana vidrio de 1 µm y 0,2 µm (Olimpeak, modelo TR-200000G y TR-200105G respectivamente) y filtro de celulosa para filtración a vacío (ver Figura 3.9).



**Figura 3.9.** Filtro de celulosa (izquierda) y filtro de jeringa (derecha).

Para los filtros de 1 y 0,2 µm se tomaron 5 ml de leche con la jeringa, se acopló al filtro y se filtró la muestra. Debido al alto contenido en sólidos de la



leche cruda los filtros presentaron problemas de obstrucción, no obstante el filtro de 1  $\mu\text{m}$  permitió obtener leche filtrada de buena calidad.

La filtración al vacío se realizó con un embudo Buchner acoplado a un matraz quitasato y bomba de vacío. Se utilizaron filtros de celulosa 100% (LLG LabWare, Ref. 9.045 842) con diámetro de poro entre 3-5  $\mu\text{m}$ .

Los filtrados se diluyeron con agua en diferentes porcentajes siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.2.4 (Dilución de leche con agua).

### 3.3 Optimización del análisis espectral con el equipo *on-site*.

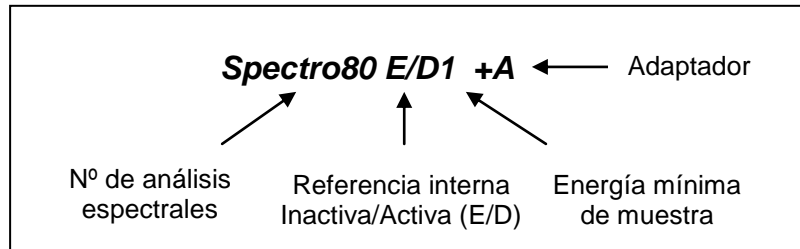
#### 3.3.1 Aplicaciones de microPHAZIR

El Software de microPHAZIR (PHAZIR Method Generator v.1.5.6.1) posibilita la creación de métodos instrumentales de análisis diferentes, esto supone la posibilidad de realizar cambios en algunos de los parámetros gráficos de la recogida de información espectral (*Sample Scan, Background Scans, Minimum Sample Power, Internal Reference...*). Estas modificaciones tienen un efecto directo sobre la calidad de los espectros y sobre la obtención de datos espectrales. Con el objetivo de conseguir una señal espectral de calidad, se diseñaron y programaron distintos modos de análisis para microPHAZIR, los cuales se recogen en la Tabla 3.3.

**Tabla 3.3.** Modos de análisis de microPHAZIR para realizar medidas sobre muestras de leche cruda de vaca y sus características.

<b>Modos microPHAZIR</b>	<b>Nº escaneos/muestra</b>	<b>Energía mínima de muestra</b>	<b>Referencia interna</b>
<i>Spectro10 D2</i>	10	2	Inactivo
<i>Spectro80 D2</i>	80	2	Inactivo
<i>Spectro80 E2b</i>	80	2	Activo
<i>Spectro80 E2c</i>	80	2	Activo
<i>Spectro80 D0</i>	80	0	Inactivo
<i>Spectro80 D1</i>	80	1	Inactivo
<i>Spectro5 E0</i>	5	0	Activo
<i>Spectro80 E0</i>	80	0	Activo

La nomenclatura utilizada para la denominación de los modos de análisis diseñados en el presente proyecto para el equipo *on-site* microPHAZIR fue la siguiente::



A continuación se detallan aquellos parámetros que es posible modificar la creación de los diferentes modo de análisis de microPHAZIR.

Nº de escaneos por muestra (*Sample Scans*): Número de espectros recogidos que se promedian en el análisis de una muestra. La media de todos los barridos de la radiación (*scans*) sobre la muestra resultan en un espectro final promedio, que es almacenado en la memoria y visible en la pantalla LCD del instrumento

Energía mínima de muestra (*Minimun Sample Power*):Parámetro interno del equipo que limita la respuesta a señales inferiores al valor asignado (variable entre 0-2), de modo que la energía reflejada por debajo de este límite no es detectable por el equipo y es interpretada como energía de muestra demasiado baja o *Power Level Too Low* (PLTL).

Referencia interna (*Internal Reference*): Cerámica de referencia, situada dentro del instrumento, que permite controlar la variabilidad intrínseca del equipo con respecto a la respuesta espectral. Es posible activar (*Enable*) o desactivar (*Disable*) la lectura del fondo interno. Si el fondo interno está inactivo, automáticamente el equipo utiliza como referencia externa la media de una cubeta de cuarzo de 1 mm vacía.

A continuación se describen las características de los distintos modos de análisis NIRS para leche cruda empleados en el presente trabajo

Todos los modos de análisis de microPHAZIR descritos a continuación, fueron aplicados en el equipo mediante el adaptador para líquidos que permite acoplar la cubeta de cuarzo de paso óptico 1 mm y realizar medidas en reflectancia difusa.

**Spectro10 D2 +A:** Este modo registra en el equipo el espectro promedio de 10 escaneos por muestra. Por otro lado, la referencia interna o *spectralon* está inactiva (D), esto supone la medida automáticamente de una referencia externa que se utilizará para corregir los errores en el espectro debidos a variaciones ambientales que puedan interferir sobre los espectros. El parámetro interno del instrumento que limita la energía mínima de muestra detectable por el mismo se estableció en 2, lo cual permite detectar intensidades en un rango de  $\log(1/R)$  mucho más estrecho si se compara con otros modos de análisis.

**Spectro80 D2 +A:** Este modo registra en el equipo el espectro promedio de 80 escaneos por muestra. El resto de características (referencia interna y límite de energía detectable por el equipo) son idénticas al modo *Spectro10 D2 +A*.

**Spectro80 E2b +A / Spectro80 E2c +A:** Estos modos registran en el equipo el espectro promedio de 80 escaneos por muestra. Por otro lado, la referencia interna o *spectralon* está activo (E), esto supone una corrección de los errores en el espectro, causados por las variaciones del funcionamiento del propio instrumento. La principal diferencia entre ambos modos de análisis fueron las diferentes modificaciones realizadas sobre el software interno del equipo para inactivar la referencia interna, en el modo *Spectro80 E2b +A* se eliminó el término *Disable\_Internal\_Reference*, mientras que en el modo *Spectro80 E2c +A* se cambiaron las siglas *Disable\_Internal\_Reference* por *Enable\_Internal\_Reference*. El parámetro interno del equipo que limita la energía mínima de muestra detectable por el mismo se estableció en 2.

**Spectro5 E0 +A:** Este modo registra en el equipo el espectro promedio de 5 escaneos por muestra. Por otro lado, la referencia interna o *spectralon* está activo (E), esto supone una corrección de los errores en el espectro, causados por las variaciones del funcionamiento del propio instrumento, como se comentó anteriormente. El parámetro interno del instrumento que limita la energía mínima de muestra detectable por el mismo se estableció en 0, lo cual permite detectar intensidades en un rango amplio de  $\log(1/R)$ .

**Spectro80 E0 +A:** Este modo registra en el equipo el espectro promedio de 80 escaneos por muestra. Por otro lado, la referencia interna o *spectralon* está activo (E). El parámetro interno del instrumento que limita la energía mínima de muestra detectable por el mismo se estableció en 0.

**Spectro80 D0 +A:** Las características de este modo son idénticas al modo descrito anteriormente, la única diferencia se refiere a la referencia interna. El *spectralon* se encuentra inactiva (D), esto supone la medida automáticamente de una referencia externa que se utilizará para corregir los errores en el espectro debidos a variaciones ambientales que puedan interferir sobre los espectros.

**Spectro80 D1 +A:** Este modo registra en el equipo el espectro promedio de 80 escaneos por muestra. Por otro lado, la referencia interna o *spectralon* está inactiva (D). El parámetro interno del instrumento que limita la energía mínima de muestra detectable por el mismo se estableció en 1, lo cual permite detectar intensidades en un rango de  $\log(1/R)$  inferior a otros modos de análisis.

Los modos de análisis de microPHAZIR descritos a continuación fueron aplicados en el equipo situando directamente frente al detector la cubeta para líquidos opacos de paso óptico 17 mm y fondo de aluminio para realizar medidas en transfectancia.

**Spectro5 E0:** Características de análisis programadas en el equipo idénticas a las del modo *Spectro5 E0 +A*.

**Spectro 80 E0:** Características de análisis programadas en el equipo idénticas a las del modo *Spectro80 E0 +A*.

**Spectro80 D0:** Características de análisis programadas en el equipo idénticas a las del modo *Spectro80 D0 +A*.

La tabla 3.4 recoge los modos de análisis, presentación y pretratamiento de las muestras de leche estudiadas.

**Tabla 3.4.** Modos de análisis NIR, forma de preparación y presentación de las muestras a los equipos NIRS (*Near Infrared Spectroscopy*).

Set de análisis	Modo microPHAZIR	Presentación	Preparación de muestra
1 y 2	<i>Spectro10 D2 +A</i>	Cubeta líquidos PO 1mm	Dilución
3, 4, 5, 9 y 10	<i>Spectro80 D2 +A</i>	Cubeta líquidos PO 1 mm	Filtración y Dilución
8, 9, 10, 12, 13 y 15	<i>Spectro5 E0 +A</i>	Cubeta líquidos PO 1 mm	Leche entera
13 y 15	<i>Spectro80 E0 +A</i>		
13, 14 y 15	<i>Spectro80 D0 +A</i>		
13, 14,	<i>Spectro80 D1 +A</i>		Leche entera/ filtrada. + diluída
12, 13,	<i>Spectro80 E2b +A</i>		
12	<i>Spectro80 E2c +A</i>		
6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15	<i>6500 NIR</i>	Cubeta líquidos opacos PO 17 mm	Leche entera
6, 7, 8, 9, 10, 11,12, 13, 14 y 15	<i>Spectro5 E0</i>		
13 y 15	<i>Spectro80 E0</i>		
15	<i>Spectro80 D0</i>		

PO: Paso óptico.

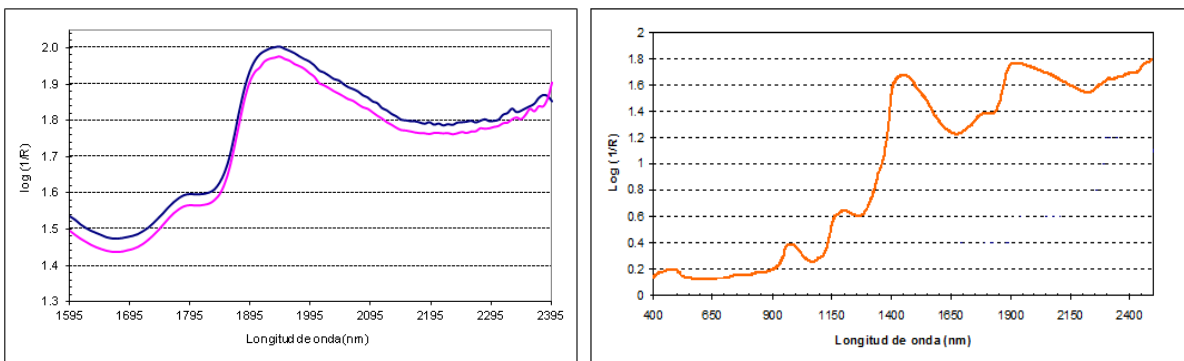
### 3.3.2 Softwares

#### *ISIScan*

Es un software para análisis de rutina diseñado para operar *on-line* con instrumentos FOSS NIR en el laboratorio. Este programa es capaz de detectar los valores de análisis en tiempo real para cada componente de la muestra y almacenar resultados en la base de datos automáticamente (Figura 3.10). Es posible exportar los resultados del análisis de muestras a los software Excel y WinISI (Figura 3.11).



**Figura 3.10.** FOSS-NIRSystem 6500 trabajando a tiempo real a través del software ISIScan.



**Figura 3.11.** Espectros de leche típicos recogidos en el equipo portátil microPHAZIR (izquierda) y espectros de leche recogidos en el equipo de laboratorio FOSS NIRSystems 6500 (derecha).

### ***Interpolación de datos.***

La información espectroscópica almacenada en la memoria de microPHAZIR se exportó al programa de cálculo Excel, para poder llevar a cabo un tratamiento de la información espectral que permita establecer conclusiones sobre las alternativas propuestas.

El equipo NIRS microPHAZIR recoge espectros en un rango comprendido entre 1600-2400 nm con un intervalo de 8,7 nm (no constante), mientras que FOSS NIRSystemss 6500 analiza en un rango mayor (400-2500 nm) y con un intervalo de 2 nm. Para homogeneizar las bases de datos espectrales, los datos del equipo portátil se interpolaron mediante una macro de Excel. De manera que, a partir de un espectro con 100 datos se obtiene, tras la interpolación, un dato cada 2 nm, constituyendo cada espectro un total de 401 datos.

## WinISI

WinISI IIProyect Management v.1.50, es un paquete de software de calibración, contiene programas de operación en rutina, e incluye herramientas útiles de pretratamiento, caracterización de la señal espectral y de calibración. Este software permite importar también directamente los espectros y archivos de ISIScan y de texto (.txt), gestionar las muestras y bases de datos locales para evaluarlas similitudes o diferencias existentes en los valores de absorbancia entre varios espectros (Shenk y Westerhaus, 1995a). Permite también estimar el espectro promedio y la desviación estándar (STD) de un conjunto de espectros procedentes de diferentes submuestras/muestras, y evaluar las diferencias y/o similitudes entre espectros con el estadístico RMS (raíz cuadrada del error cuadrático medio).

## Phazir-MG

PHAZIR Method Generator v.1.5.6.1 (2008), es un paquete de software que permite diseñar fácilmente y de manera intuitiva métodos de análisis mediante la modificación de distintos parámetros internos de los equipos de la gama PHAZIR. Además, este programa permite visualizar los espectros, exportarlos fácilmente a otras aplicaciones y aplicar tratamientos de primera y segunda derivada de forma conjunta, o no, a tratamientos SNV y SNVD.



Figura 3.12. Pantalla de visualización del software PHAZIR Method Generator v.1.5.6.1.

### 3.3.3 Modelos estadísticos

#### ***Evaluación de la repetibilidad y reproducibilidad espectral***

La evaluación de la información espectral en términos de repetibilidad y reproducibilidad, se llevó a cabo mediante comparación espectral, haciendo uso del estadístico RMSC (*Root Mean Square Correction*) para cada una de las longitudes de onda en el rango NIR 1600-2400 nm. De los diferentes estadísticos para cuantificar las diferencias entre los espectros que ofrece el programa WinISI II Project Management ver. 1.50 (Infrasoft International, Port Matilda, PA, USA, 2000) se han utilizado los valores de la raíz cuadrada del cuadrado medio del error corregido con el sesgo (RMSC). El estadístico RMSC viene definido por la siguiente ecuación (Shenk y Westerhaus, 1995b).

$$RMSC = 10^6 \times \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_{im} - y_{ik})^2 - \frac{(\sum_{i=1}^n (y_{im} - y_{ik}))^2}{n}}{n - 1}}$$

$Y_{im}$  = Valor de  $\log(1/R)$  de la submuestra  $m$  para la longitud de onda  $i$  ( $\lambda_i$ ).

$\bar{Y}_{ik}$  = Valor de  $\log(1/R)$  de la submuestra  $k$  para la longitud de onda  $i$  ( $\lambda_i$ ).

$n$  = número de longitudes de onda empleadas.

El valor medio y la desviación estándar (SD) del estadístico RMSC para un grupo de espectros se calculó de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$MEDIA = \sqrt{\frac{\sum_{m=1}^N (RMSC_m)^2}{N}}$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{m=1}^N (RMSC_m)^2}{N - 1}}$$

Este valor SD expresa la varianza del error, con una distribución muestral de una  $\chi^2$ , en este sentido el estadístico SD puede resultar muy útil para evaluar la repetibilidad y reproducibilidad espectral.



### 3.3.4 Pretratamiento SNV y SNVD

Se aplicaron los pretratamientos matemáticos SNV (*Standard Normal Variate*), SNVD (*Standard Normal Variate and Detrending*), con el objetivo de corregir fenómenos de radiación difusa (Barnes *et al.*, 1989 y 1994; Dhanoa *et al.*, 1994 y 1995), y el tratamiento de derivación y tratamientos de derivación a los datos espectroscópicos obtenidos con el fin de evaluar el efecto de los mismos sobre la información espectral recogida. El programa empleado en este trabajo utiliza una notación de 4 dígitos: el primer número indica el orden de la derivada; el segundo número indica el tamaño del segmento sobre el cual se realiza la derivación (intervalo expresado en nanómetros donde se realiza el cálculo de la derivada). El tercero y el cuarto indican el tamaño de los intervalos, expresados en nanómetros, empleados para el cálculo de suavización de la derivada (Shenk y Westerhaus, 1995b). Los tratamientos matemáticos aplicados se han recogido en la tabla 3.5.

**Tabla 3.5.** Características de los distintos tratamientos matemáticos: ST (sin tratamiento), SNV (*Standard Normal Variate*) y SNVD (*Standard Normal Variate and Detrending*). 1. Primera derivada de los espectros; 2. Segunda derivada.

Corrección de espectro	Tratamiento matemático
ST	1, 4, 4, 1
	2, 4, 4, 1
SNV	1, 4, 4, 1
	2, 4, 4, 1
SNVD	1, 4, 4, 1
	2, 4, 4, 1

## 4 RESULTADOS EXPERIMENTALES

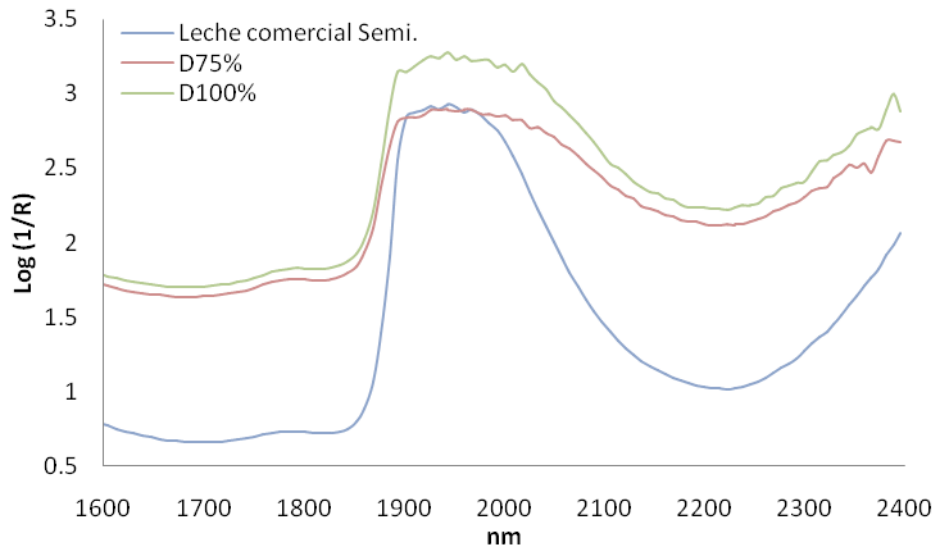
El número de muestras integrantes de los colectivos de análisis NIRS ha sido descrito en el apartado 3.1 de Material y Métodos. Un total de 156 muestras de leche fue sometido a 12 modos de análisis NIRS diferentes, tres técnicas de pretratamiento de leche diferentes, y dos modos de presentación de muestra, cuyas características se describen en los apartados 3.3.1 y 3.2 respectivamente.

### 4.1 Efecto de la dilución sobre el espectro de leche

Algunas de las limitaciones del instrumento MEMS-NIRS al inicio de este proyecto, fue la energía de muestra mínima o parámetro interno del equipo que limitaba la respuesta a señales inferiores a la determinada para cada modo. Durante los primeros experimentos se evaluó una muestra de leche procedente de leche del tanque general del SERIDA (*Set 1*) de acuerdo al apartado 3.3.1 utilizando el modo de *microPHAZIR Spectro10 D2 +A*. Esta aplicación determina un parámetro interno en el equipo que limita la respuesta a señales inferiores a 2, de modo que la energía reflejada por debajo de este límite no es detectada por el equipo y es interpretada como energía de muestra demasiado baja o "PLTL" (*Power Level Too Low*).

Los resultados para las diferentes diluciones ensayadas (25%, 50%, 75% y 100%) de la muestra, arrojaron los siguientes resultados:

- Para las muestras con diluciones inferiores al 50% no fue posible recabar la información espectral, puesto que en todos los ensayos obteníamos el mensaje PLTL (*Power Level Too Low*).
- Para las muestras con diluciones del 75 y 100% fue posible llevar a cabo la lectura espectral (Figura 4.1).



**Figura 4.1.** Espectro promedio de muestra de leche en dilución al 75%, al 100% y muestra de leche comercial semidesnatada, analizadas en modo *Spectro10 D2 +A*.

Tomando como punto de partida los resultados obtenidos con la muestra del Set 1, se prepararon bancos de diluciones y mostraron resultados similares: diluciones entre 50-70% presentaron energía de muestra demasiado baja, diluciones entre 75-80% presentaron gran variabilidad, obteniéndose en unos casos lecturas y en otros no (energía de muestra demasiado baja), las diluciones entre el 85-125% nos permitieron recoger la información espectral para todas las muestras.

En vista de la escasa reproducibilidad de los resultados, se evaluaron los parámetros que influyen directamente sobre la calidad del espectro: temperatura de muestra, tiempo de homogeneización y componentes del medio analizado. En conjunto todos los componentes de la leche (proteínas, ácidos grasos, agua, sólidos en suspensión...) tienen una alta capacidad de absorber en el rango NIR, reduciendo al mínimo la energía reflejada por la muestra. Sin embargo, son numerosos los estudios que relacionan el efecto dispersivo de la leche con el contenido en ácidos grasos, el tamaño de partículas en dilución, espesor de las capas representantes o concentración de la fase acuosa (Bogomolov *et al.*, 2013; Dahm *et al.*, 2013). Tomando como referencia estos estudios se seleccionó un set de 25 muestras de leche procedentes de vacas individuales (Set 2) clasificadas por su porcentaje en materia grasa y se efectuaron diluciones al 100, 200 y 300%. Los resultados fueron poco reproducibles, es decir, se obtuvieron lecturas para algunas muestras, pero para otras la energía de la señal espectral era demasiado baja. Este hecho no se asoció a un contenido elevado en grasa (Tabla 4.1).

**Tabla 4.1.** Espectros analizados con el equipo PHAZIR para un grupo de 25 muestras (*Set 2*) de leche procedente de vacas individuales clasificadas por su contenido en grasa.

Vaca	% grasa	Diluciones				
		100%	200%	300%	300%	300%
815	4.18	*	*	L	L	*
721	3.92	*	*	*	L	*
111	3.85	*	*	L	L	*
108	3.81	*	*	L	L	*
901	3.81	*	*	L	*	*
107	3.73	*	*	L	L	*
818	3.69	*	*	L	L	*
804	3.54	*	*	L	*	*
722	3.47	*	*	L	L	*
724	3.43	*	-	L	*	*
109	3.43	L	-	L	L	*
110	3.28	*	-	L	L	*
907	3.27	L	-	L	L	*
18	3.26	L	-	L	L	*
19	3.21	L	-	L	L	*
112	3.16	L	-	L	L	*
903	3.15	L	-	L	L	*
801	2.88	L	-	*	L	*
101	2.82	L	-	*	L	*
707	2.75	L	-	*	L	L
723	2.74	L	-	*	L	*
813	2.72	L	-	*	L	L
808	2.57	-	-	*	L	*
810	2.42	-	-	*	L	*
104	2.37	-	-	*	L	*

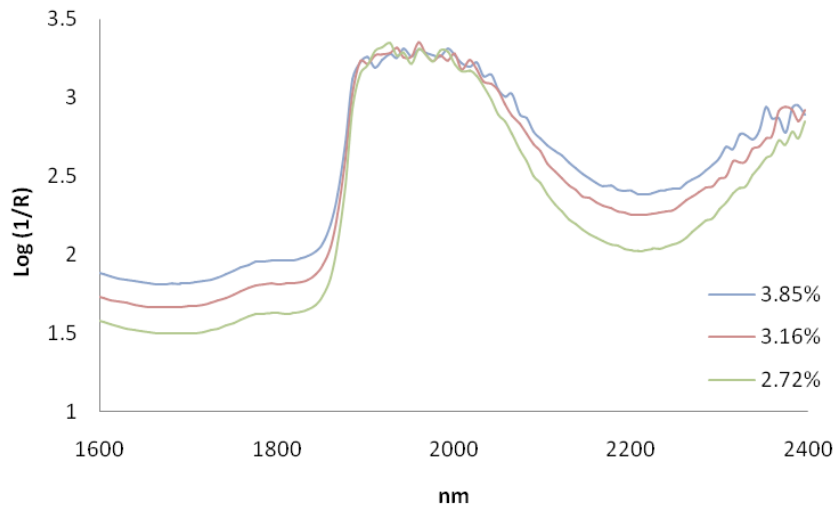
L: Lectura o detección de intensidad de muestra.

\*: Energía de muestra demasiado bajo.

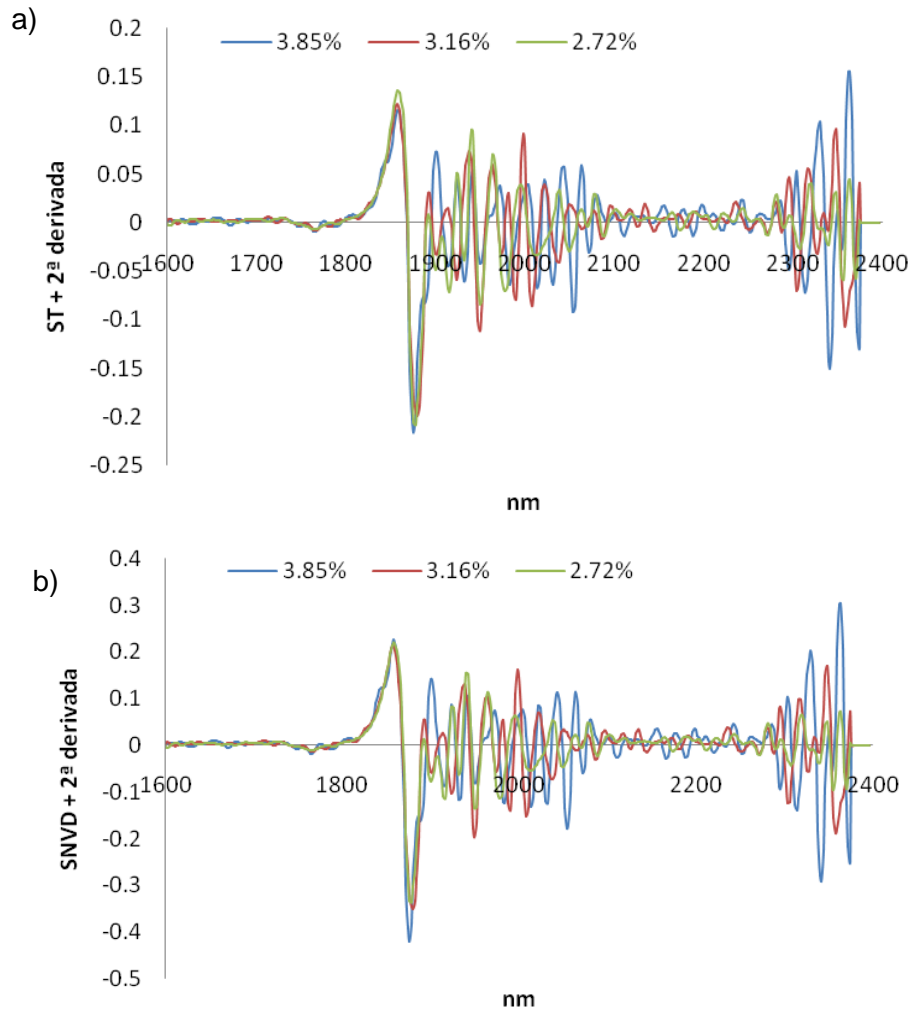
- : No se realizó análisis.

Más aún, la irreproducibilidad fue tal que para muestras de leche diluida en agua para las que no fue posible obtener espectro debido a energía de muestra demasiado baja, tras 1 o 2 horas era posible recoger el espectro.

En la Figura 4.2 se muestran los resultados obtenidos para 3 muestras del *Set 2* diluidas. Se observa que para el rango 1900-2000 nm existe una saturación de la señal espectral ( $\log(1/R) > 3$ ), debido a la interferencia del alto contenido en agua de la muestra.



**Figura 4.2.** Espectro de 3 muestras de leche individuales con distinto % de grasa con un pretratamiento de dilución al 300%, analizadas con el modo *Spectro10 D2 +A*.



**Figura 4.3.** Espectro de 3 muestras de leche individuales con distinto % de grasa con un pretratamiento de dilución al 300%, analizadas con el modo *Spectro10 D2 +A*, representadas en segunda derivada sin tratamiento (ST) (a) y con tratamiento SNVD (b).

En la Figura 4.3 se recogen también los resultados obtenidos tras aplicar un tratamiento en segunda derivada con y sin SNVD como pretratamiento matemático con el fin de acentuar los máximos y mínimos espectrales, los cuales pueden aportar información relevante sobre las características de la leche. Los resultados revelaron que a pesar de aplicar un tratamiento de suavizado de espectro, se observó una zona de elevado ruido entre el rango 1900-2050 nm, correspondiente a la zona de saturación de espectro (Figura 4.2), y otra zona de ruido a partir de 2300 nm, probablemente debido al sistema de selección espectral del equipo de análisis o por ser las bandas finales del análisis del instrumento.

## 4.2 Efecto de la filtración sobre el espectro de la leche

En vista de los problemas de irreproducibilidad y saturación durante los análisis de muestras de leche diluida, se pensó en reducir el posible efecto que los componentes de gran tamaño podrían tener sobre los espectros en NIR. Como paso previo a la medida de las muestras por espectroscopia, para ello se aplicó a las muestras de leche un pretratamiento de filtración seguido de dilución, como se describe en el apartado 3.2.5.

Se utilizaron muestras de leche de dos ganaderías colaboradoras del SERIDA, Gozón y Carreño (*Set 3*). Ambas muestras se filtraron y diluyeron con agua al 100%. Las muestras se analizaron con el modo *Spectro80 D2 +A* del equipo portátil microPHAZIR (características del modo descritas en el apartado 3.3.1).

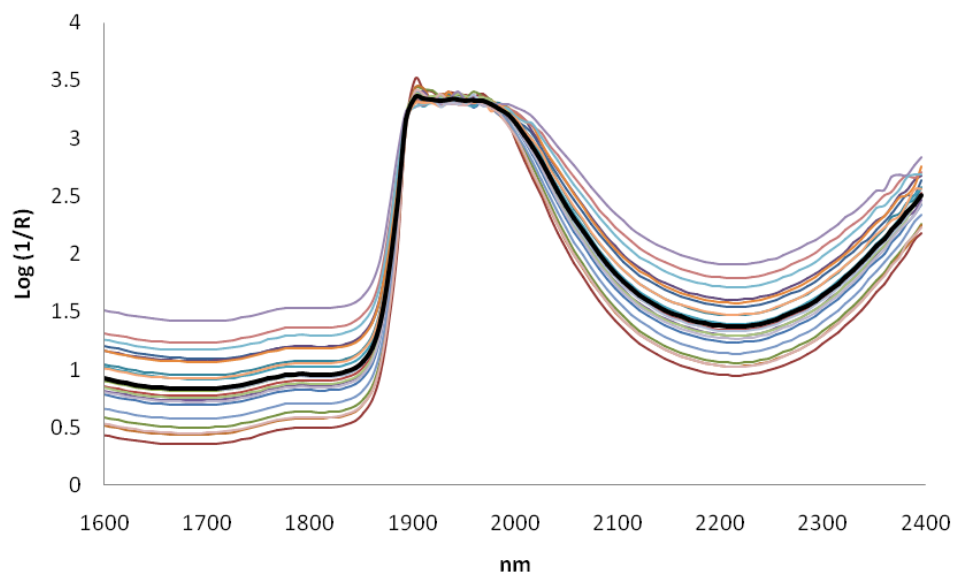
Durante los experimentos se utilizaron los tres métodos de filtración descritos en el apartado 3.2.5, los resultados fueron los siguientes:

- Las muestras con filtración a vacío y posterior dilución no pudieron ser escaneadas por el equipo de mano microPHAZIR debido a que la muestra absorbió por encima del parámetro interno establecido para el modo de análisis, en este caso 2 (*Spectro80 D2 +A*). Posiblemente el tamaño de poro no fue suficientemente pequeño y permitió el paso de partículas de gran tamaño (como glóbulos de grasa) que poseen menor dispersión y mayor absorbancia.
- Los filtros de diámetro de poro 1  $\mu\text{m}$  permitieron obtener un filtrado de calidad. A pesar de que las muestras se filtraron, no fue posible obtener espectros, la leche seguía teniendo alto contenido de sólidos en suspensión y la reflectancia resultó demasiado baja para ser detectada por el equipo debido a las especificaciones del modo de análisis. La filtración seguida de una dilución al

100% solventó el problema y permitió obtener lecturas con microPHAZIR en el modo *Spectro80 D2 +A*.

- Los filtros de 0,2µm de diámetro de poro presentaron problemas de obstrucción y no fue posible obtener un filtrado de calidad con sólidos de tamaño inferior a 0,2µm. No se realizaron diluciones ni medidas con el equipo portátil microPHAZIR.

En vista de los buenos resultados obtenidos con el filtro de tamaño de poro 1 µm, se procedió a analizar las muestras del set (21 muestras de leche) a través del filtro de jeringa de 1 µm con el modo *Spectro80 D2 +A*. Previamente las muestras fueron filtradas y diluidas al 100%. De los 42 los análisis realizados con el equipo portátil se obtuvieron 39 lecturas, mientras que 3 análisis presentaron un nivel de energía demasiado bajo para ser detectado por el equipo en el modo estudiado (Figura 4.4). Como puede observarse en el rango 1900-2000 nm, se presentan nuevamente problemas de saturación por interferencia del agua.



**Figura 4.4.** Espectro promedio de 21 muestras de leche individuales con pretratamiento (filtro 1 µm y dilución 100%) en modo *Spectro80 D2 +A* y el espectro promedio del conjunto.

Con el objetivo de reducir el efecto del agua sobre el espectro NIR de las muestras de leche, se preparó un banco de diluciones (0%, 50%, 100%, 125%, 150% y 200%) para un grupo de 6 muestras clasificadas por su contenido en grasa (*Set 5*).

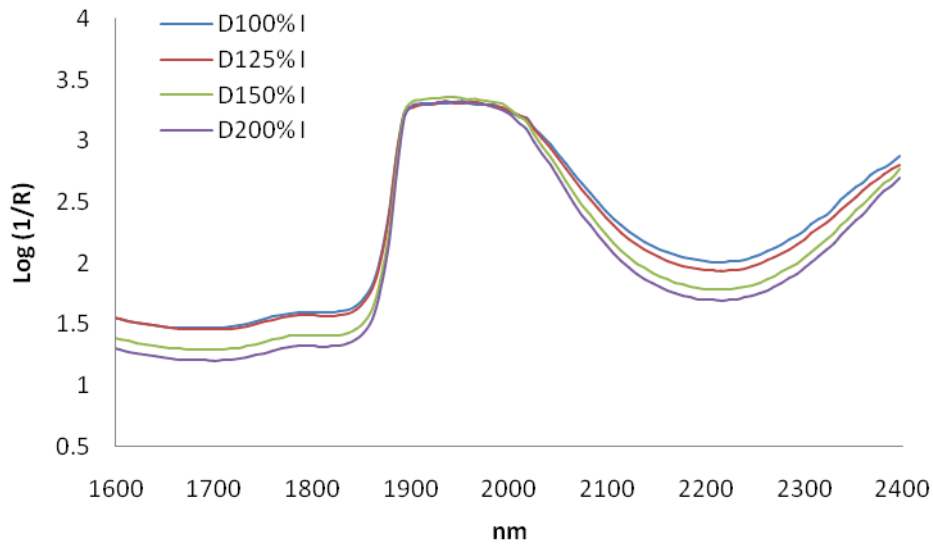
Por un lado se evaluó la influencia de la dilución sobre los espectros NIRS y por otro lado se analizó la relación entre el contenido en materia grasa y los espectros NIRS.

En los experimentos las diluciones en el rango del 0% al 50% no fue posible obtener espectro por energía de muestra demasiado baja, mientras que las diluciones 100-200% si presentaron espectros (Figura 4.5). Estos resultados son similares a los resultados de experimentos anteriores (apartado 4.1), donde a las muestras tan solo se les aplicaba un pretratamiento de dilución.

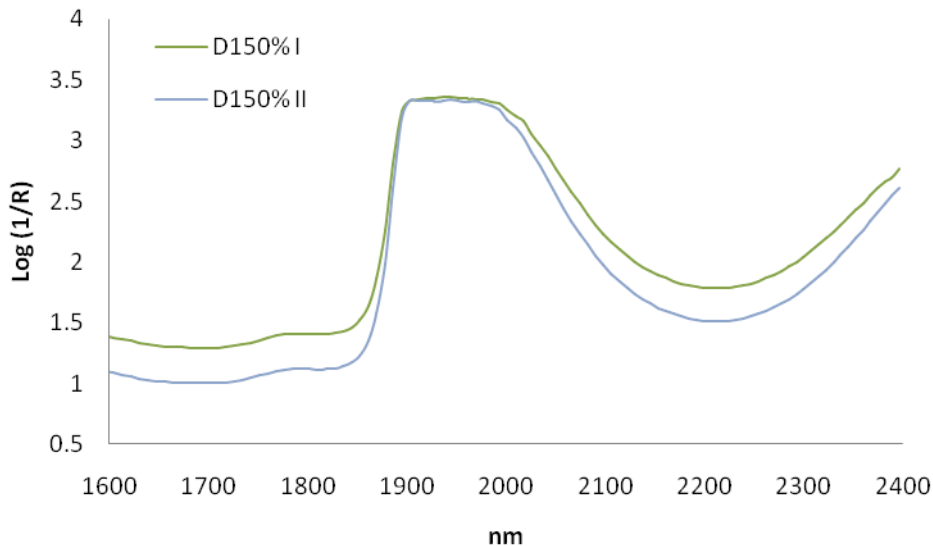
- En el estudio de los espectros generados desde las muestras a las que se le aplicó la técnica de filtrado seguido de dilución y análisis en modo *Spectro80 D2 +A*, se observó menos ruido que en la técnica de dilución sin filtrado y análisis en modo *Spectro10 D2 +A*, evaluada en el apartado anterior. Probablemente estos resultados estén relacionados con la diferencia en el número de escaneos por muestra de cada uno de los modos. El primero hace 80 escaneos/muestra, mientras que el segundo realiza 10 escaneos/muestra. Cuantos menos espectros se integren en el espectro medio de una muestra, mayor es el ruido al final del rango espectral y existe mayor dificultad para analizar la información recogida.
- Otra de las diferencias encontradas entre ambos métodos de análisis fue la presencia de diferentes alturas de saturación en el rango 1900-2000 nm. En la técnica de análisis con un pretratamiento de dilución se encontraron dos alturas de saturación diferentes para cada dilución, con valores de  $\log(1/R)$  en torno a 3,1 para la dilución al 75% y valores en torno a 2,8 para la dilución al 100%, mientras que en el análisis con un pretratamiento de filtración seguida de dilución no se encontraron diferencias entre las alturas de las saturaciones en las gráficas. Las diferencias entre ambos métodos pudieron ser debidas a que: el filtrado tiene un efecto sobre el espectro de absorción de la leche mediante la eliminación de las partículas de gran tamaño en suspensión y parte de los glóbulos de grasa.

A pesar de las similitudes encontradas con experimentos anteriores, los espectros de las réplicas I y II presentaron una forma similar en la zona anterior y posterior a la banda de saturación (Figura 4.6).



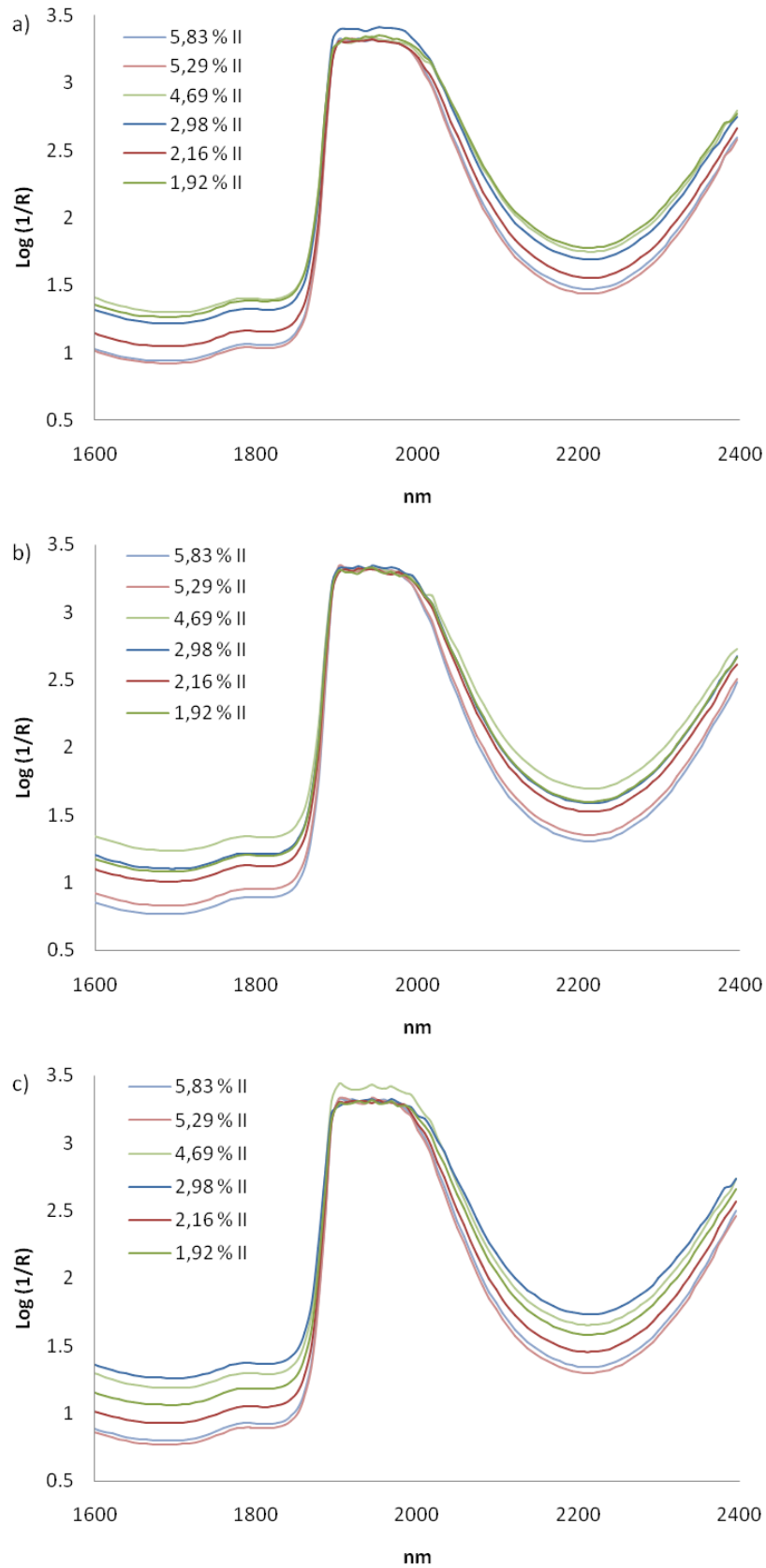


**Figura 4.5.** Promedio de 6 muestras de leche individuales seleccionadas por su contenido en grasa (réplica I). Muestras filtradas y diluidas a 100%, 125%, 150% y 200%. Modo *Spectro80 D2 +A*.



**Figura 4.6.** Espectro promedio de 6 muestras de leche individuales, analizadas en modo *Spectro80 D2 +A*, con pretratamiento de filtración y dilución a 150% (I) y su réplica (II).

Por otro lado, se evaluaron los espectros individuales de cada muestra de leche clasificada por su contenido en materia grasa (Set 5). Los resultados, en principio, mostraron cierta relación entre el contenido en grasa y la altura de los espectros a ambos lados del pico de absorción del agua, es decir, fuera del rango 1900-2000 nm. Los espectros de las muestras con 5,83%-5,29% de materia grasa siempre presentaron valores de  $\text{log}(1/R)$  inferiores a los espectros con 2,16-1,92% de materia grasa (ver Figura 4.7). Estos resultados coinciden con los encontrados en estudios anteriores, donde un mayor contenido en grasa en la leche se relaciona con espectros más bajos en bandas fuera del rango 1900-2000 nm, correspondiente a bandas próximas de absorción del agua (1940 nm) (Bogomolov *et al.*, 2013).



**Figura 4.7.** Espectros promedio de 6 muestras de leche individuales seleccionadas por su porcentaje en grasa (réplica II) con pretratamiento de filtración y dilución a 100% (a), 125% (b) y 150% (c), analizadas en el modo *Spectro80 D2 +A* de microPHAZIR.

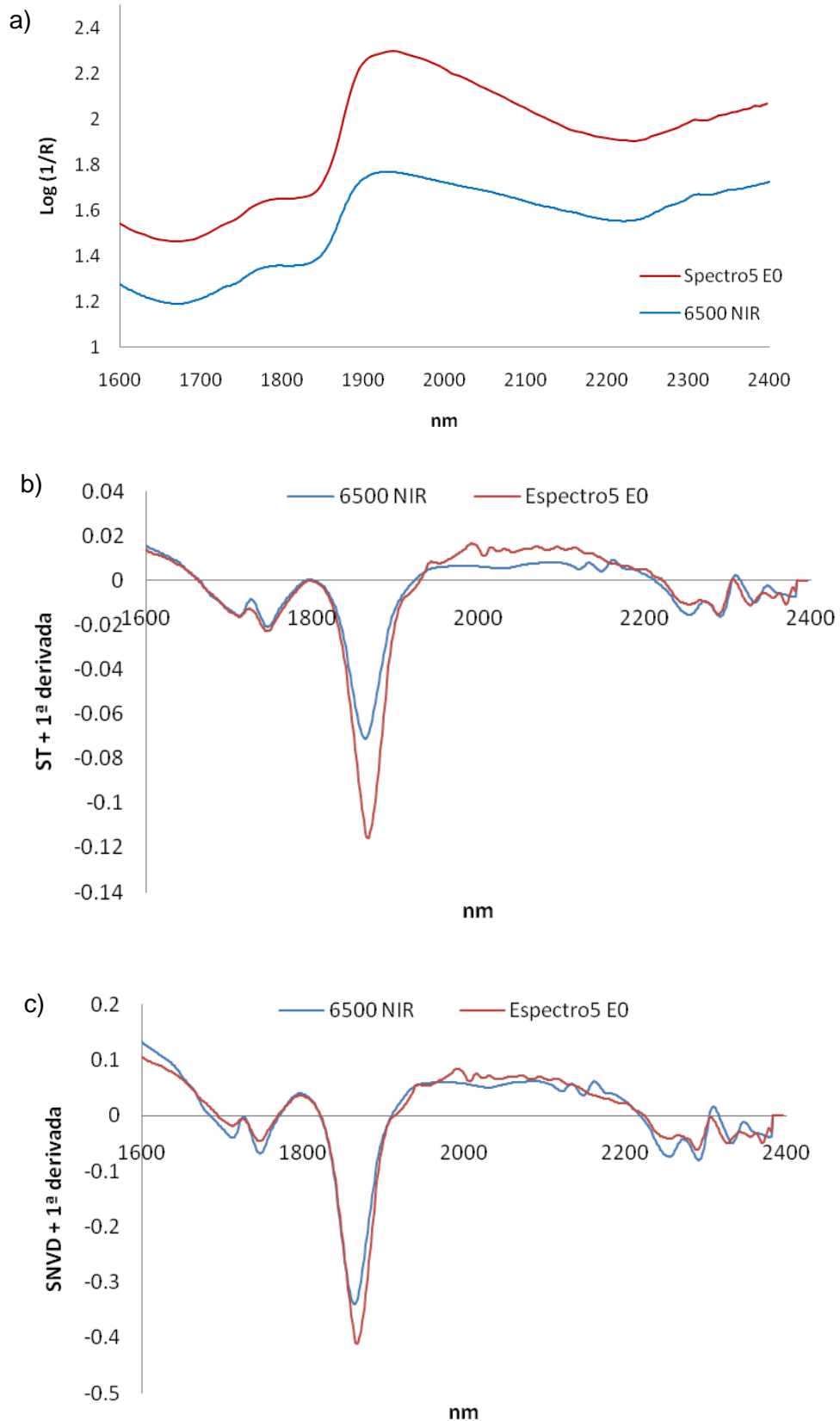
### 4.3 Equipo de referencia 6500 NIR y microPHAZIR

Teniendo en cuenta la gran variabilidad de la información espectral y la escasa reproducibilidad de los resultados obtenidos con el microPHAZIR, se tomó como referencia el equipo robusto *at-line* FOSS NIRSystems 6500 y se intentó conseguir con el equipo portátil un espectro similar al recogido con el de referencia.

Por ello se realizó un experimento donde se analizaron 24 muestras de leche procedentes de vacas individuales con los modos *Spectro5 E0* y *6500 NIR*. Para los dos modos se midió en transreflectancia mediante una cubeta de paso óptico 17 mm y fondo de aluminio. A las muestras se les aplicó un pretratamiento de calentamiento a 40°C y homogeneizado.

Los resultados de los análisis revelaron una diferencia de altura y la presencia de ruido en los espectros medidos con el modo *Spectro5 E0* de microPHAZIR, ambos equipos generaron espectros aparentemente paralelos (Figura 4.8a). Para evaluar el grado de semejanza entre los espectros de ambos modos se calculó la 1ª derivada para la media de las 24 muestras y se aplicó el tratamiento matemático SNVD con el objetivo de corregir los espectros respecto a la media y eliminar el efecto de dispersión de la luz igualando la línea de base, como se describe en el apartado 3.3.4.

El tratamiento matemático sobre los espectros de leche reveló picos característicos comunes a ambos modos de análisis NIRS. Por otro lado, los datos tratados con SNVD generaron espectros más próximos que los datos no tratados, esto se debió a la eliminación del efecto de dispersión de la luz y la corrección de la línea de base de ambos espectros (Figura 4.8b y c).

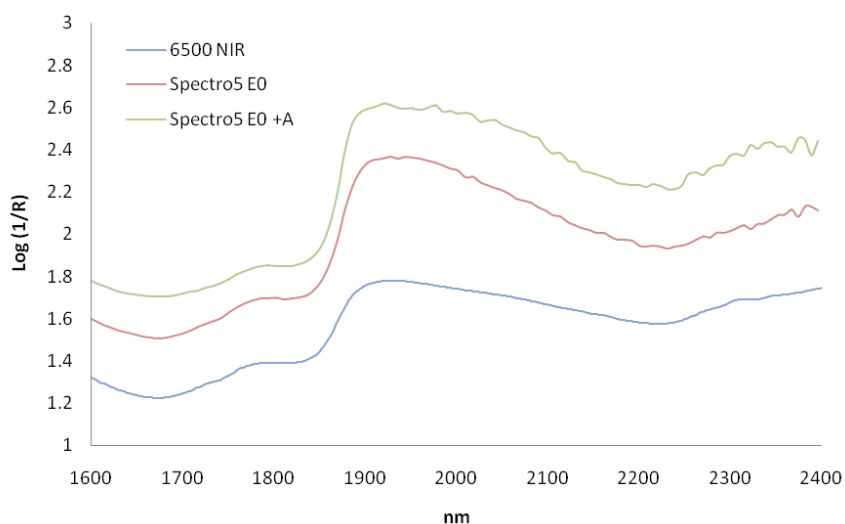


**Figura 4.8.** Espectro promedio de 24 muestras de leche individuales analizadas con los modos: 6500 NIR y Spectro5 E0 (a) y sus correspondientes primeras derivadas sin tratamiento (ST) (b) y con tratamiento SNVD (c).

**Efecto del adaptador para líquidos sobre el espectro de la leche:**

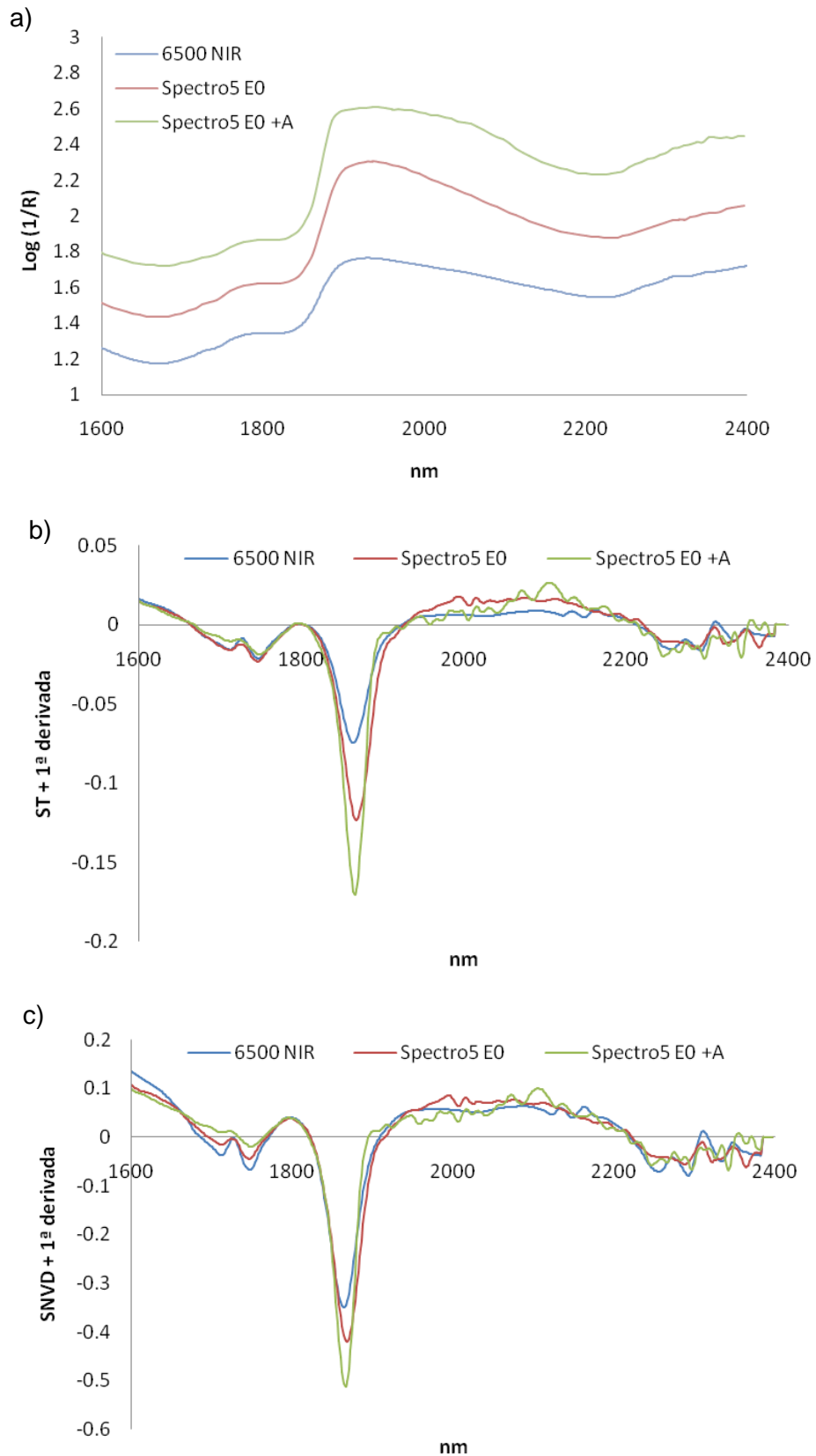
Con el objetivo de estudiar el posible efecto que podría tener el adaptador para líquidos de microPHAZIR sobre los espectros de leche, se realizó un experimento con tres modos de medida NIR: *6500 NIR*, *Spectro5 E0* y *Spectro5 E0 +A* (características descritas en el apartado 3.3.1). Se analizó un grupo de 4 muestras (*Set 8*) y el comportamiento de sus espectros mediante el análisis por estos tres modos.

Se encontraron principalmente tres diferencias entre el modo de microPHAZIR que utilizaba el adaptador para líquidos y el que no lo utilizaba: El modo *Spectro5 E0 +A* con adaptador presentó un espectro con mayores valores de  $\log(1/R)$ , mayor tendencia a la saturación en torno a la banda de absorción del agua (1940 nm) y más interferencias de ruido sobre los espectros que el modo *Spectro5 E0* (Figura 4.9). En conjunto, el modo de análisis *Spectro5 E0* sin adaptador, generó espectros de mejor calidad que las muestras analizadas en el modo *Spectro5 E0 +A* con adaptador.



**Figura 4.9.** Espectros de una muestra de leche individual (V112) medida con tres modos de análisis distintos: *Spectro5 E0 +A*, *Spectro5 E0* y *6500 NIR*.

Siguiendo la estrategia descrita anteriormente se evaluó gráficamente la similitud o diferencia de la información espectral, tras el tratamiento de derivada y SNVD. Los resultados de los análisis revelaron medidas de  $\log(1/R)$  superiores con cierta saturación en el rango 1900-2000 nm y la presencia de ruido en los espectros medidos con el modo *Spectro5 E0+A* de microPHAZIR, con respecto a los otros modos de estudio (Figura 4.10a).



**Figura 4.10.** Espectro promedio de 4 muestras de leche individuales analizadas con tres modos: *Spectro5 E0 +A*, *Spectro5 E0* y *6500 NIR* (a) y sus correspondientes primeras derivadas sin tratamiento (b) y con tratamiento SNVD (c).

No se observaron grandes diferencias entre los datos derivados con tratamiento SNVD (Figura 4.10c) y sin tratamiento (Figura 4.10b).

#### **4.4 Evaluación de los métodos instrumentales de microPHAZIR**

##### ***Spectro80E2b +A y spectro80 E2c +A***

El objetivo del presente experimento fue evaluar el efecto de la referencia interna o *Spectralon* sobre los espectros NIR de la leche. Para ello se evaluaron 5 modos de análisis de microPHAZIR con referencia interna activa (E o *Enable Internal Reference*) diseñados para este trabajo, en combinación con dos formas de preparación de muestra: leche filtrada y diluida al 100% para los modos *Spectro80 E2b +A* y *Spectro80 E2c +A* y leche sin alterar (entera) para los modos *Spectro5 E0*, *Spectro5 E0 +A*, *Spectro80 E2b +A*, *Spectro80 E2c +A* y *6500 NIR*.

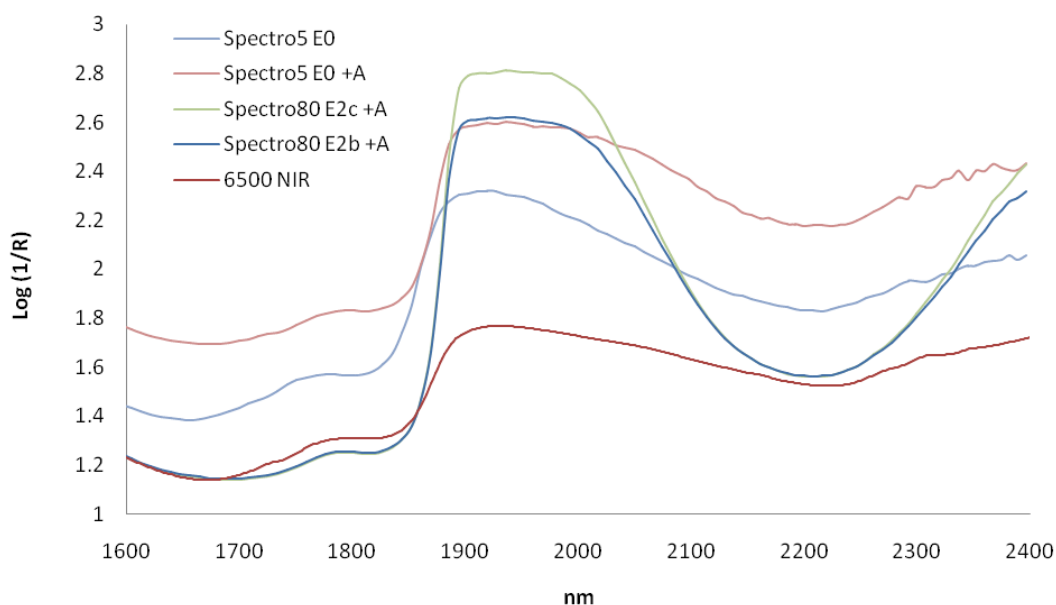
Los modos *Spectro80 E2b +A* y *Spectro80 E2c +A* no presentaron lecturas espectrales de las muestras de leche enteras debido a energía de muestra demasiado baja, es decir, la muestra reflejó por debajo del límite mínimo detectable por el equipo en el modo prefijado. Sin embargo estos dos modos si generaron espectros al diluir las muestras con agua y reducir la concentración de los componentes de la leche, los espectros quedaron representados en la Figura 4.11.

Ambos modos de análisis mostraron una meseta de saturación en torno a la banda de absorción del agua (1940 nm), sin embargo se diferenciaron por la altura de dicha meseta, esta situación se podría explicarse por errores durante la manipulación de la muestra o la variabilidad generada por diferencias de temperatura y homogeneidad entre muestras (Shenk y Westerhaus, 1995b).

Se observaron similitudes entre todos los espectros que procedían del análisis por microPHAZIR con adaptador (*Spectro80 E2c/b +A* y *Spectro5 E0 +A*). Se encontró una meseta de saturación en torno a las bandas de absorción del agua (1900-2000 nm), sin embargo hay que recordar que los modos *Spectro80 E2b +A* y *Spectro80 E2c +A* a diferencia de los otros tres modos se aplicaron al análisis de muestras de leche diluida.

Para los modos de análisis de leche sin diluir, el modo *Spectro5 E0 +A*, es decir, con adaptador, presenta una ligera saturación y más ruido en las bandas finales. El *Spectro5 E0*, sin embargo, no tiene saturación.

Finalmente, el mejor espectro con referencia interna activa se observó para el modo *Spectro5 E0*. La intensidad de absorbancia fue menor que para los espectros analizados por los modos anteriormente descritos, además el espectro no presentó saturación a ninguna longitud de onda. Por otro lado, se encontraron similitudes con los espectros analizados con el equipo de referencia FOSS NIRSystems 6500 (ver apartado 4.3).



**Figura 4.11.** Espectro de leche del tanque general analizada por diferentes modos de análisis y diferentes formas de presentación de muestra: *Spectro5 E0*, *Spectro5 E0 +A*, 6500 NIR (Leche entera), *Spectro80 D2b +A* y *Spectro80 D2c +A* (Leche diluida al 100%).

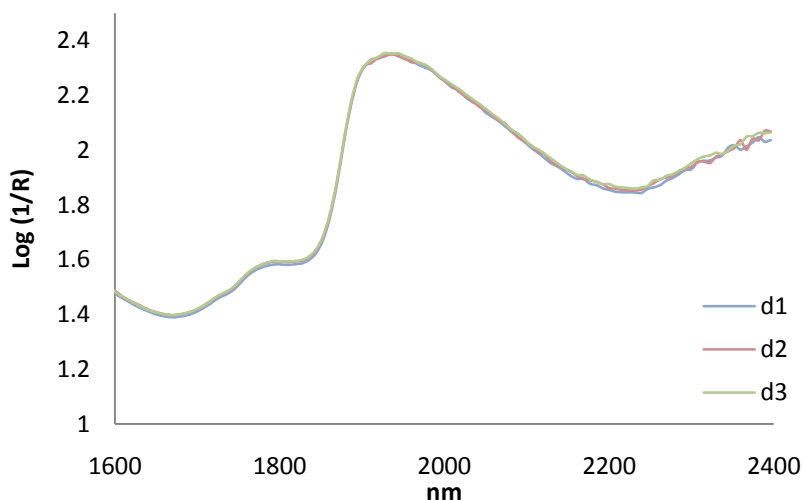
A la vista de los resultados, y dado que el método instrumental tiene gran influencia, se realizó un experimento con el objetivo de evaluar las diferencias entre 8 modos del equipo portátil microPHAZIR con diferentes características, diferenciados en dos grupos: modos que utilizan el adaptador para líquidos con paso óptico 1 mm y modos que emplean la cubeta FOSS para líquidos opacos de paso óptico 17 mm. Se analizó un set de 6 muestras de leche procedentes de vacas individuales (*Set 15*) con un pretratamiento de homogeneización y atemperado. Para evaluar la repetibilidad de los métodos de análisis se midieron tres réplicas por muestra. Por otro lado se quiso evaluar la reproducibilidad del método, se realizó el análisis de las muestras durante tres días consecutivos. Se obtuvo un total de 54 espectros.



**Spectro5 E0**

Las características espectrales observadas fueron principalmente:

- Este modo tiene la referencia interna activa, esto supone espectros más bajos respecto a  $\log(1/R)$ . Posiblemente el *spectralon* aplicado a las medidas espectrales de las muestras redujo el error acumulado por el propio funcionamiento del equipo. Los valores promedio ( $\log(1/R)$ ) de los espectros obtenidos en los análisis (Figura 4.12) se encontraron en el rango 1,5-2,37, para una longitud de onda entre 1600-2400 nm.
- La utilización de una cubeta de paso óptico ancho (17 mm) para realizar medidas en reflectancia generó valores de  $\log(1/R)$  inferiores a los observados en modos que utilizan cubeta de paso óptico estrecho.
- Se obtuvieron lecturas espectrales de todas las muestras analizadas. Esto se debió principalmente a amplio rango de detección definido para este modo, hay que recordar que el parámetro de detección de  $\log(1/R)$  del equipo se fijó en 0, por consiguiente el equipo es capaz de detectar cualquier intensidad de luz reflejada por muy bajo que sea el valor.
- El espectro obtenido de cada análisis es el promedio de 5 escaneos, debido a esto los espectros evaluados tenían mayor ruido en comparación a otros modos de análisis. Los espectros pueden perder información relevante sobre las características de las muestras.

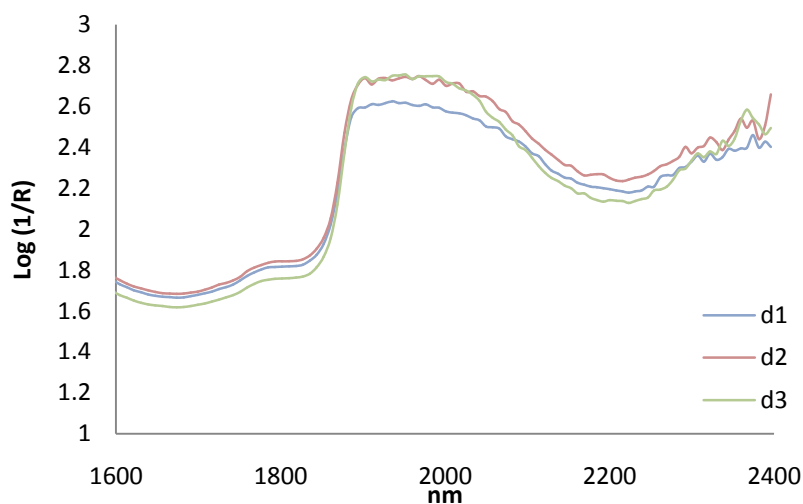


**Figura 4.12.** Espectro promedio de tres réplicas en tres días consecutivos (d1, d2 y d3) para una muestra de leche individual (V721M) analizada en el modo *Spectro5 E0*.

### Spectro5 E0 +A

Las características espectrales observadas fueron muy similares al modo Spectro5 E0 sin adaptador: referencia interna activa y por tanto espectros bajos respecto a los valores de  $\log(1/R)$  debido a la corrección por la aplicación del *spectralon*, observándose valores promedio de  $(\log(1/R))$  (Figura 4.13) en el rango 1,65-2,68, para una longitud de onda entre 1600-2400 nm; se obtuvieron lecturas espectrales de todas las muestras analizadas, debido principalmente al parámetro de detección del equipo, el cual se fijó en 0 para detectar un amplio rango de intensidades; los espectros obtenidos de cada análisis tenían elevada presencia de ruido, debido principalmente al bajo número de escaneos para obtener el espectro final.

Una de las características de este modo es la utilización de una cubeta de paso óptico estrecho (1 mm) para realizar medidas en reflectancia, generándose valores de  $\log(1/R)$  superiores a los observados en modos que utilizan cubeta de paso óptico superior. Es conocido que la leche es una dilución de proteínas, grasa y sólidos solubles principalmente, en agua, este factor es el principal responsable de la obtención de un pico en torno a la banda de absorción del agua (1940 nm) en el espectro NIRS.



**Figura 4.13.** Espectro promedio de tres réplicas en tres días consecutivos (d1, d2 y d3) para una muestra de leche individual (V723M) analizada en el modo *Spectro5 E0 +A*.

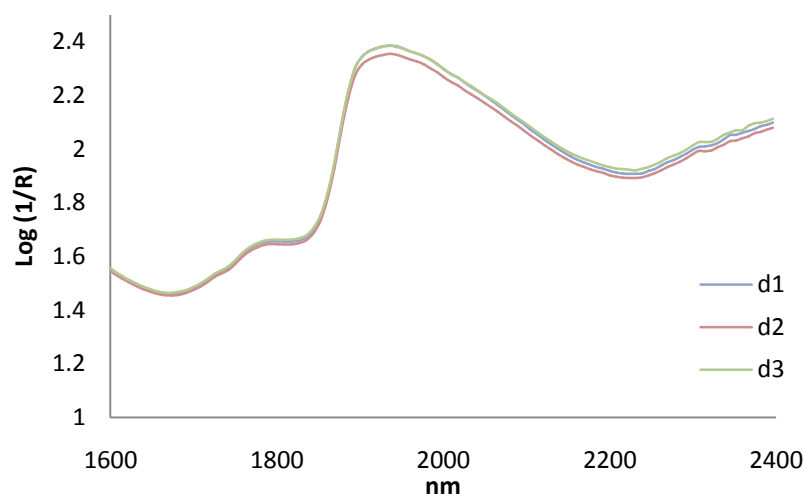
En vista de los resultados obtenidos para este modo, es posible decir que se trata de un modo muy limitado e inadecuado para la medida de reflectancia en el

rango NIR de la leche, puesto que el elevado efecto del ruido podría enmascarar la extracción de información espectral relevante.

### ***Spectro80 E0***

Las observaciones sobre los espectros resultado del análisis con este modo de microPHAZIR fueron muy similares al modo de análisis analizado anteriormente (*Spectro5 E0*), con referencia interna activa y por tanto la aplicación del *spectralon* sobre las medidas espectrales, el límite de detección de intensidad del equipo en 0 y la utilización de una cubeta de paso óptico de 17 mm, para realizar medidas en reflectancia. Estas tres características permitieron obtener valores de  $\log(1/R)$  (Figura 4.14) en el rango 1,5-2,37 para una longitud de onda entre 1600-2400 nm, idénticos a los encontrados en el modo *Spectro5 E0*, y lecturas espectrales de todas las muestras analizadas.

La principal característica de los espectros obtenidos con este modo de análisis fue la reducción del nivel de ruido debido al aumento del número de escaneos (80 barridos/muestra) con respecto a los modos de análisis que realizan un menor número de escaneos, lo cual permitió una mejor extracción de la información espectral.

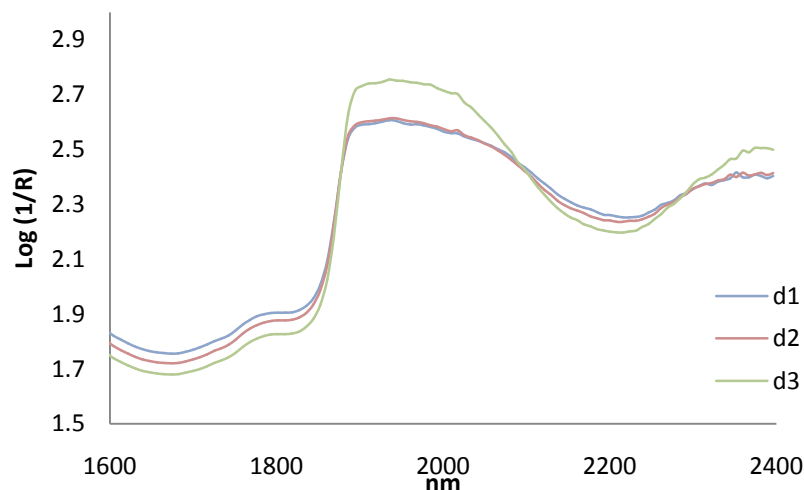


**Figura 4.14.** Espectro promedio de tres réplicas en tres días consecutivos (d1, d2 y d3) para una muestra de leche individual (V110M) analizada en el modo *Spectro80 E0*.

### ***Spectro80 E0 +A***

La utilización de una cubeta de paso óptico estrecho (1 mm) para realizar medidas en reflectancia generó valores de  $\log(1/R)$  superiores a los observados en modos que utilizan cubeta de paso óptico superior. Además se obtuvieron lecturas

espectrales de todas las muestras analizadas, principalmente debido a que el parámetro de detección  $\log(1/R)$  del equipo se fijó en 0. Por otro lado, el espectro obtenido de cada análisis (Figura 4.15) es el promedio de 80 escaneos, esto generó espectros con menor ruido en comparación a otros modos de análisis. Los espectros tienen mayor calidad.



**Figura 4.15.** Espectro promedio de tres réplicas en tres días consecutivos (d1, d2 y d3) para una muestra de leche individual (V721M) analizada en el modo *Spectro80 E0 +A*.

### ***Spectro80 D0***

Este modo presenta la referencia interna o *pectralon* inactiva (D), esto supone la medida automáticamente de una referencia externa que se utilizará para corregir los errores en el espectro debidos a variaciones ambientales que puedan interferir sobre los espectros, no obstante no fue posible realizar medidas espectrales sobre las muestras debido a que se utilizó como fondo la cubeta de paso óptico 17 mm FOSS vacía. El equipo *on-site* indicó:

*“Intensidad demasiado baja, comprobar referencia y lámpara”*

y no fue posible obtener espectros con este método instrumental.

### ***Spectro80 D1 +A***

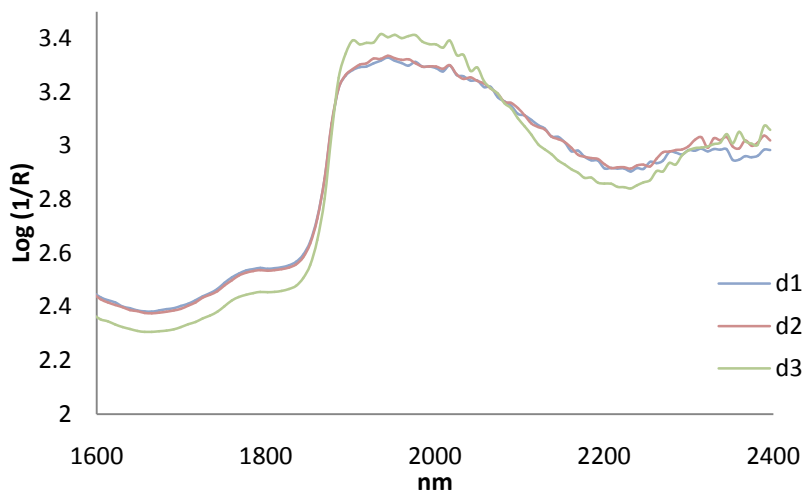
El modo de análisis *Spectro80 D1 +A* tiene la referencia interna inactiva, esto supone espectros más altos respecto a los modos con referencia interna activa. El

espectro obtenido de cada análisis es el promedio de 80 escaneos, esto generó espectros con menor ruido en comparación a otros modos de análisis. Los espectros tienen mayor calidad.

El mayor inconveniente para este modo de análisis fue la incapacidad de obtener espectros o lecturas de todas las muestras analizadas. Es necesario recordar que el parámetro de detección de  $\log(1/R)$  del equipo se fijó en 1, por consiguiente el equipo no fue capaz de detectar cualquier intensidad de luz reflejada y se observaron diferencias en la recogida de la información espectral, lo cual supone un problema cuando se trata de encontrar un método estandarizado de análisis en leche cruda

### ***Spectro80 D0 +A***

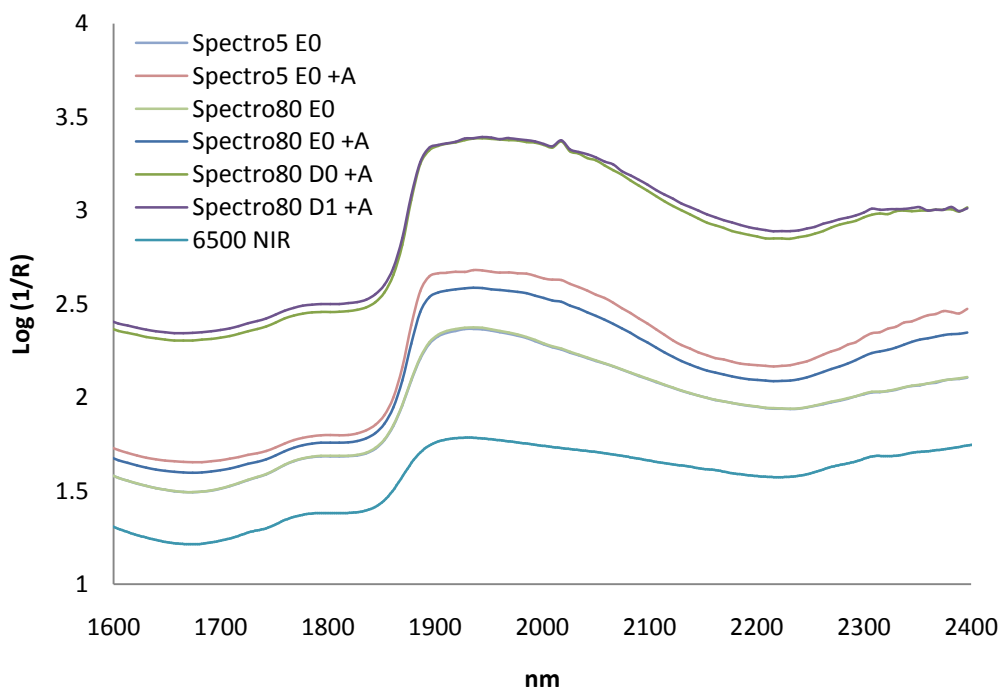
Este modo de análisis presentó características similares a las observadas en los espectros obtenidos con el modo *Spectro80 D1 +A* evaluado anteriormente. Algunas de estas características fueron: el empleo de una referencia externa como fondo en lugar de una referencia interna podría ser la principal causa de este fenómeno, por lo que es posible concluir que para obtener espectros en rangos inferiores de  $\log(1/R)$  es recomendable utilizar como fondo el *spectralon* del instrumento de análisis en lugar de una medida externa; se empleó una cubeta de paso óptico de 17 mm para realizar medidas en reflectancia generándose valores de  $\log(1/R)$  inferiores a los observados en modos que utilizan cubeta de paso óptico estrecho; por último, los espectros obtenidos de cada análisis (Figura 4.16) tenían menor ruido en comparación a otros modos de análisis, y por tanto los espectros tienen mayor calidad. Sin embargo, a diferencia del modo anterior (*Spectro80 D1 +A*) se obtuvieron lecturas espectrales de todas las muestras analizadas, este hecho se debió fundamentalmente al parámetro de detección de  $\log(1/R)$  del equipo, fijado en 0, por lo que el instrumento de análisis microPHAZIR fue capaz de detectar cualquier intensidad de luz reflejada por muy bajo que sea el valor, no obstante los valores obtenidos, con alguna excepción de saturación ( $d_3$ ) son aceptables.



**Figura 4.16.** Espectro promedio de tres réplicas en tres días consecutivos (d1, d2 y d3) para una muestra de leche individual (V721T) analizada en el modo *Spectro80 D0 +A*.

### Estudio comparado de los 7 modos de análisis NIRS

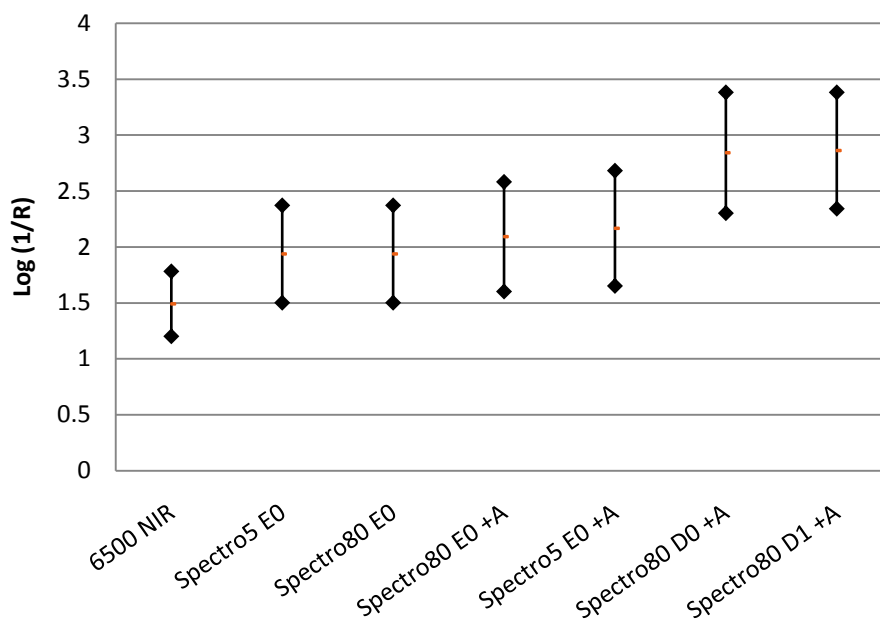
Se evaluó la diferencia entre los espectros promedio de 54 espectros (*Set 15*) analizados con siete modos distintos (Figura 4.17).



**Figura 4.17.** Estudio comparativo de diferentes modos NIRS: *6500 NIR*, *Spectro5 E0*, *Spectro5 E0 +A*, *Spectro80 E0*, *Spectro80 E0 +A*, *Spectro80 D0 +A* y *Spectro80 D1 +A*. Espectros promedio de 54 espectros de leche, agrupados por modo de análisis.

En base a los resultados de apartados anteriores y los presentes en la Figura 4.18 es posible concluir que:

1. Los modos *Spectro5 E0* y *Spectro80 E0* presentaron espectros muy similares. Este comportamiento también se observó en los modos *Spectro80 E0 +A* y *Spectro5 E0 +A*. No obstante los modos de análisis con menor número de escaneos por muestra presentaron más ruido en sus espectros.
2. Los modos que emplearon la cubeta de paso óptico estrecho (1 mm) presentaron un pico saturado en torno a la banda de absorción del agua (1940 nm). Este fenómeno es mayor en los modos que utilizan una referencia interna (E) en lugar de una externa (D).
3. Se observaron diferencias entre la altura de los espectros. Los modos de análisis con la referencia interna inactiva y paso óptico estrecho (*Spectro80 D0 +A* y *Spectro80 D1 +A*) presentaron los valores de  $\log(1/R)$  más elevados de todos los modos de análisis. Los valores más bajos se hallaron en el modo *6500 NIR* del equipo de referencia FOSS NIRSystems (rango de  $\log(1/R)= 1,2-1,78$ ). Los modos *Spectro5 E0* y *Spectro80 E0* del equipo *on-line* presentaron los números más próximos al equipo de referencia *on-line* (rango de  $\log(1/R)= 1,5-2,38$ ) como se observa en la Figura 4.18.



**Figura 4.18.** Rango de valores en  $\log(1/R)$  de siete espectros NIR correspondientes siete modos de análisis.

4. Todos los parámetros analizados en este trabajo (rango de los espectros en el eje  $\log(1/R)$ ; saturación de espectro; pico de absorción en la banda 1940 nm; intensidad de luz reflejada por la muestra) indican que los espectros generados con el modo *Spectro80 E0* de microPHAZIR son los más similares a los espectros generados con el modo *6500 NIR* del equipo de referencia FOSS NIRSystems 6500.

En base a estos resultados se seleccionaron dos modos de análisis del equipo portátil MEMS-NIRS microPHAZIR: *Spectro80 E0* y *Spectro80 E0 +A* los cuales generaron espectros reproducibles de calidad aceptable según muestran los diferentes parámetros analizados en el presente trabajo.

## 4.5 Repetibilidad y reproducibilidad espectral

Uno de los aspectos más críticos en el desarrollo de una calibración NIRS y de mayor influencia en la precisión y exactitud de la calibración desarrollada, es el relacionado con la preparación de muestra y presentación de la muestra al instrumento (Williams, 1987; Williams y Norris, 2001b), y el modo instrumental de análisis.

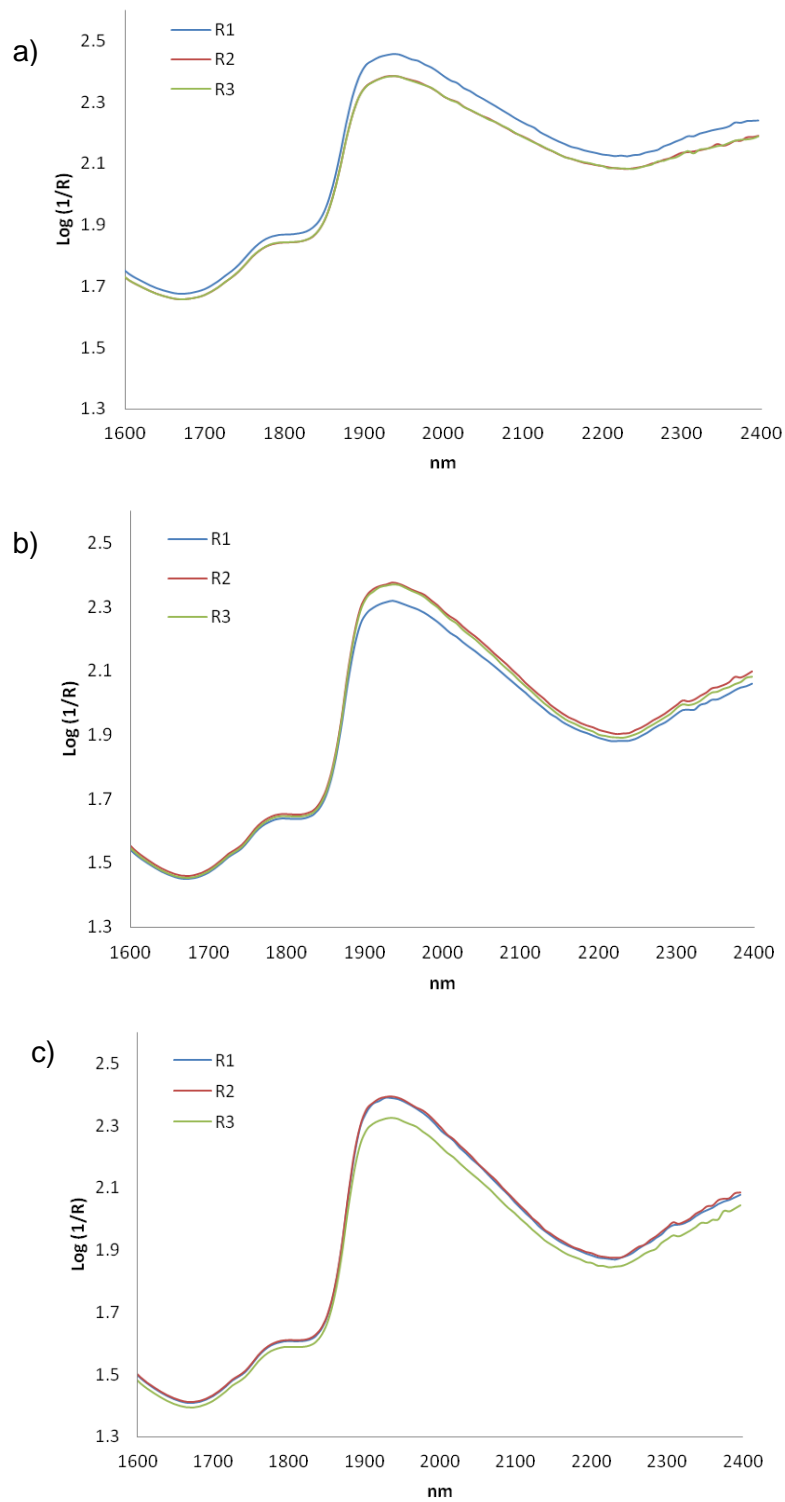
Por ello, una vez realizada la selección cualitativa de aquellos métodos instrumentales que nos permitieron obtener espectros reproducibles y similares a los de referencia (recogidos con el equipo FOSS NIRSystems 6500), el siguiente paso fue evaluar la repetibilidad y reproducibilidad del análisis espectral. Para ello se utilizó el estadístico RMSC, como medida de similitud entre espectros. Los espectros fueron analizados en modo *Spectro80 E0* y en modo *Spectro80 E0 +A* de microPHAZIR.

### 4.5.1 Estudio de factores que afectan a la repetibilidad espectral

#### ***Modo Spectro80 E0***

Las muestras de leche fueron analizadas mediante el modo del equipo portátil *Spectro80 E0*. Este modo realiza 80 barridos sobre la muestra para generar un espectro promedio final, tiene la referencia interna del equipo activa y por tanto utiliza una medida espectral interna como fondo, además el parámetro interno del instrumento que limita la capacidad de detección de intensidad de luz de la muestra se fijó en 0. Otra de las características de este modo es que no se emplea el adaptador para líquidos, sino que se realizan medidas directas sobre una cubeta.





**Figura 4.19.** Espectros NIR de tres muestras de leche individual: 110T2 (a), 110M2 (b) y 721M2 (c) y tres réplicas analizadas en modo *Spectro80 E0*.

Los resultados del primer análisis estadístico RMSC mostraron que existían diferencias apreciables entre los valores de las réplicas de cada una de las muestras de leche analizadas en distintos días, observándose valores de RMSC (incluyendo los

valores aberrantes) entre 1639 y 16536. Los valores más elevados de RMSC se encontraron para las muestras: 110T del segundo día, donde la réplica 1 mostró diferencias respecto a las réplicas 2 y 3 (Figura 4.19a); 110M del segundo día, donde la réplica 1 mostró diferencias respecto a las réplicas 2 y 3 (Figura 4.19b); y 721M del segundo día, donde la réplica 3 mostró diferencias respecto a las réplicas 1 y 2 (Figura 4.19c).

Se utilizaron 6 muestras de leche de vaca individuales (*Set 15*), que fueron analizadas por triplicado para evaluar la repetibilidad, en tres días consecutivos para el análisis de reproducibilidad intermedio.

Los valores de RMSC superiores a 13000y muy alejados de la media (RMSC= 2 x Valor medio) podrían corresponder a una mala recogida del espectro (por ejemplo el movimiento del equipo durante la recogida del espectro) y se han considerado aberrantes. Tras eliminar estos valores aberrantes y recalcular el RMSC la repetibilidad espectral mejoró considerablemente como se observa en la Tabla 4.2. El promedio del RMSC se redujo hasta un valor de RMSC de 5309.

En la Tabla 4.2 se recogen los valores de RMSC, Media (X) y SD para evaluar la repetibilidad de la señal espectral con la información recogida en el *Set 15* y eliminación de valores aberrantes o anómalos.

**Tabla 4.2.** Valores de la raíz cuadrada del error cuadrático medio, la media y la desviación estándar de espectros NIR para 6 muestras de leche individuales analizadas durante 3 días con el modo *Spectro80 E0* de microPHAZIR.

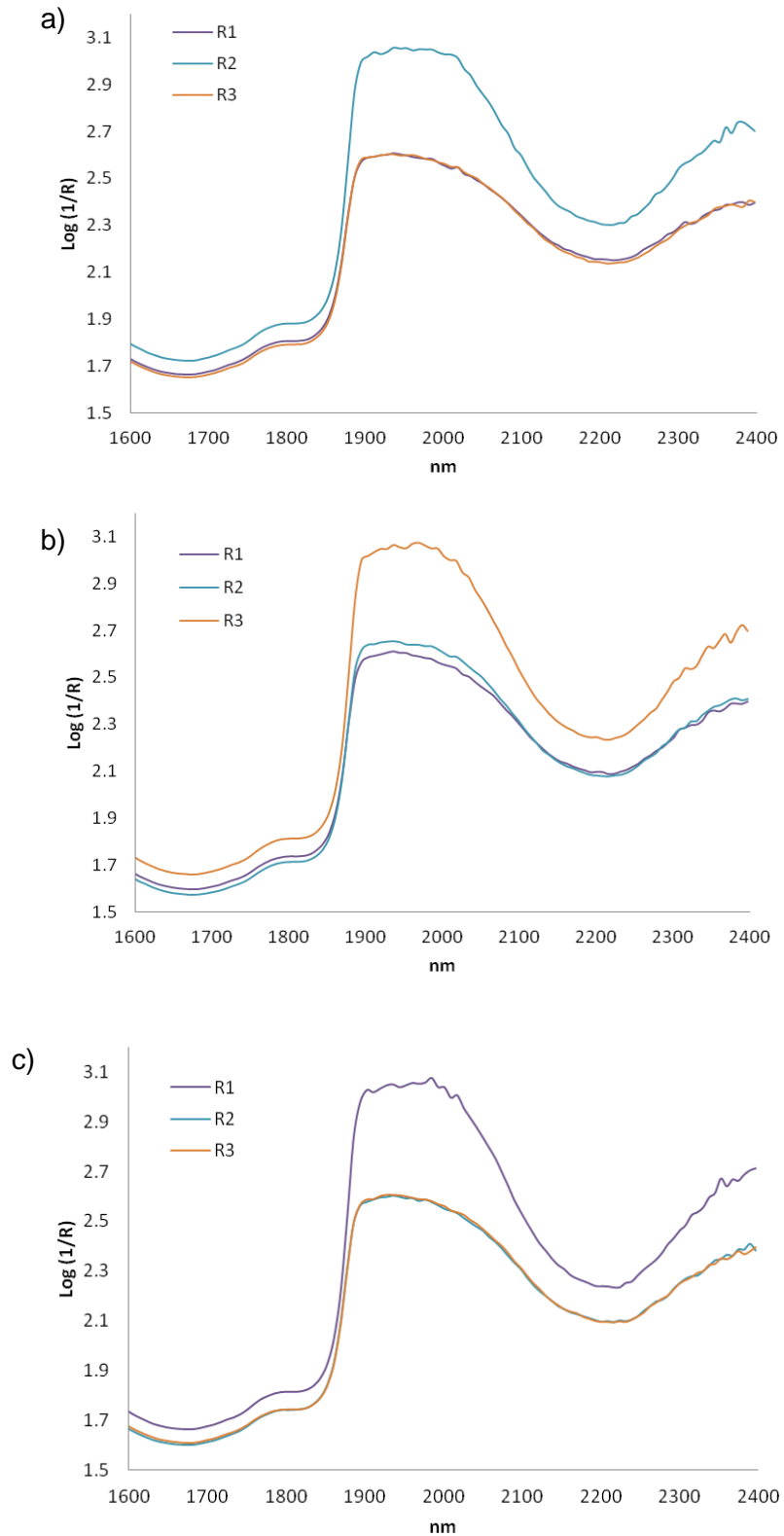
Muestras	Día	RMSC				
		RÉPLICAS			X	SD
		1-2	1-2	2-3		
110T	1	8500	5221	10465	8062	2649
110T	2	-	-	1639	1639	-
110T	3	2900	11682	11219	8600	4942
110M	1	10016	11176	2419	7870	4756
110M	2	-	-	3398	3398	-
110M	3	6182	7573	2076	5277	2858
721T	1	3050	2827	2420	2766	319
721T	2	8533	6809	3355	6232	2637
721T	3	2148	6919	6147	5071	2561
721M	1	3575	4203	1721	3166	1290
721M	2	2223	-	-	2223	-
721M	3	4535	6389	3260	4728	1573
723T	1	7723	5750	9633	7702	1942
723T	2	2290	12272	11728	8763	5613
723T	3	6227	2077	6518	4941	2484
723M	1	3646	3267	4852	3922	828
723M	2	5119	7862	3442	5474	2231
723M	3	5160	3930	8063	5718	2122
Promedio:		5114	6530	5433	5309	2587

-: Valores aberrantes eliminados.

RMSC: Raíz cuadrada del error cuadrático medio.

X: Valor promedio de RMSC.

SD: Desviación estándar.



**Figura 4.20.** Espectros NIR de tres muestras de leche individuales: 721M3 (a), 723T3 (b) y 723M3 (c) y tres réplicas analizadas en modo *Spectro80 E0 +A*.

**Modo Spectro80 E0 +A**

Las muestras de leche fueron analizadas mediante el modo del equipo portátil *Spectro80 E0 +A*. Este modo de microPHAZIR tiene fijadas las mismas características que el modo *Spectro80 E0* evaluado en el apartado anterior. Su principal diferencia es la utilización del adaptador para líquidos del equipo portátil junto a una cubeta de cuarzo con paso óptico de 1 mm, como forma de presentación de muestra al equipo.

Los resultados de los análisis estadísticos RMSC iniciales, mostraron que existían diferencias apreciables entre los valores obtenidos entre las réplicas de cada una de las muestras de leche analizadas en distintos días, observándose valores de RMSC entre 3324-144183. Los valores más elevados de RMSC (incluyendo los valores aberrantes) se encontraron para las muestras: 721M del tercer día, donde la réplica 2 mostró diferencias significativas respecto a las réplicas 1 y 3 (Figura 4.20a); 723T del tercer día, donde la réplica 3 mostró diferencias significativas respecto a las réplicas 1 y 2 (Figura 4.20b); y 723M del tercer día, donde la réplica 1 mostró diferencias significativas respecto a las réplicas 2 y 3 (Figura 4.20c).

En la tabla 4.2 se recogen los valores de RMSC, Media y SD para evaluar la repetibilidad de la señal espectral con la información recogida en el Set 15 y eliminación de valores aberrantes o anómalos.

Siguiendo la estrategia anterior, los valores de RMSC alejados de la media (RMSC=24846, incluyendo valores aberrantes), que podrían corresponder a una mala recogida del espectro de la leche en el momento del análisis se eliminaron para la comparación de los resultados. Tras eliminar los valores aberrantes y recalcular el RMSC la repetibilidad espectral mejoró considerablemente como se observa en la tabla 4.3. El promedio del RMSC se redujo hasta un valor de 11190.

No existen en la bibliografía revisada ensayos similares de repetibilidad que permitan comparar estos resultados con los obtenidos por otros autores.

**Tabla 4.3.** Valores de la raíz cuadrada del error cuadrático medio, la media y la desviación estándar de espectros NIR para 6 muestras de leche individuales analizadas durante 3 días con el modo *Spectro80 E0 +A* de microPHAZIR.

Muestras	Día	RMSC				
		RÉPLICAS			X	SD
		1-2	1-3	2-3		
110T	1	6504	8550	4135	6396	2209
110T	2	8169	6590	3324	6028	2471
110T	3	5772	5772	-	5772	-
110M	1	6823	4203	5809	5612	1321
110M	2	7857	10170	5648	7892	2261
110M	3	10280	17999	9799	12693	4602
721T	1	6078	12163	10146	9462	3100
721T	2	5710	4936	5645	5430	429
721T	3	8494	8496	6590	7860	1100
721M	1	9628	8368	3990	7329	2959
721M	2	11977	24930	14288	17065	6909
721M	3	-	8350	-	8350	-
723T	1	7013	7668	4045	6242	1931
723T	2	62077	7010	56419	41835	30292
723T	3	27761	-	-	27761	-
723M	1	16380	5403	16147	12643	6271
723M	2	7755	4502	7800	6686	1891
723M	3	-	-	6363	6363	-
Promedio:		13017	9069	10677	11190	4839

-: Valores aberrantes eliminados.

RMSC: Raíz cuadrada del error cuadrático medio.

X: Valor promedio de RMSC.

SD: Desviación estándar.

A la vista de los resultados podemos afirmar que el modo *Spectro80 E0* ofreció mejor repetibilidad que el modo *Spectro80 E0 +A* con adaptador, de este modo, según los datos aquí obtenidos sería el modo más recomendable para el análisis de leche líquida cruda *on-site* con el equipo portátil microPHAZIR. Por otro lado este modo de análisis tiene una metodología de aplicación sencilla, ya que basta con tomar una muestra de leche homogénea directamente del bote de recolección y transferirla a la cubeta de análisis.

#### 4.5.2 Estudio de factores que afectan a la reproducibilidad espectral

##### **Modo *Spectro80 E0***

Para evaluar la reproducibilidad de los métodos de análisis empleados, se utilizaron 18 espectros promedio de 6 muestras de leche, resultado del análisis en modo *Spectro80 E0* y 18 espectros promedio de leche, resultado del análisis en modo

*Spectro80 E0 +A* de microPHAZIR en tres días consecutivos. En la Tablas 4.4 y 4.5 se representaron los valores de RMSC para espectros de los días 1, 2 y 3, para los diferentes métodos instrumentales de análisis sin y con adaptador.

A partir de los datos reflejados en la tabla 4.4 se desprende que existen diferencias apreciables entre los valores obtenidos del análisis de las muestras de leche medidas en distintos días, observándose valores de RMSC (sin valores aberrantes) entre 1878-6843.

**Tabla 4.4.** Valores de RMSC, MEDIA y SD de espectros promedio NIR para 6 muestras de leche individuales analizadas durante 3 días con el modo *Spectro80 E0* de microPHAZIR.

Muestras	RMSC				
	DÍAS			X	SD
	1-2	1-3	2-3		
110T	2020	1878	3133	2344	687
110M	3066	5765	6359	5063	1755
721T	5531	9132	4138	6267	2577
721M	6843	4569	7147	6186	1409
723T	4156	3435	6205	4599	1437
723M	5940	5114	1948	4334	2107
Promedio:	4593	4982	4822	4799	1662

RMSC: Raíz cuadrada del error cuadrático medio.

X: Valor promedio de RMSC.

SD: Desviación estándar.

### **Modo *Spectro80 E0 +A***

Los resultados observados en la Tabla 4.5 indican que existen diferencias apreciables entre los valores obtenidos del análisis de las muestras de leche medidas en distintos días, observándose valores de RMSC (sin valores aberrantes) entre 4220-185645. Los valores más elevados para RMSC se observaron en las muestras de leche 110T y 721T, donde el tercer día presentó valores más elevados que los días de análisis 1 y 2 (Figuras 4.21a y b).

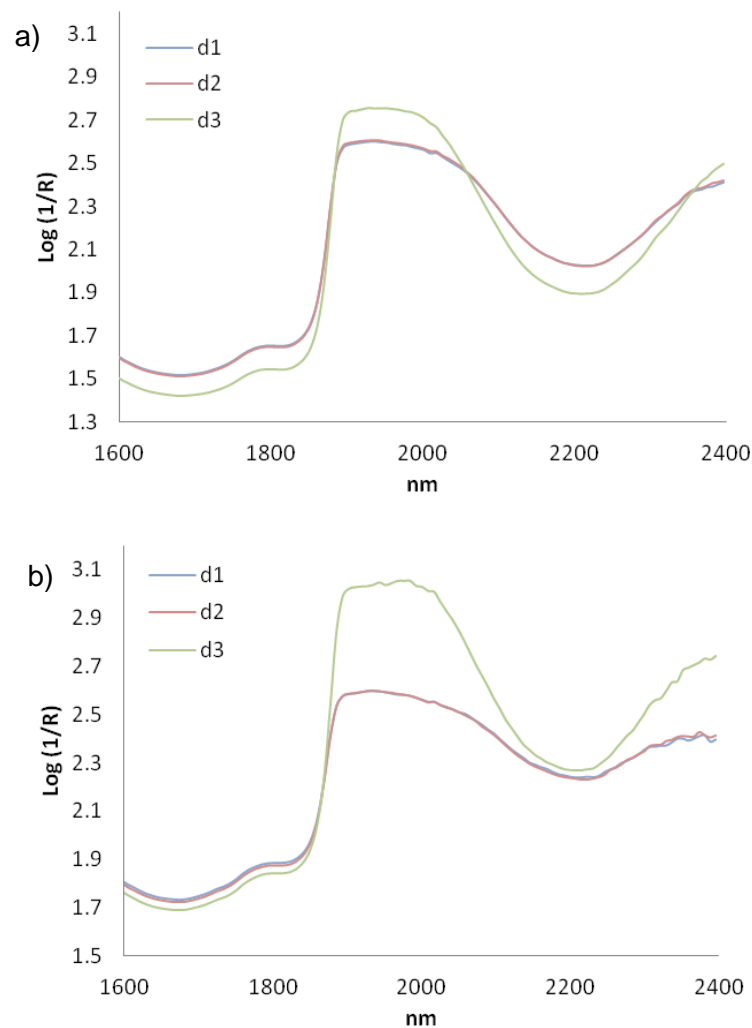
**Tabla 4.5.** Valores de RMSC, MEDIA y SD de espectros promedio NIR para 6 muestras de leche individuales analizadas durante 3 días con el modo *Spectro80 E0 +A* de microPHAZIR.

Muestras	RMSC				
	DÍAS			X	SD
	1-2	1-3	2-3		
110T	5336	53077	49580	35998	26611
110M	9092	35546	28858	24499	13755
721T	5943	185645	182008	124532	102717
721M	17079	41583	27928	28863	12279
723T	23076	50556	32518	35383	13962
723M	4220	32213	30597	22343	15716
Promedio:	10791	66437	58582	45270	30840

RMSC: Raíz cuadrada del error cuadrático medio.

X: Valor promedio de RMSC.

SD: Desviación estándar.



**Figura 4.21.** Espectros promedio NIR de muestras de leche individual: 110T (a) y 721T (b) analizados en tres días consecutivos en modo *Spectro80 E0 +A*.



Como se puede observar, la Tabla 4.6 muestra los promedios generales de los dos modos de análisis.

**Tabla 4.6.** Valores promedio de RMSC y SD de espectros promedio NIR con los modos *Spectro80 E0* y *Spectro80 E0 +A* de microPHAZIR.

<b>MUESTRA*</b>	<b>X</b>	<b>SD</b>
Promedio <i>Spectro80 E0:</i>	4799	1662
Promedio <i>Spectro80 E0 +A:</i>	45270	30840

X: Valor promedio de RMSC.  
SD: Desviación estándar

A la vista de los resultados, se puede afirmar que la utilización del adaptador con la cubeta de 1 mm, reduce sensiblemente la precisión del análisis, siendo por tanto más reproducible el ensayo tras el uso de la cubeta de 17 mm y recogida directa sobre la misma de la información espectral.

Por todo ello, podemos afirmar que el modo *Spectro80 E0* es el más recomendable para el análisis de leche líquida cruda.

## 5 ESTUDIO ECONÓMICO

Como se comentó en apartados anteriores la utilización de equipos portátiles MEMS-NIRS *on-site* para evaluar la calidad de la leche en tiempo real en las ganaderías permitiría a los propios ganaderos tomar decisiones rápidas sobre el producto primario y generar un producto de calidad con mayores beneficios, uniendo esta tecnología a sistemas de gestión para explotar todo el potencial que ofrece la gran información que puede aportar la tecnología NIRS (Heaney, 2011).

En este punto se evaluará el presupuesto necesario para llevar a cabo la implantación de la tecnología MEMS-NIRS a nivel industrial, cooperativa o para una explotación ganadera concreta.

### **Equipos de análisis de leche tradicionales**

Actualmente los equipos más utilizados para análisis automatizados basados en tecnología infrarroja son: BactoScan FC, MilkoScan (Foss-Eelctric A/C Hillerod, DK), Fossomatic, y la combinación de los dos últimos en el equipo Combifoss FT. Los precios aproximados de los equipos se muestran en la Tabla 5.1 (García, 2002). Estos equipos requieren de personal especializado para la aplicación de la técnica además de costes elevados de adquisición, a lo cual se suma el número limitado de industrias y cooperativas que poseen laboratorio propio. Por otro lado, aunque la respuesta de los equipos *at-line* de los laboratorios es relativamente rápida, es imprescindible el transporte de la muestra hasta el laboratorio de análisis. Con los equipos *on-site* sería posible realizar controles inmediatos en tiempo real que mejorarían la sistemática de control de los procesos a nivel industrial y de producción.

**Tabla 5.1.** Precios aproximados de equipos de análisis de leche para el año 2002 a partir de datos facilitados por Foss Electric S.A.).

Instrumento	Precio (€)	Tiempo de respuesta
<b>Equipos de análisis de leche</b>		
MilkoScan FT 6200	125.000	24h
Fossomatic 5200	110.000	24h
Combifoss FT 6200	218.000	24h
BactoScan FC 100	200.000	24h
AMS + Sensor NIRS	AMS+50.000	Tiempo real
<b>Equipos de análisis de leche alternativos</b>		
MicroPHAZIR	25.000	Tiempo real
AMS: Sistema de Ordeño Automático		García (2002)
FT: Transformada de Fourier		

El presente estudio económico se ha elaborado en base a los precios públicos del Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA) y del Laboratorio Interprofesional Lechero y Agroalimentario (LILA).

A continuación, se describe equipo y accesorio utilizados y evaluado en el presente trabajo, el coste por unidad y el precio total, expresado en euros (€).

### ***Equipo con potencial analítico de leche: microPHAZIR***

El equipo evaluado en el presente trabajo es un equipamiento NIRS portátil, de nueva generación y ligero, que permite la recogida de información espectral de leche *on-site* para el posterior desarrollo de modelos quimiométricos que permitan cualificar y cuantificar las características físico-químicas de la leche de vaca en las propias ganaderías para impulsar la innovación y calidad de la producción de materias primas.

**Tabla 5.2.** Coste inicial del instrumento microPHAZIR y accesorios.

<b>Instrumento</b>	<b>Coste (€)</b>
microPHAZIR	25000,00
Cubeta líquidos FOSS	1520,00
Total	26.520,00
Total +IVA (21%)	32.089,00 €

Para el análisis de muestras de leche se utilizó una cubeta para líquidos opacos FOSS como forma de presentación de muestra. Este tipo de cubetas tienen un alto coste, no obstante, existe la posibilidad de utilizar otro tipo de cubeta más económica e igualmente válida para los análisis NIRS con el equipo portátil MEMS-NIRS.

### ***Valoración general***

Se realizó una valoración económica sobre el supuesto de una explotación ganadera que incluye 50 vacas y que debe realizar dos análisis para el control de calidad por vaca individual a la semana, con un total de 100 muestras/semana, para los cálculos se emplearon las tasas aplicadas por el LILA para el control de calidad en rutina de leche cruda (25€/10 muestras), el coste del equipo y los complementos necesarios para realizar los análisis y la contratación de una empresa externa para la calibración del equipo. En la tabla 5.3 se encuentran los cálculos realizados.

**Tabla 5.3.** Cálculo de Tiempo de amortización de la inversión inicial en el equipo portátil microPHAZIR para una explotación ganadera con 50 vacas.

	N		Base Imponible	Base Imponible + IVA
	Vacas	Muestras		
Coste análisis Leche (LILA)		1	2,27 €	2,50 €
Coste Equipamiento			26.520,00 €	32.089,20 €
Coste Subcontratación de empresa para calibración del equipo			6.000,00 €	7.260,00 €
Número de muestras a analizar para amortización del equipo		14326		
Muestras a analizar en una ganadería: 2 muestras/vaca .semana	50	100		

**Tiempo de amortización del equipo: 2 años y 9 meses**

Por otro lado, se establecen controles de calidad de la leche que son utilizados por la industria para realizar los pagos a los ganaderos. De forma rutinaria se recogen muestras de leche para análisis de calidad procedente del tanque general de recolección. El precio del producto varía en función de la calidad de la misma, que está determinada por sus características físico-químicas, higiénicas, etc. El contenido en grasa total y proteína son los parámetros más críticos, ya que valores por encima o por debajo de un valor establecido, el cual es fijado por la empresa que compra la leche a los ganaderos, genera primas o penalizaciones. Ver tabla 5.4.

**Tabla 5.4.** Penalización y primas económicas a los ganaderos establecidos por el Grupo CAPSA para el año 2014.

Parámetro de Calidad	Límite	Penalización/Prima €/1000L
Grasa total	<3,70%>	-21,00
Proteína	<3,10%>	-42,10
Células somáticas	<200.000 cel.	+15,00
	>400.000 cel.	-10,00
Bacterias	<50.000 cel.	+15,00
	>100.000 cel.	-10,00

## 6 CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se desprenden de la investigación realizada y metodologías propuestas de este trabajo fin de Máster son:

1. El protocolo diseñado para el correcto análisis espectral de leche líquida de bovino con un equipo MEMS-NIRS proporciona las pautas necesarias para un correcto uso de este tipo de equipos y la adquisición de espectros representativos del producto y con alta calidad espectral.
2. Para asegurar una alta repetibilidad de los datos espectroscópicos NIRS de leche cruda con un equipo MEMS-NIRS es necesario tomar 80 escaneos/muestra, sin pretratamiento previo de la muestra y con referencia interna activa.
3. La utilización del adaptador para el análisis de líquidos que incluye el instrumento, genera datos espectrales menos precisos que cuando el análisis se realiza sobre una cubeta de cuarzo y fondo de aluminio.
4. Un valor superior de RMSC a  $6000 \mu\log(1/R)$  de repetibilidad y de reproducibilidad es indicativo de baja calidad espectral para este tipo de análisis in situ de leche cruda bovina.
5. Los resultados de optimización del análisis de leche cruda con un equipo portátil MEMS-NIRS aseguran el control de calidad *in-situ* en la propia explotación de una forma sostenible, eficiente, rápida, competitiva, segura, de bajo coste, fiable e individual. Esto permite incrementar los actuales controles de calidad, que se realizan de forma rutinaria, de forma que se pueda garantizar un pago por calidad al ganadero.

## 7 ABREVIATURAS

**A:** Absorbancia

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**AG:** Ácidos grasos

**AGM:** Ácidos grasos monoinsaturados

**AGS:** Ácidos grasos saturados

**AMS:** Sistema de ordeño automático

**AOTF:** Filtro acústico-óptico modulable

**EMSC:** Corrección de la dispersión (*Scatter Correction*)

**ETF:** Filtro sintonizable eléctricamente

**FFA:** Ácidos grasos libres (*Free Fatty Acids*)

**FIR:** Infrarrojo lejano (*Far Infrared*)

**FPD:** Punto crioscópico (*Freezing Point Depression*)

**ICT:** Tecnologías de información y comunicación

**InAs:** Detector de Arseniuro de Indio

**InAs:** Detector de Indio y Arsénico

**InGaAs:** Detector de Arseniuro de Indio y Galio

**InSb:** Detector de Antimoniuro de Indio.

**InSb:** Detector de Indio y Antimonio

**IR:** Infrarrojo (*InfraRed*)

**L:** Lectura de muestra o detección de intensidad de muestra

**LCD:** pantalla de cristal líquido (*Liquid crystal display*)

**LED:** Diodos emisores de luz (*Light Emitting Diode*)

**LTF:** Filtro de líquido de cristal sintonizable

**LVF:** Filtro lineal variable

**MEAN:** Media

**MEMS:** Sistema micro-electro-mecánico (*Micro-Electro-Mechanical System*)

**MIR:** Infrarrojo medio (*Mid InfraRed*)

**MOEMS:** Sistema micro-opto-electro-mecánico

**NIR:** Infrarrojo cercano (*NearInfraRed*)

**NIRS:** Espectroscopía de infrarrojo cercano (*Near Infrared Spectroscopy*)

**PbS:** Sulfuro de plomo

**PC:** Ordenador (*Personal Computer*)

**PLS:** Mínimos cuadrados parciales (*Partial Least Squares*)

**PLTL:** Energía de muestra demasiado baja (*Power Level Too Low*)

**PO:** Paso óptico

**R:** Reflectancia

**R<sup>2</sup>:** Coeficiente de determinación de la calibración

**r<sup>2</sup>:** Coeficiente de determinación de validación cruzada

**RCS:** Recuento de células somáticas

**RLM:** Regresión lineal múltiple

**RMS:** Raíz media cuadrática (*Root Mean Square*)

**RMSC:** Raíz media cuadrática corregida (*Root Mean Square and correction*)

**SD o STD:** Desviación estándar

**Si:** Silicio

**SnG:** Sólidos no grasos

**SNR:** Relación señal/ruido (*Signal to Noise Ratio*)

**SNV:** *Standard Normal Variate*

**SNVD:** *Standard Normal Variate and Detrending*

**ST:** Sin tratamiento

**T:** Transflectancia

**UMTS:** Sistema móvil universal de telecomunicaciones





## 8 BIBLIOGRAFÍA

- ABNEY W. Y FESTING E.R.. *On the influence of the atomic grouping in the molecules of organic bodies on their absorption in the infra-red region of the spectrum*. Philosophical Transactions of the Royal Society, 172, p. 887 (1881).
- AERNOUITS B., POLSHIN E., LAMMERTYN J. Y SAEYS W.. *Visible and near-infrared spectroscopic analysis of raw milk for cow health monitoring: reflectance or transmittance?*. Journal of Dairy Science, 94, p. 5315 (2011).
- AHMED W. Y GOLDSTEIN M.. *Analytical applications of reflectance spectroscopy in the near-infrared region: A method for quality control of fat in dried milk*. Laboratory Practice, 25, p. 385 (1976).
- AL-QADIRI H.M., LIN M., AL-HOLY M.A., CAVINATO A.G. Y RASCO B.A.. *Monitoring quality loss of pasteurized skim milk using visible and short wavelength near-infrared spectroscopy and multivariate analysis*. Journal of Dairy Science, 91, p. 950 (2008).
- ANDUEZA D., COPPA D., AGABRIEL C. CONSTANT I. LOMBARDI G. Y MARTIN B.. *Using NIR spectroscopy to determine cow diet and geographical origin from milk samples*. Grassland in a Changing World: Proceedings of the 23rd General Meeting of the European Grassland Federation, Kiel, Germany, Ed by H. Schnyder, J. Isselstein, F. Taube, K. Auerswald, J. Schellberg, M. Wachendorf, A. Herrmann, M. Gierus, N. Wrage and A. Hopkins, p. 449 (2010).
- ASIMOPOULOS G. Y POPE J.M.. *On-line monitoring of dairy products with the use of NIR technology*. Food processing automation II, Proceedings of the 1992 conference, Lexington, Kentucky, Food and Process Engineering Institute. ASAE: 266 (1994).
- ASTM. *Standard practices for infrared, multivariate, quantitative analysis*. ASTM Annual book of standards. Standard E1655-94. ASTM, West Conshohocken, PA, USA. (1994).
- AULRICH K. Y MOLKENTIN J. (2009). *Potential of near infrared Spectroscopy for differentiation of organically and conventionally produced milk*. Landbauforschung – vTI Agriculture and Forestry Research, 59, p. 301 (2009).
- BAER R.J., FRANK J.F. Y LOWENSTEIN M.. *Compositional Analysis of Nonfat Dry Milk b using Near Infrared Diffuse Reflectance Spectroscopy*. Association of Official Analytical Chemists, 66, p. 858 (1983).

- BARNES R.J., DHANOA M.S. Y LISTER S.J.. *Standard Normal Variate transformation and D-trending of near infrared diffuse reflectance spectra*. Applied Spectroscopy, 43, p. 772 (1989).
- BARTON F.E.. *Theory and principles of near infrared spectroscopy*. Near Infrared Spectroscopy. Eds A.M.C. Davies y R.K. Cho. NIR Publications, Chichester, UK, p. 1 (2002).
- BEEBE K.R., PELL R.J. Y SEASHOLTZ MB (1998). *Chemometrics: a Practical Guide*, John Wiley, New York.
- BERTRAND, D.. *Data pre-treatment and original analysis in spectroscopy. Advanced Comet Chemometrics School*. Libramont Belgium, April 26-28, 1993 (1993).
- BERTRAND, D. Y DUFOUR, E.. *La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques*. Editions TEC & DOC, Paris, France. (2000).
- BIRTH G.S., NORRIS K.H.. *An instrument using light transmittance for non-destructive measurement of fruit maturity*. Food Technology, 12, p. 592 (1958).
- BOGOMOLOV A., MELENTEVA A. Y DAHM D.J. (2013). *Fat globule size effect on visible and shortwave near infrared spectra of milk*. Journal of Near Infrared Spectroscopy, 21, p. 435 (2013).
- BOHREN C.F. Y HUFFMAN D.R.. *Absorption and Scatter of Light by Small Particles*. John Wiley & Sons Inc., New York, USA, p. 311 (1983).
- BRENNAN D., ALDERMAN J., SATTLER L., O'CONNOR B. Y O'MATHUMA C.. *Issues in development of NIR micro spectrometer system for on-line process monitoring of milk product*. Measurement, 33, p. 67 (2003).
- BURNS, D.A. Y CIURCZAK, E.W.. *Handbook of near infrared analysis*. Burns, D. A. and Ciurczak, E.W. (eds.) Marcel Dekker, New York, NY, USA.(1992).
- BUXADÉ C.. *Zootecnia. Bases de Producción Animal. Tomo VIII. Producción Ovina*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. (1996).
- CABASSI G., PROFAIZER M., MARINONI L., RIZZI N. Y CATTANEO T.M.P.. *Estimation of milk using a inverse light scattering model on NIR spectra*. Journal of Near Infrared Spectroscopy, 21, p. 359 (2013).

- CAO N., HAN D. Y HURBURGH C.R.. *Determination of fat, protein and lactose in raw milk using shortwave NIR transmission*. Proceedings of the 14th International Conference on NIR Spectroscopy. IM Publications, Chichester, UK. (2010).
- CATTANEO T.M.P., CABASSI G., PROFIZER M. Y GIANGIACOMO R. (2009). *Contribution of light scattering to near infrared absorption in milk*. Journal of Near Infrared Spectroscopy. 17, p. 337 (2009).
- CATTANEO T.M.P., FELINGINI M., BONIZZI I., GIANGIACOMO R. Y BARZAGHI S.. *Testing the ability of FT-NIR to determine the aS1-casein and b-casein content in individual milk samples*. Proceedings of the 14th International Conference on NIR Spectroscopy. IM Publications, Chichester, UK. (2010).
- CE Nº 882/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 29 de abril de 2004 sobre los controles oficiales efectuados para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre salud animal y bienestar de los animales.
- CEN H. Y HE Y.. *Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality*. Trends in Food Science and Technology, 18 (2), p. 72 (2007).
- CHEN A.O., CHEN Y-S Y HSIEH N.. *Quantitative analysis of composition by near infrared spectroscopy and price estimation on raw bovine milk*. Journal Chin Agric Chem Soc 32: p. 384 (1994).
- CHEN J.Y., LYO C. Y KAWANO S.. *Development of calibration with sample cell compensation for determining the fat content of unhomogenised raw milk by a simple near infrared transmittance method*. Journal of Near Infrared Spectrosc, 7, p. 265 (1999).
- COPPA M., FERLAY A., LEROUX M., JESTIN M., CHILLIARD Y., MARTIN B. Y DANDUEZA D.. *Prediction of milk fatty acid composition by near infrared reflectance spectroscopy*. International Dairy Journal, 20, p. 182 (2010).
- COPPA M., MARTIN B., AGABRIEL C., CHASSAING C., SIBRA C., CONSTANT I., GRAULET B. Y DANDUEZA D.. *Authentication of cow feeding and geographic origin on milk using visible and near-infrared spectroscopy*. Journal of Dairy Science, 95, p. 5544 (2012).
- CORVAGLIA L., BATTISTINI B., PAOLATTI V., ACETI A. CAPRETTI M.G. Y FALDELLA G.. *Near-infrared reflectance analysis to evaluate the nitrogen and fat content of human milk in neonatal intensive care units*. Arch. Dis. Child Fetal Neonatal Ed. 93(5), p. F372. (2008).

- DAHM D.J.. *Explaining some light scattering properties of milk using representative layer theory*. Journal of Near Infrared Spectroscopy, 21, p. 323 (2013).
- DAVIES A.M.C.. *NIR instrumentation companies: the story so far*. NIR News, 10; p. 14 (1999).
- DAVIES A.M.C. Y GRANT A.. *Review: Near infra-red analysis of food. International*. Journal of Food Science and Technology, 22, p. 191 (1987).
- DAY D.R., BUTTER M.A., SMITH M.C., McALLISTER A., DEUTSCH E.R., ZAFRIRIOU K. Y SENTURIA S.D.. *Diffractive MEMS implementation of a Hadamard near-infrared spectrometer*. 13<sup>th</sup> International Conference on solid-state sensors, actuators and Microsystems, p. 1246 (2005).
- DE BOEVER J.L., COTTYN B.G., BRABANDER DE D.L. Y BOUCQUE C.V.. *Prediction of fat and protein content in individual cow milk by NIRS, preliminary results*. 3<sup>rd</sup> International NIRS Conference. Eds. R. Biston y T. Bartiaux. ARC-Publishing, Bruselas, Bélgica: 279. (1990).
- DE LA ROZA-DELGADO B.M.A.. *Real time analysis of fatty acids of dairy cow productions based on grazing strategies by Near Infrared Spectroscopy*. 2nd Feed for Health Conference. Noruega.(2010).
- DE LA ROZA-DELGADO, B., SOLDADO, A., GOMES DE FARIA, A.F., MARTÍNEZ FERNÁNDEZ, A. Y ARGAMENTERÍA, A.. *Assesing the value of a portable Near Infrared Spectroscopy sensor for predicting pork meat quality traits of "Asturcelta Autochthonous swine breed"* Food Analytical Methods. Food Analytical Methods, 7, p. 51 (2013).
- DHANO A M.S., LISTER S.J. SANDERSON R. Y BARNES R.J.. *The link between Multiplicative Scatter Correction (MSC) and standard Normal Variate (SNV) transformations of NIR spectra*. Journal of Near Infrared Spectroscopy, 2, p. 43 (1994).
- DOHOO I.R. Y MEEK A.H.. *Somatic cell counts in bovine milk*", Canadian. Veterinary Journal, 23, p. 119 (1982).
- DRACKOVA M., HADRA L., JANSTOVA B., NAVRATILOVA P., PRIDALOVA H. Y VORLOVA L.. *Analysis of goat milk by nearinfrared spectroscopy*. Acta Veterinaria Brno, 77, p. 415 (2008).
- ESTEVE L. Y HURBURGH C.. *A tutorial on near infrared spectroscopy and it calibration*. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 40, p. 246 (2010).

- FAGAN C.C., O'DONNELL C.P., RUDZIK L. Y WUST E..*Milk and dairy products*, Chapter 10 in *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*, Ed by D.W. Sun. Academic Press, New York, USA. (2009).
- FERNÁNDEZ V.. Métodos de procesamiento de la señal espectroscópica NIR: aplicación al análisis cuantitativo y cualitativo de productos agroalimentarios. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. (2003).
- FERNÁNDEZ V. Y GARRIDO A..*Interactance-Reflectance versus Reflectance NIRS analysis of grains and ground animal feeds. En Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 9th International Conference on Near-Infrared Spectroscopy*. Eds A.M.C. Davies y R. Giangiacomo.NIR Publications, Chichester, UK: 655 (2000).
- FERNÁNDEZ-AHUMADA E., GARRIDO VARO A., GUERRERO-GINEL J.E, PÉREZ-MARÍN Y FEARNT..*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, p.10135 (2008).
- FERNÁNDEZ-CABANÁS V. Y GARRIDO-VARO A..*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, p.113 (1999).
- FRANK J.F. Y BIRTH G.S..*Application of near infrared reflectance spectroscopy to cheese analysis*. Journal of Dairy Science, 65, p. 1110 (1982).
- FRANKHUIZE R..*NIR analysis of dairy products", Chapter 20, in Handbook of Near-Infrared Analysis, (3<sup>rd</sup> edition)*, Ed by D.A. Burns and E.W. Ciurczak.CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. (2008).
- GARRIDO A Y PÉREZ-MARÍN D..*Sensores NIRS para el control de procesos en la industria de los piensos compuestos*. Jornada tecnológica INTERAL. Aplicación de la tecnología NIRS en la industria agroalimentaria. Mejora de la calidad en los procesos productivos". Madrid. (2007).
- GARRIDO A..*La spectroscopie proche infrarouge: une technologie d'appui pour un "service intégral" en alimentation animale. En La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques*. Eds. D. Bertrand y E. Dufour.Technique and Documentation: p. 4473 (2000).
- GELLER Y..*Using MEMS technology for cost effective recycling of plastics*.Proceedings of SPIE, 6466. (2007).

- GELLER Y.. *A new approach to NIR spectroscopy allowing remote analysis*. LabPlus International (2006).
- GIANGIACOMO R. Y CATTANEO T.M.P.. *Dairy products*. Chapter 8.4, Near Infrared Spectroscopy in Food Science and Technology, Ed by Y. Ozaki, W.F. McClure and A.A. Christy. Hohn Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey, USA. (2007).
- GIBSON J.. *Altering milk composition through genetic selection*. Journal of Dairy Science, 72, p. 2815 (1989).
- GOULDEN J.D.S.. *Diffuse reflexión spectra of dairy products in the near-infrared region*. Journal of Dairy Research, 24, p. 242 (1975).
- GRAVERT H.O.. *Dairy Cattle Production*. Word Animal Science. Kaufmann. H Hagemeister (Eds), Edit. Elsevier Science Publisher. p. 107 (1987).
- HALL J.V. Y DE THOMASF.A.. *On-line analysis of dairy products by near-infrared spectroscopy*. En *Proceedings of International Seminar of Cheese yield and factors affecting its control*. International Dairy Federation, p. 222 (1993).
- HEANEY D.. *Discussions with the Feed and livestock Industry on the application and adoption of Near Infrared Spectroscopy*. Ramdomcross consulting. Canadá (2011).
- HENRY C.M.. *Near-IR gets the job done*. Analytical.Chemistry, 71, p. 625A (1999).
- HERSCHEL W.. *Investigation of the powers of the prismatic colours to heat and illuminate objects; with remarks, that prove the different refrangibility of radiant heat. To which is added, an inquirí into the method of viewing the sun advantageously, with telescopes of large apertures and high magnifying powers*. Philosophical Transactions of the Royal Society, 90, p. 255 (1800).
- HOLROYD S.E.. *The use of near infrared spectroscopy on milk and milk products*. Journal of near infrared spectroscopy, 21, p.311 (2013).
- HORLICK G.. *Digital data handling of spectra utilizing Fourier transformations*. Analytical Chemistry, 44(6), p. 943 (1972).
- IWAMOTO M.. *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.p. 175 (1991).
- JENSEN R.G..*Fatty acids in milk and dairy products.Fatty acids in foods and their health implications*. CK Chow (Ed). Marcel Dekker, New York, MY. p. 95 (1992).
- JOHNSON .A.H..*The composition of milk. En: Fundamentals of dairy Chemistry*. BH Webb. AH Johnson. JA Alford (Eds). Avi. Publ. Co., Westport, CT. p. 1 (1978).
- KALININ A.V. Y KRASHENINNIKOV V.N.. *Portable milk product quality analyzer based on spectrometry in the near IR range*.Journal of Applied Spectroscopy, 75, p. 288 (2008).
- KAWANO S.. *Sample presentations of near infrared analysis of intact fruits, single grains, vegetable juice, milk and other agricultral products. En Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 10<sup>th</sup> International Conference on Near-Infrared Spectroscopy*. Eds A.M.C. Davies y R.K. Cho. NIR Publications, Chichester, UK. p. 15 (2002).
- KAWASAKI M., KAWAMURA S., TSUKAHARA M., MORITA S., KOMIYA M., NATSUGA M..*Near-Infrared spectroscopy sensing system for on-line milk quality assessment in a milking robot*. Computers and Electronics in Agriculture, 63,p. 22 (2008).
- KAYE W.. *Near-infrared spectroscopy: I. Spectral identification and analytical applications*. Sprectochimica Acta, 6, p. 257 (1954).
- KRAMER..*Chemometric techniques for quantitative analysis*. New Cork: Marcel Dekker. (1998).
- LAPORTE M-F. Y PAQUIN P.. *Near-infrared analysis of fat, protein and casein in cow´s milk*. Journal of Agricultural Food Chemistry, 47, p. 2600 (1999).
- LEITNER G., LAVI Y. MERIN U., LEMBERSKIY-KUZIN L. Y KATZ G.. *Online evaluation of milk quality according to coagulation properties for its optimal distribution for industrial applications*. *Journal of Dairy Science*, 94, p. 2923 (2011).
- LOCK A.L.. *Optimising milk composition. Dairying: using science to meet consume´needs*, UK. p. 107 (2004).
- LYNDGAARD C.B., ENGELESEN S.B. Y VAN DEN BERG F.W.J..*Real-time modeling of milk coagulation using in-line near infrared spectroscopy*. Journal of Food Engieering, 108, p. 345 (2012).

- MARINONI L., MONTI L., BARZAGHI S. Y DE LA ROZA-DELGADO B.. *Quantification of casein fractions and of some of their genetic variants in phosphate buffer by near infrared spectroscopy*. Journal of near infrared spectroscopy, 21, p. 385 (2013).
- MARTENS H. Y MARTENS M.. *Multivariate analysis of quality: an introduction*. John Wiley and Sons. (2001).
- MARTÍNEZ M.L., GARRIDO A., DE PEDRO E.J. Y SÁNCHEZ L.. *Effect of simple heterogeneity on NIR meat analysis: the use of the RMS statistic*. Journal of Near Infrared Spectroscopy, 6, p. 313 (1998).
- MELFSEN A., HARTUNG E. Y HAEUSSERMANN A.. *Potential of individual cow scatter correction for an improved accuracy of near infrared milk composition analysis*, Journal of Near Infrared Spectroscopy, 20, p. 477 (2012b).
- MELSEN A., HARTUNG E. Y HAEUSSERMANN A.. *Accuracy of in-line milk composition analysis with diffuse reflectance near-infrared spectroscopy*. Journal of Dairy Science, 95, p. 6465 (2012a).
- MELSEN A., HARTUNG E. Y HAEUSSERMANN A. (2012c). *Accuracy of milk composition analysis with near infrared spectroscopy in diffuse reflection mode*. Biosystem Engineering, 112, p. 210 (2012c).
- MEPHAM T.. *Amino acid utilization by lactating mammary gland*. Journal of Dairy Science, 65, p. 287 (1982).
- MIDDELHOEK S.. *Celebration of the tenth transducers conference: the past, present and future of transducer research and development*. Sensors and Actuators B, 82, p. 2 (2000).
- MIYAZAKI M., KUROKI S., IKUTA K. Y TSENKOVA R.. *Diagnosis of physiological abnormalities using adaptive milk spectral model of individual cows*. Proceedings of the 14th International Conference on NIR Spectroscopy. IM Publications, Chichester, UK.(2010).
- MODROÑO S., SOLDADO A., MARTÍNZE-FERNÁNDEZ A., DE LA ROZA-DELGADO B.. *COST-“Feed for Health” joint Workshop Robustness of NIRS calibrations for transference to portable instruments*. XV International Feed Technology Simposium. (2012).
- NAES T., ISSAKSSON T., FEARN T. Y DAVIES T.. *A user-friendly guide to multivariate calibration and classification*. NIR Publications, Chichester, UK. (2002).



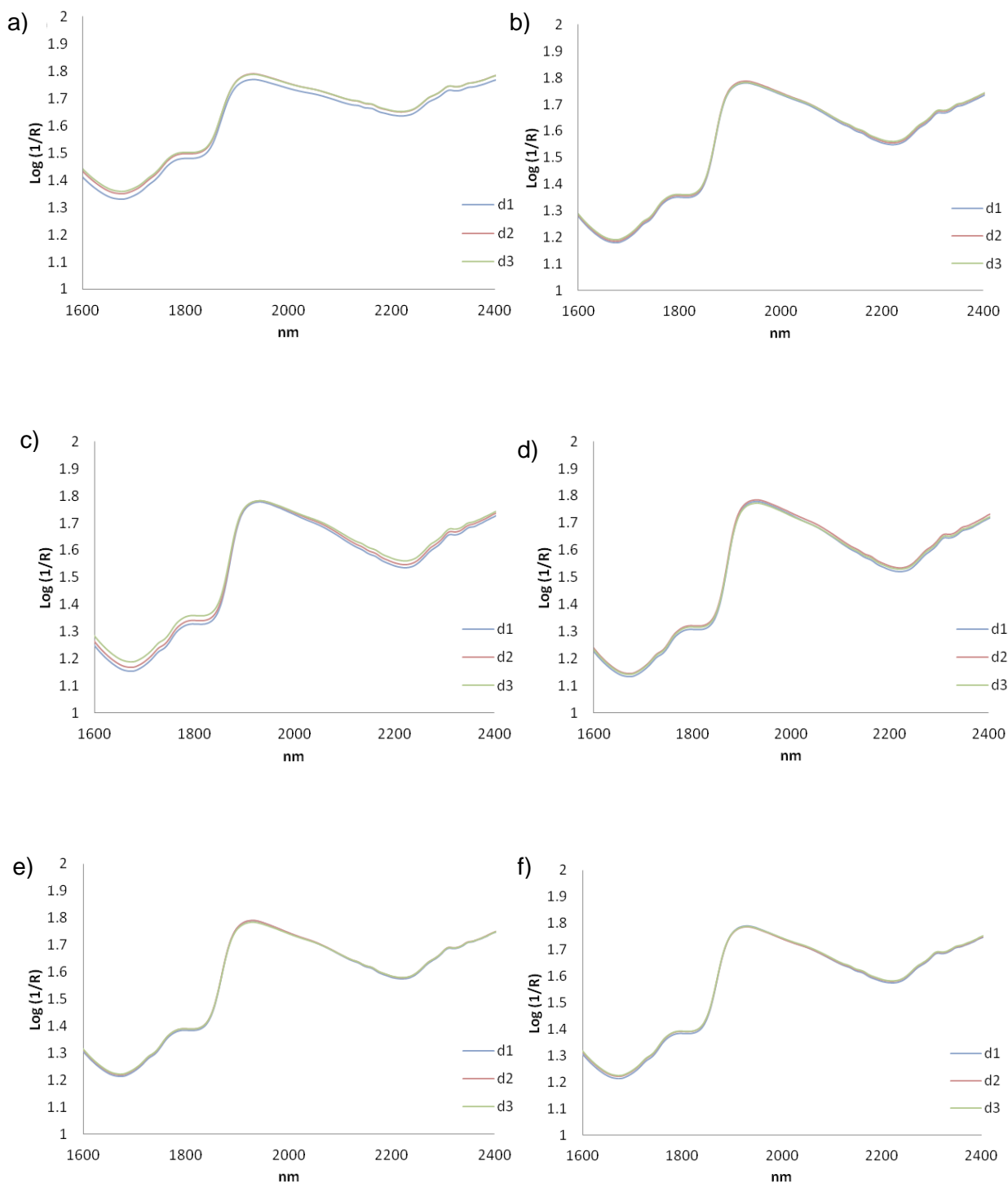
- NICOLAÏ B.M., BEULLENS K., BOBELYN E., PEIRS A., SAEYS W., THERON K.I. Y LAMMERTYN J.. *Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review*. *Postharvest Biology and Technology*, 46, p. 99 (2007).
- NOBLE D.. *Illuminating near-IR*. *Analytical Chemistry*, 67(23), p. 735A (1995).
- Núñez M.N. (2003). Control de calidad de leche y queso de oveja mediante espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS). Universidad de Córdoba. p.24.
- OSBORNE B.G.. *Near Infrared Spectroscopy in Food Analysis*. En R.A. Meyers (Ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK. (2000).
- OSBORNE B.G., FEARN T.A. Y HINDLE P.H.. *Practical NIR Spectroscopy with Applications in Food and Beverage Analysis*. Longman Scientific and Technical. London, UK. (1993).
- PAVIA D.L., LAMPMAN G.M. Y KRIZ G.S.. *Introduction to spectroscopy*. 3rd edition ed. Brooks/Cole. (2000).
- PENG D. XU K.X. Y SONG Y.. *Research on the robustness improvement of calibration model for measuring the contents of components in milk by multidimensional calibration in near-infrared spectroscopy*. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 29(4), p. 913 (2009). (in Chinese).
- PÉREZ-MARÍN D, SÁNCHEZ M.T., PAZ P., GONZALEZ-DUGOV. Y SORIANO M.A.. *Postharvest shelf-life discrimination of nectarines produced under different irrigation strategies using NIRS-spectroscopy*. *Food Science and Technology*, 44, p.1404 (2011).
- Prado N., F.I. V.. *On-site NIR spectroscopy to control the shelf life of pork meat*. *Food Analytical Methods*, 4, 582 (2011).
- RENNER E.. *Milch und Milchprodukte in der Ernährung des Menschen*, Gelsenkirchen/Volkswirtschaftl. Verlag, München. 4. Aufl.(1982).
- Richmond J.C.. *Spectroscopic analysis*. UK Pat Appli 2 283 091 A. (1995).
- ROSALES M.. *Uso de la Información Espectroscópica NIRS "per se" en la Evaluación de la Calidad de Productos Agrícolas*. Trabajo Profesional Fin de Carrera. ETSIAM. Universidad de Córdoba. (1993).

- SANTOS P.M., PEREIRA-FILHO E.R. Y RODRIGUEZ-SAONA E.R..*Application of Hand-Held and portable infrared spectrometers in bovine milk analysis*. Journal of agricultural and food chemistry, 61, p.1205 (2013).
- SARANWONG S. Y KAWANO S. (2008). *System design for non-destructive near infrared analyses of chemical components and total aerobic bacteria count of raw milk*. Journal of Near Infrared Spectroscopy, 16, p. 389 (2008)
- SATO T., YOSHINO M., FURUKAWA S., SOMEYA Y., YANO N., UOXUMI J. Y IWAMOTO M..*Analysis of milk constituents by the near infrared spectroscopic method*.Jpn Zootech Sci, 58, p. 698 (1987).
- SAVITZKY A. y GOLAY M.J.E..*Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures*. Analytical Chemistry, 36, p. 1627 (1964).
- SCHMILOVIVH Z., SHMULEVICH I., NOTEA A. Y MALTZ E..*Near Infrared spectroscopy of milk in its heterogeneous stage*.Computers and Electronics in Agriculture, 29, p. 195 (2000).
- SCHULER L.P., MILNE J.S., DELL J.M. Y FARAONE L..*MEMS-based microspectrometer technologies for NIR and MIR wavelengths*. Journal of Physics D: Applied Physics, 42, p. 1 (2009).
- SENTURIA S. MEMS-enabled products: a growing market segment. (2008). <http://industrial-embedded.com/mems-enabled-products-growing-marketsegment>, consulta realizada el 10/07/2014.
- SHENK J.S. AND WESTERHAUS M.O..*Population definition sample selection and calibration procedures for near infrared spectra and modified partial least squares regression*. Crop Science, 31, p. 469 (1991a).
- SHENK J.S. Y WESTERHAUS M.O..*Analysis of agricultural and food products by Near Infrared Reflectance Spectroscopy*.Monograph. NIRSystems Inc. Silver Spring, MD, USA. (1995b).
- SHENK J.S. Y WESTERHAUS M.O..*Routine operation, calibration, development and network system management manual*.NIRSystems Inc., Silver Spring, MD, USA. (1995a).
- SHENK J.S. Y WESTERHAUS, M.O..*Calibration the ISI way. Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves*. Davies, A.M.C. and Williams, P.C. (eds.). NIR Publications, Chichester, UK.p. 198 (1996).

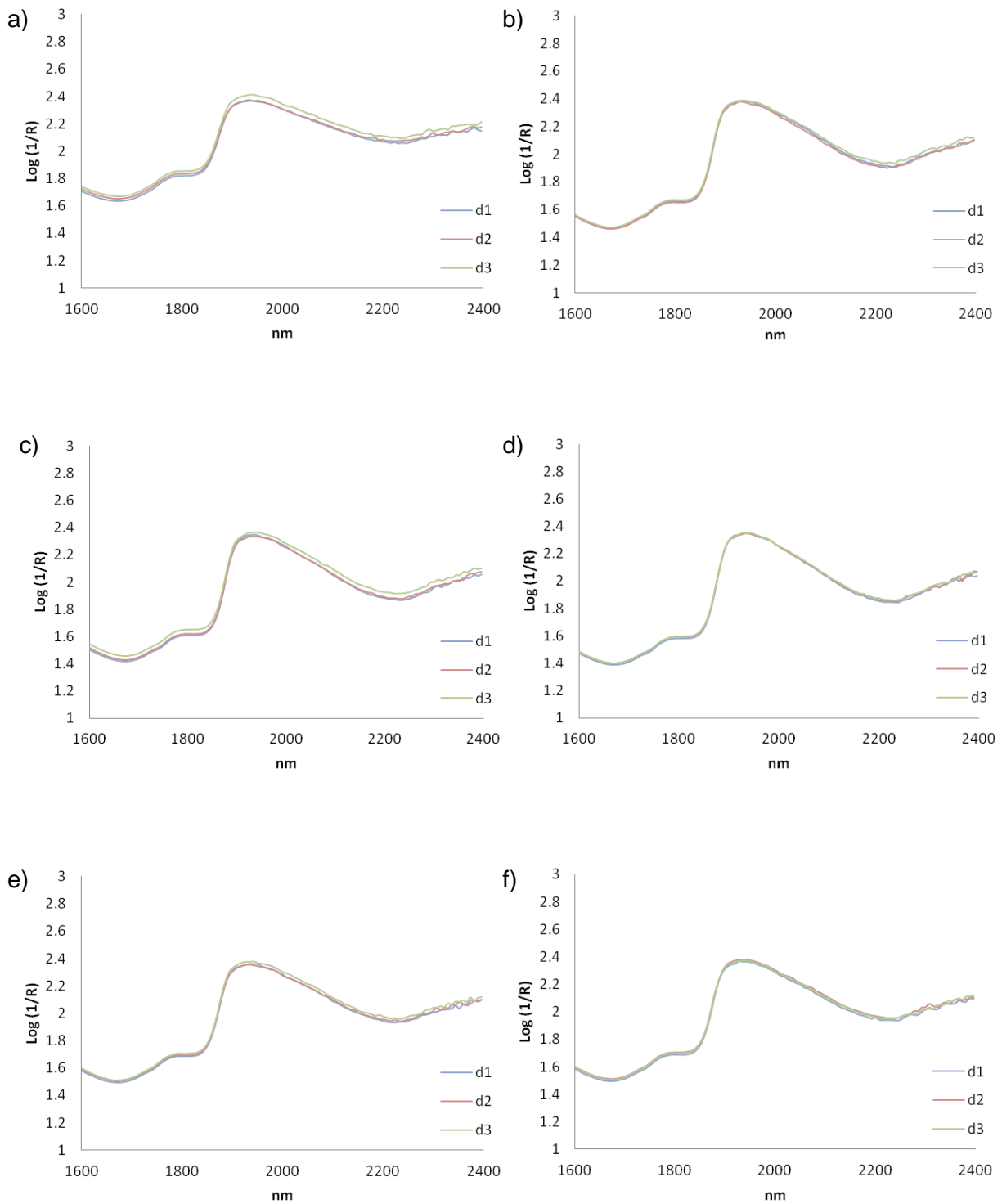
- SHENK J.S., WORKMAN J. Y WESTERHAUS M.. *Application of NIR spectroscopy to agricultural products. Handbook of Near-Infrared Analysis*. Eds. D.A Burns y E.M. Ciurczak. Practical Spectroscopy series. 13. Marcel Dekker, New York (USA). p. 383 (1992).
- SIESLER H.W., OZAKI Y., KAWATA S., Y HEISE H.M.. *Near Infrared Spectroscopy: principles, instruments, applications*. Wiley-Vch, Weinhen, Alemania (2002).
- STARK E. Y LUCHTER K. *Diversity in NIR instrumentation. Proceedings of the 11<sup>th</sup> International Conference on Near Infrared spectroscopy*. NIR Publications, 13. (2004).
- SUMMER J. (2012). *The World Dairy Situation. Bulletin of the International Dairy Federation, No. 4582012*. International Dairy Federation, Brussels, Belgium, p.235.
- SWAISGOOD H.E. *The caseins. Critical Reviews. Food Technology*. 3, .p. 375 (1973).
- TADIGADAPA S. Y MATETI K.. *Piezoelectric MEMS sensors: state of the art and perspectives*. *Measurement Science and Technology*, 20, p.1 (2009).
- TSENKOVA R., ATANASSOVA S., ITOH K., OZAKI Y. Y TOYODA K. *Near Infrared spectroscopy for biomonitoring : Cow milk composition measurement in a spectral region from 1,100 to 2,400 nanometers*. *Journal of animal Science*, 78, p. 515 (2000).
- TSENKOVA R., ATANASSOVA S., TOYODA K., OZAKI Y., ITOH K. Y FEARN T. *Near-Infrared Spectroscopy for dairy management: Measurement of Unhomogenized Milk Composition*. *Journal of Dairy Science*, 82, p. 2344 (1999).
- TSENKOVA R., ITOH K., HIMOTO J. Y ASAHIDA K. *NIR spectroscopy analysis of unhomogenized milk for automated monitoring in dairy husbandry. Leaping Ahead With Near Infrared Spectroscopy*. Eds. G.D. Batten, P.C. Flinn, L.A. Welsh y A.B. Blakeney. NIR Spectroscopy Group. Melbourne, Australia. p. 329 (1995).
- TSENKOVA R., MEILINA H., KUROKI S. Y BURNS D.H. *Near infrared spectroscopy using short wavelengths and leave-one-cow-out cross-validation for quantification of somatic cells in milk*. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 17, p. 345 (2009).
- WANG T.Z., AHENG L.M. TIAN L.J. WU P. ZHU H. Y REN F.Z. *Analysis of milk and dairy products by near infrared spectroscopy*. *Spectroscopy and spectral Analysis*, 30, p. 3208.(2010). (in Chinese).

- WARWICK E.J. *Effect of genetic factor son the nutrient composition of animal products*.Animal Breeding Abstracts, 48, p. 843 (1980).
- WEAVER R.V.W. *Near infrared reflectance analysis applied to dairy products. Challenges to contemporary dairy analytical techniques*. Royal Society of Chemistry, Londres, p. 91 (1984).
- WILLIAMS P.C Y NORRIS K.H. Variables affecting near-infrared spectroscopic analysis. *Near-Infrared technology in the agricultural and food industries* (2º edición).En P. Williams y K. Norris (Eds.).American Association of Cereal Chemists Inc., Minnesota, USA. p. 171 (2001b).
- WILLIAMS P.C..*Variables affecting near-infrared reflectance spectroscopy analysis. En Near Infrared technology in the agricultural and food industries*. Eds: P.C. Williams y K. Norris American Association of Cereal Chemists Inc., St Paul, MN, USA, p.143 (1987).
- WILLIAMS P.C. Y NORRIS K.H. *Qualitative applications of Near Infrared Reflectance Spectroscopy*.American Association of Cereal Chemist Inc., St Paurl, MN, USA. p. 241 (1987).
- WILLIAMS P.C. Y NORRIS K.H. *Variables affecting Near-infrared spectroscopic analysis. En Near-Infrared technology in the agricultural and food industries*. Eds. P.C. Williams y K.H. Norris. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota, p. 171 (2001).
- WORKMAN J., VELTKAMP D.J., DOHERTY S., ANDERSON B.B. CREASY K.E., KOCH M., TATERA J.F., ROBINSON A.L., BOND L., BURGESS L.W., BOKERMAN G.N. ULLLMAN A.H. DARSEY G.P. MOZAYENI F., BAMBERG J.A. Y STAUTBERG M. *Process analytical chemistry*. Analytical.Chemistry, 75.p. 2859 (2003).

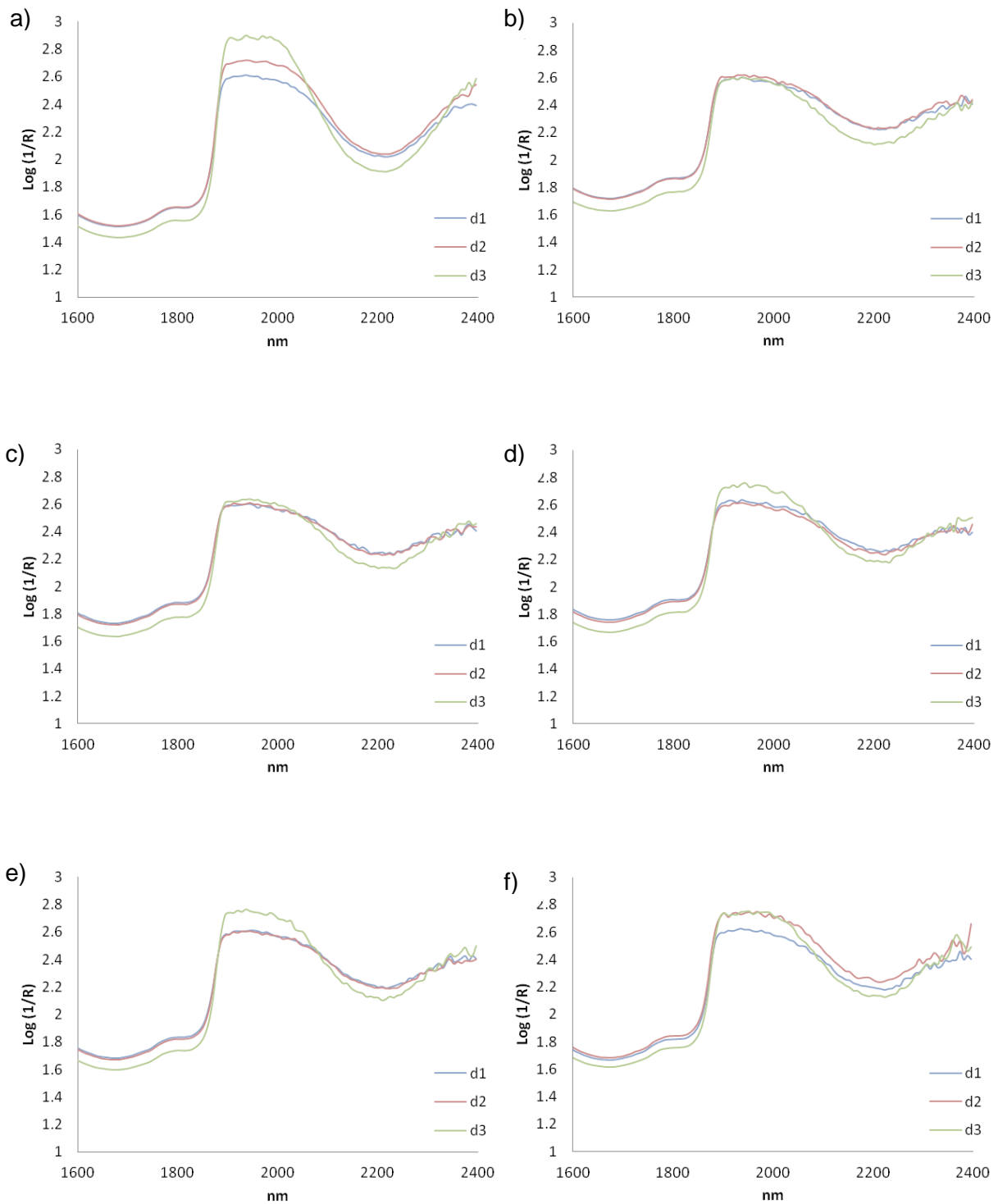
## ANEXO I



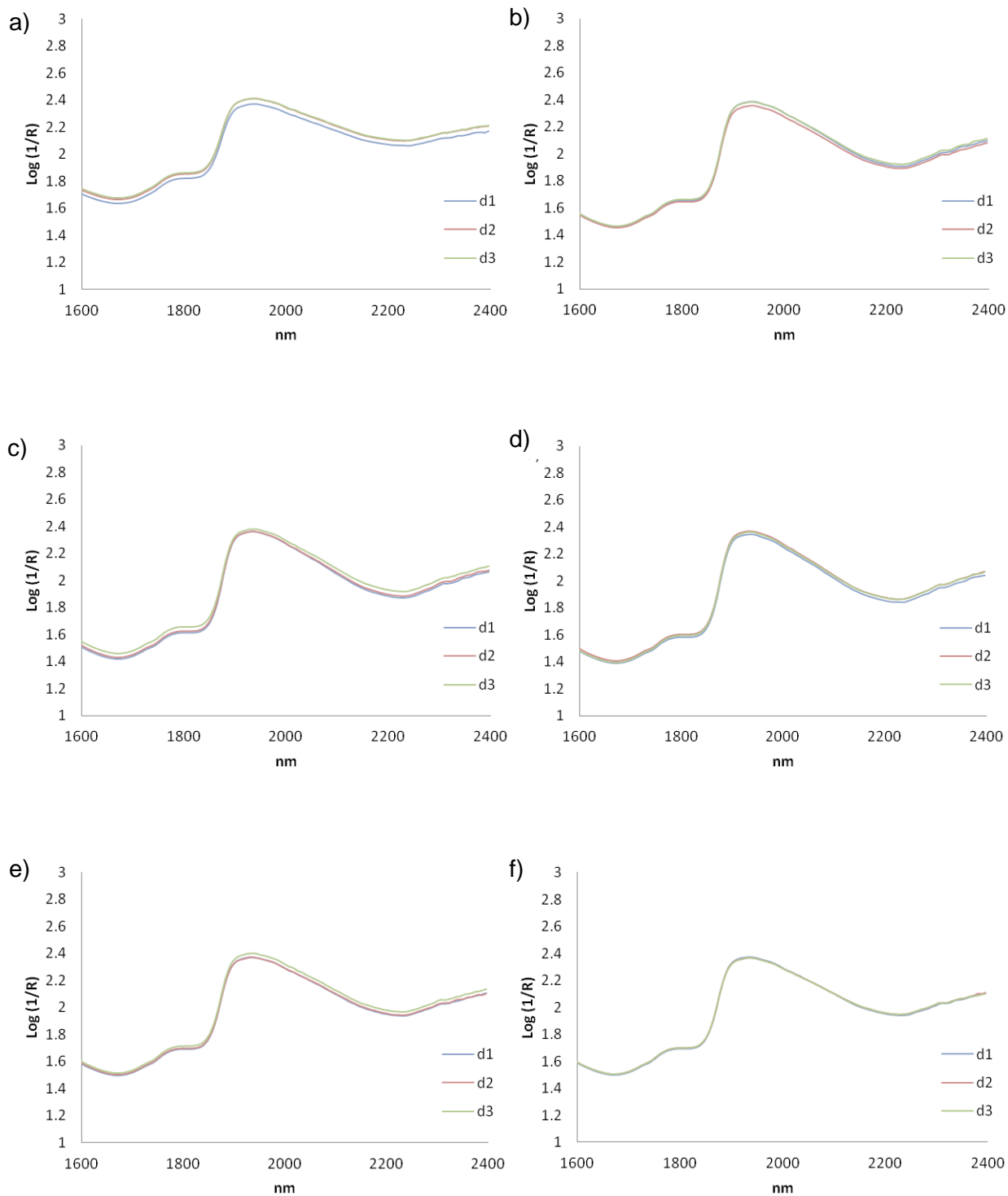
**Figura A1. 1.** Espectros promedio de tres réplicas en tres días consecutivos (d1, d2 y d3) para 6 muestras de leche independientes: a) V110T; b) V110M; c) V721T; d) V721M; e) V723T y f) V723M, analizadas con el modo NIR 6500 NIR.



**Figura A1. 2.** Espectros promedio de tres réplicas en tres días consecutivos (d1, d2 y d3) para 6 muestras de leche independientes: a) V110T; b) V110M; c) V721T; d) V721M; e) V723T y d) V723M, analizadas con el modo *Spectro5 E0*.

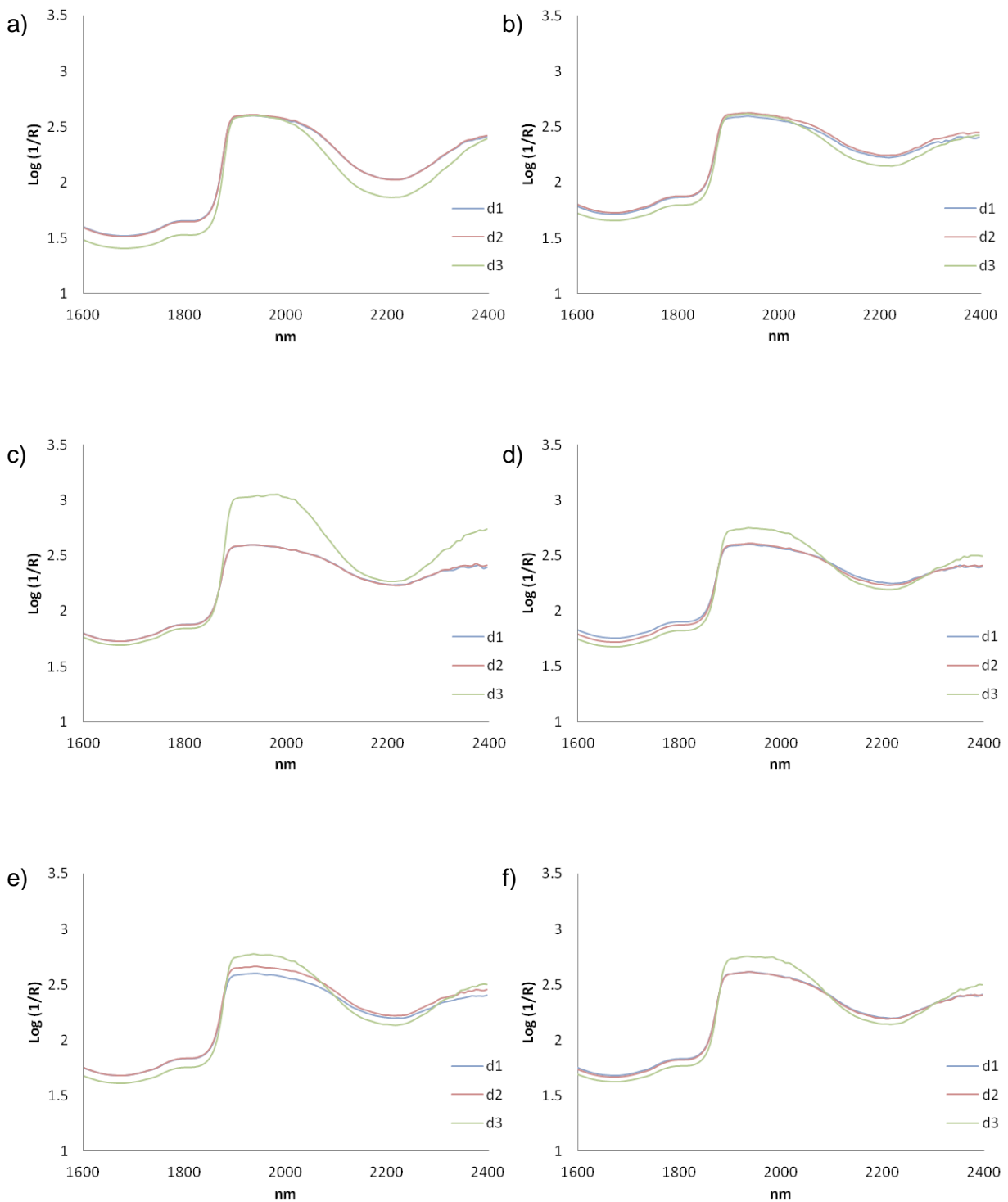


**Figura AI. 3.** Espectros promedio de tres réplicas en tres días consecutivos (d1, d2 y d3) para 6 muestras de leche independientes: a) V110T; b) V110M; c) V721T; d) V721M; e) V723T y d) V723M, analizadas con el modo *Spectro5 E0 +A*.

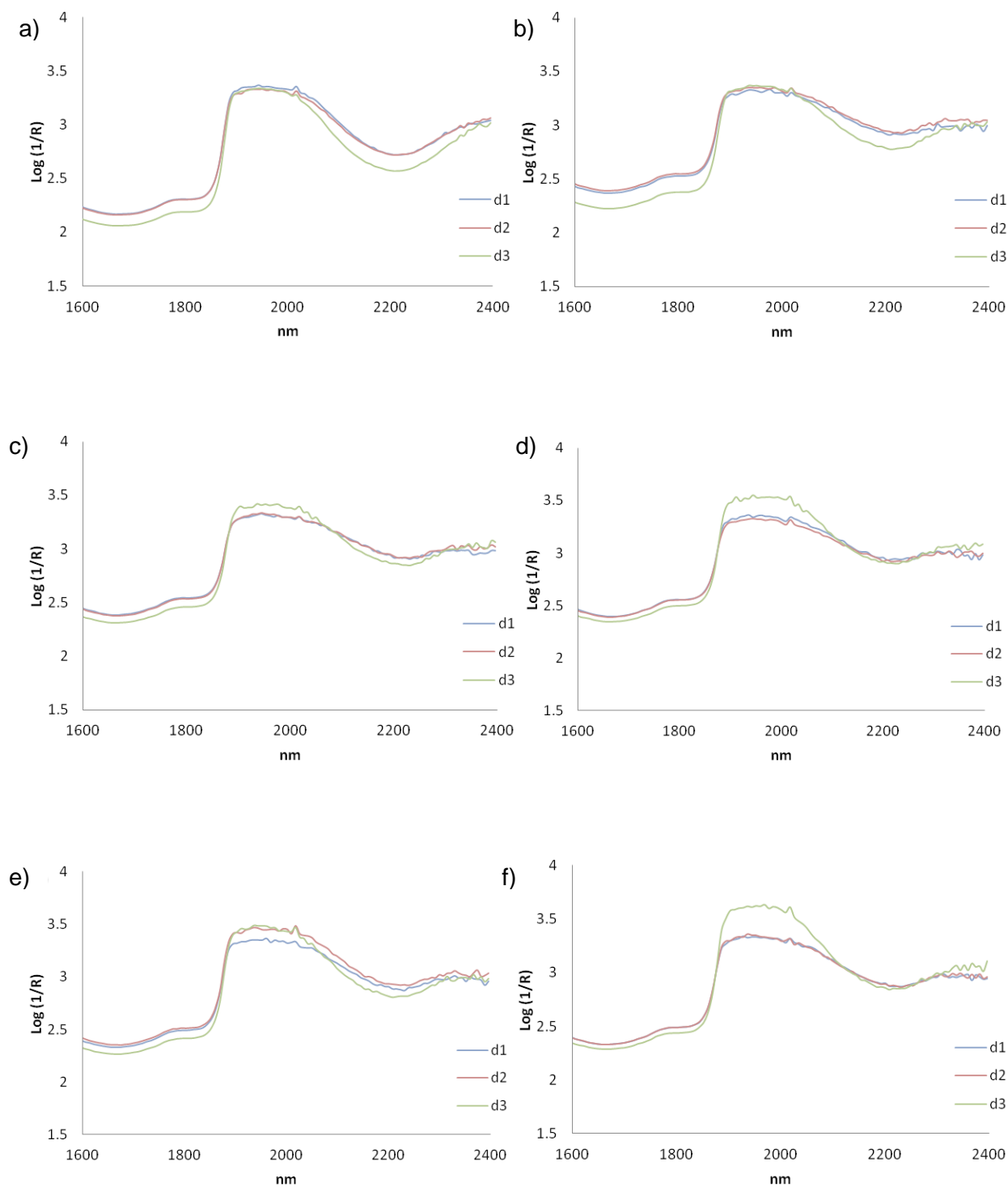


**Figura A1. 4.** Espectros promedio de tres réplicas en tres días consecutivos (d1, d2 y d3) para 6 muestras de leche independientes: a) V110T; b) V110M; c) V721T; d) V721M; e) V723T y d) V723M, analizadas con el modo *Spectro80 E0*.

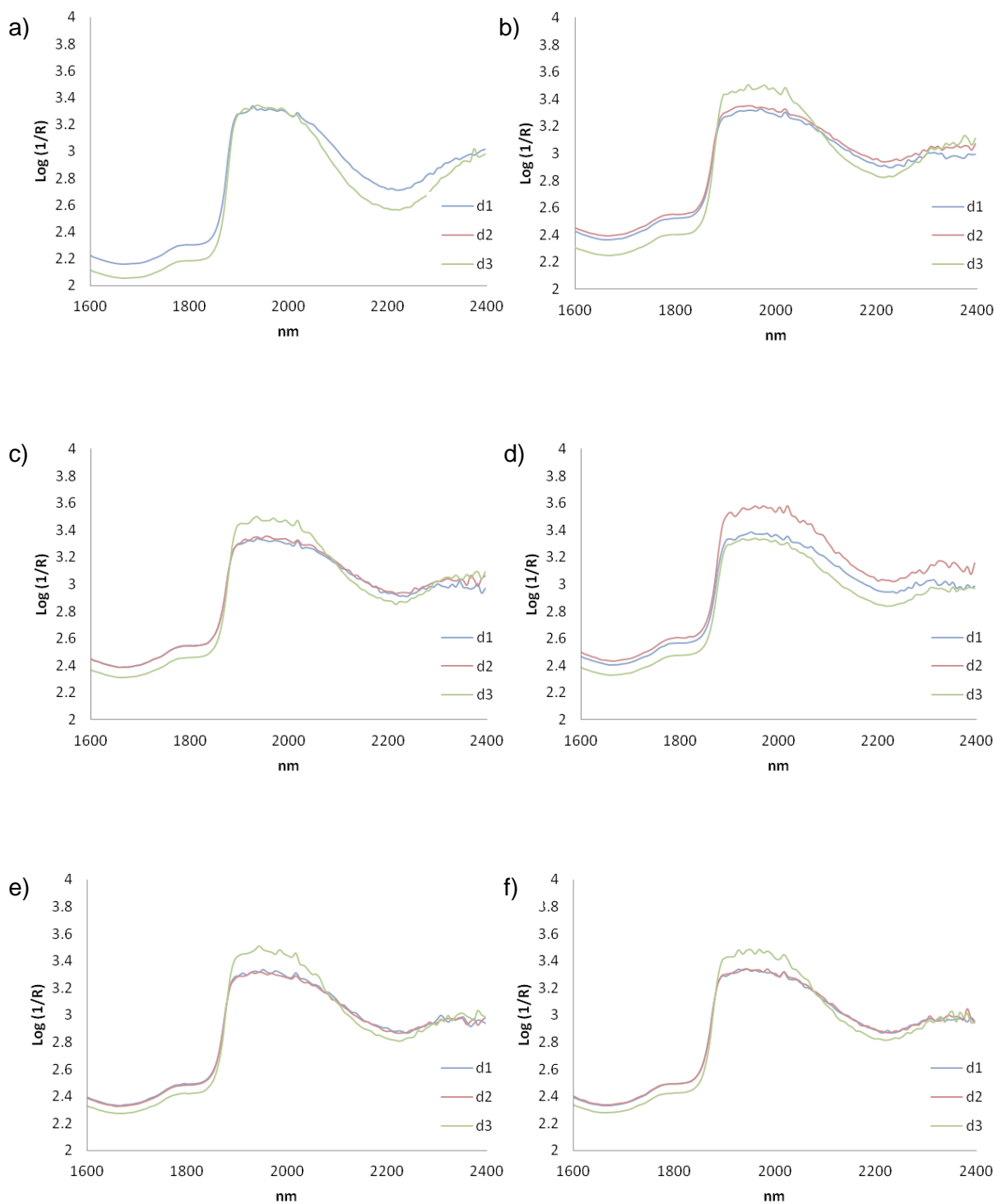




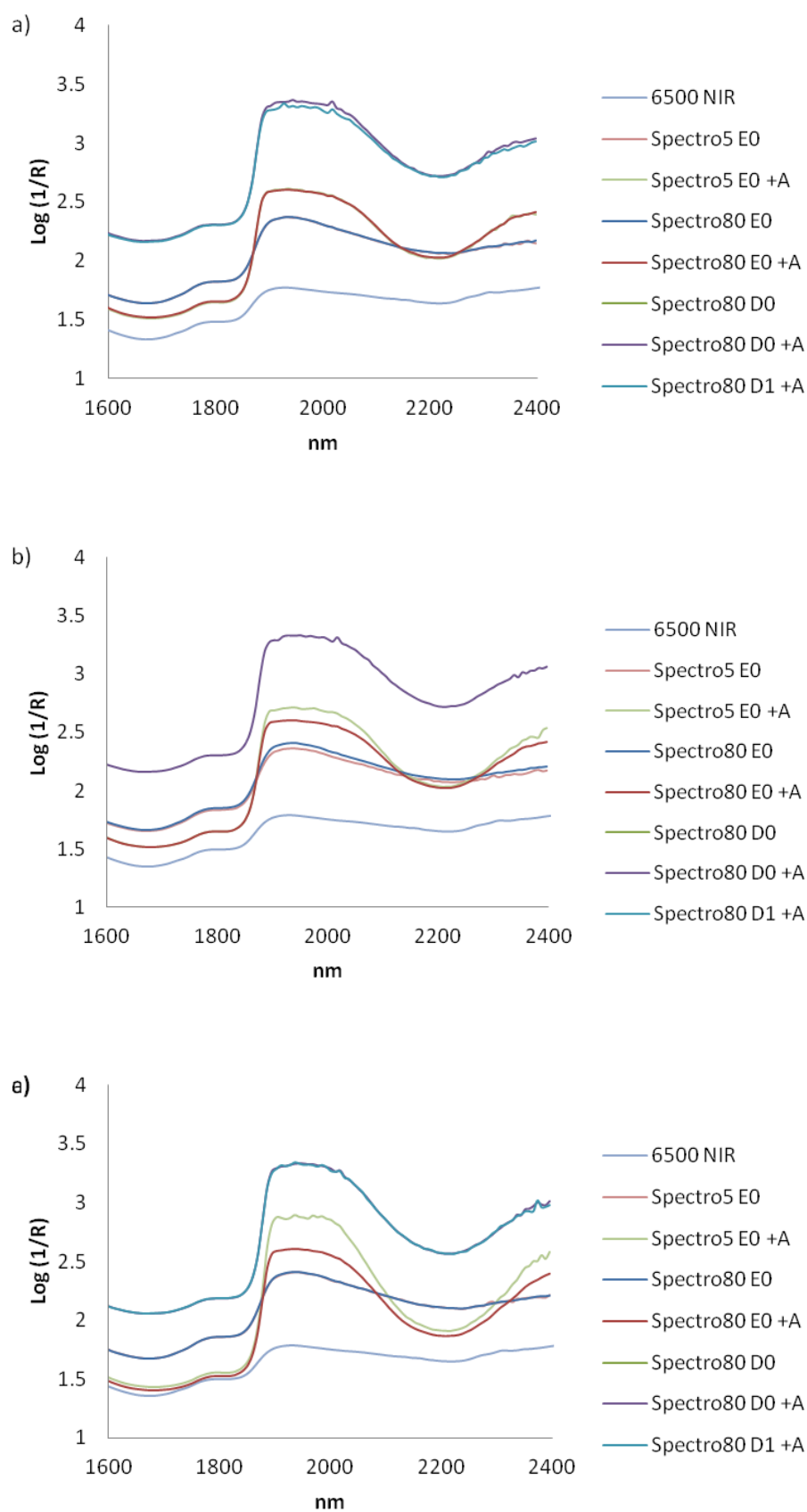
**Figura A1. 5.** Espectros promedio de tres réplicas en tres días consecutivos (d1, d2 y d3) para 6 muestras de leche independientes: a) V110T; b) V110M; c) V721T; d) V721M; e) V723T y d) V723M, analizadas con el modo *Spectro80 EO +A*.



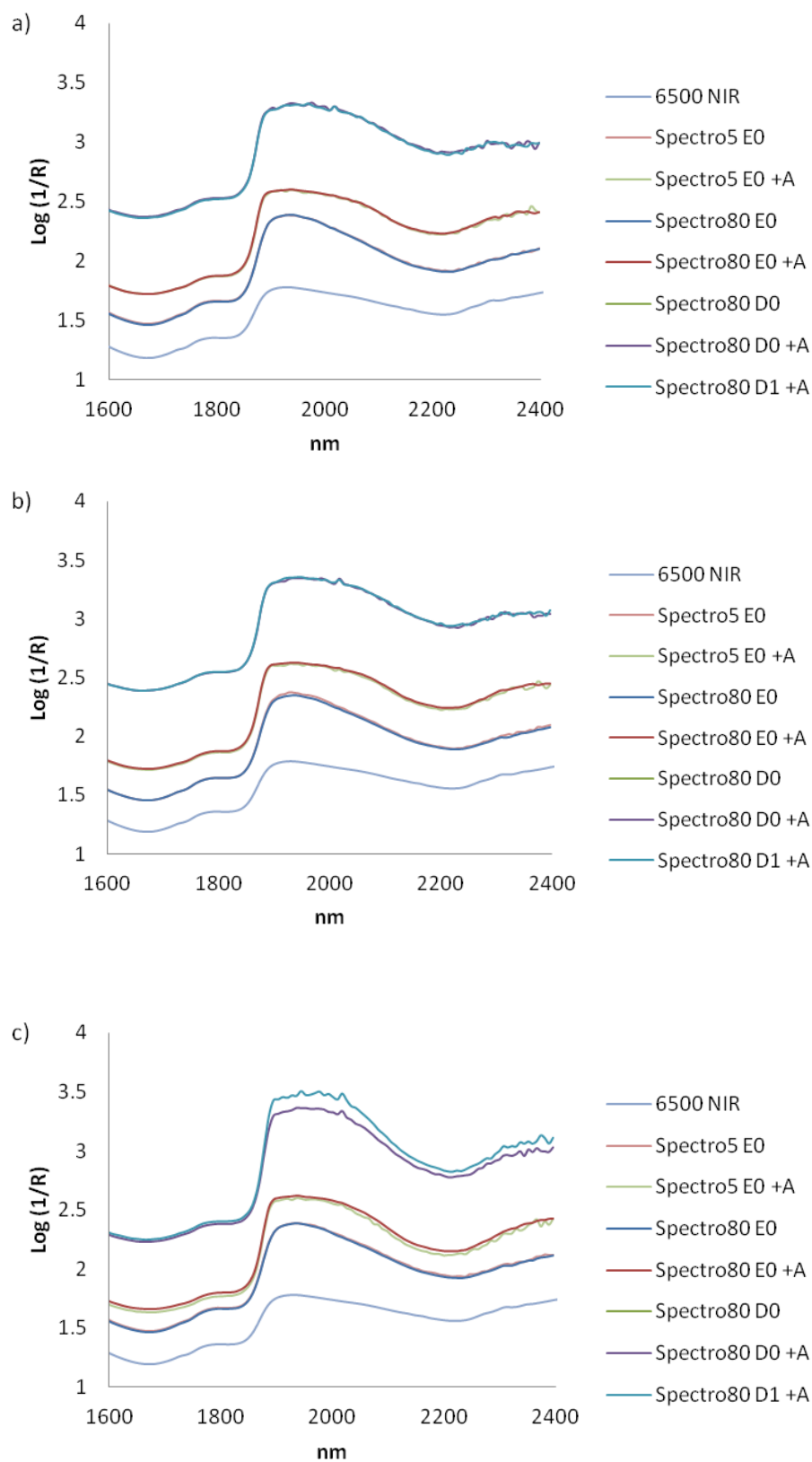
**Figura A1. 6.** Espectros promedio de tres réplicas en tres días consecutivos (d1, d2 y d3) para 6 muestras de leche independientes: a) V110T; b) V110M; c) V721T; d) V721M; e) V723T y d) V723M, analizadas con el modo *Spectro80 DO +A*.



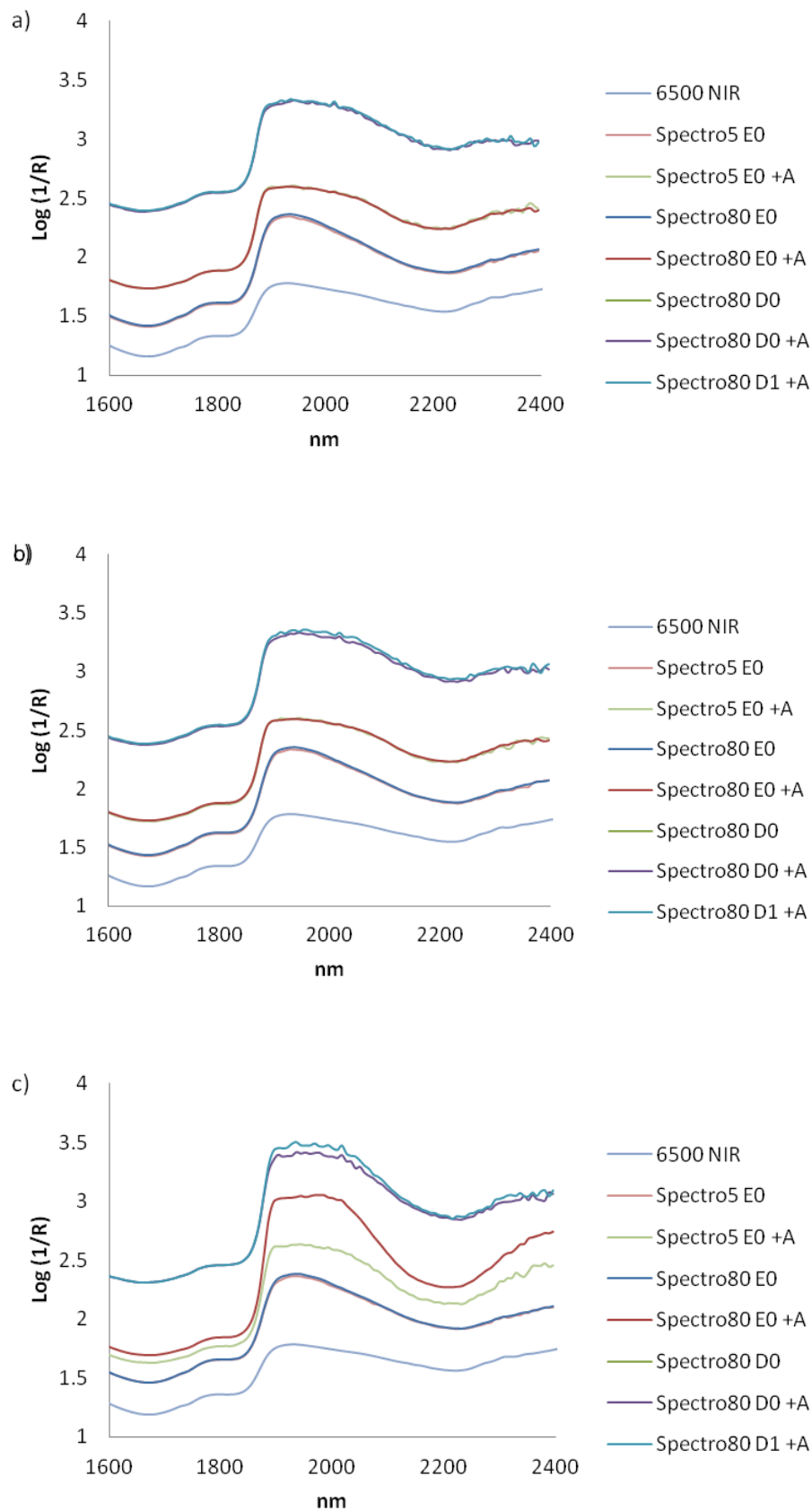
**Figura A1. 7.** Espectros promedio de tres réplicas en tres días consecutivos (d1, d2 y d3) para 6 muestras de leche independientes: a) V110T; b) V110M; c) V721T; d) V721M; e) V723T y d) V723M, analizadas con el modo *Spectro80 D1 +A*.



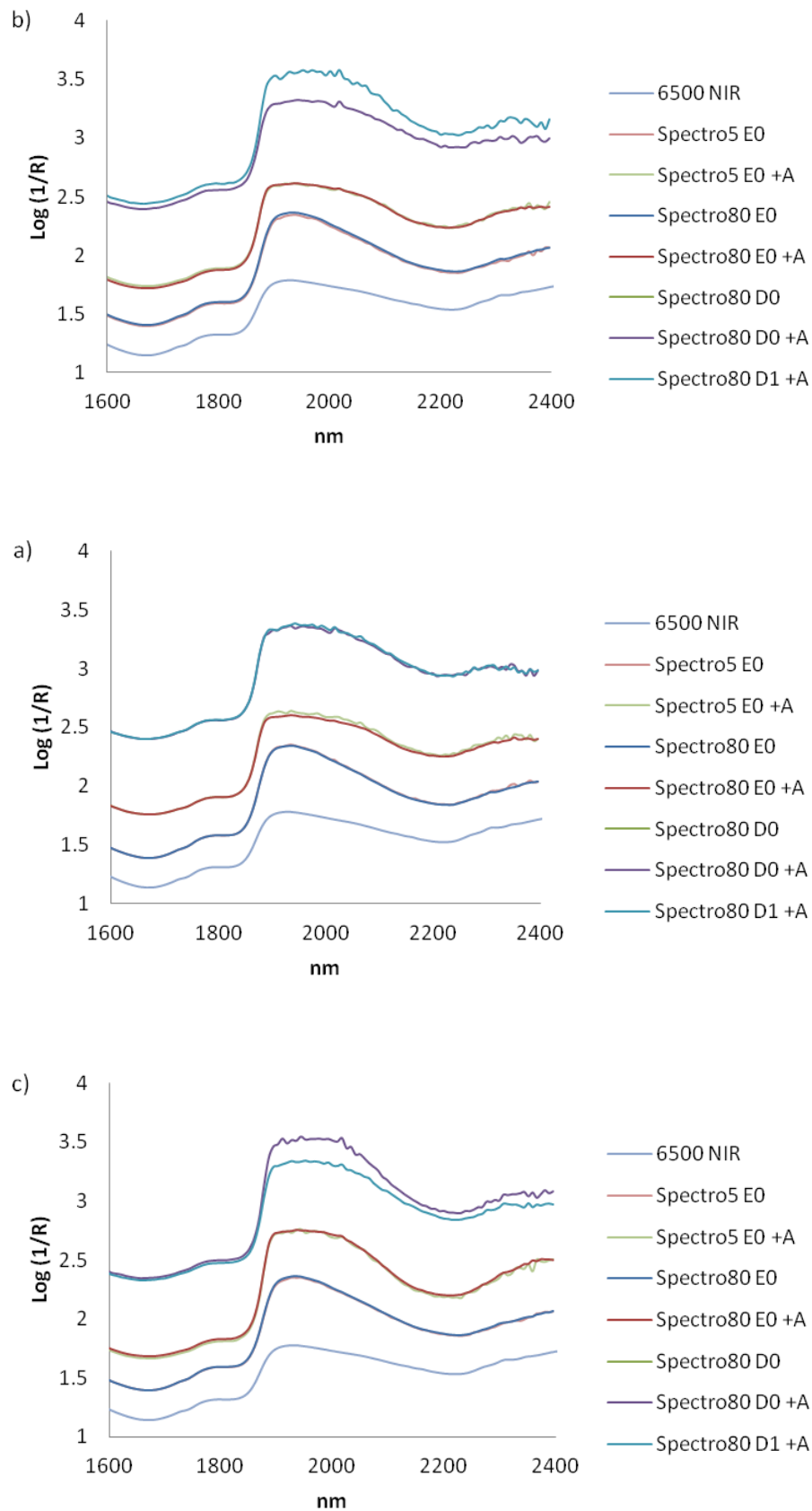
**Figura AI. 8.** Espectros promedio de tres réplicas en tres días consecutivos: día 1 (a), día 2 (b) y días 3 (c) para una muestra de leche independiente (110T), analizada con 7 modos NIR: 6500 NIR, *Spectro5 E0*, *Spectro5 E0 +A*; *Spectro80 E0*; *Spectro80 E0 +A*; *Spectro80 D0 +* y *Spectro80 D1 +A*.



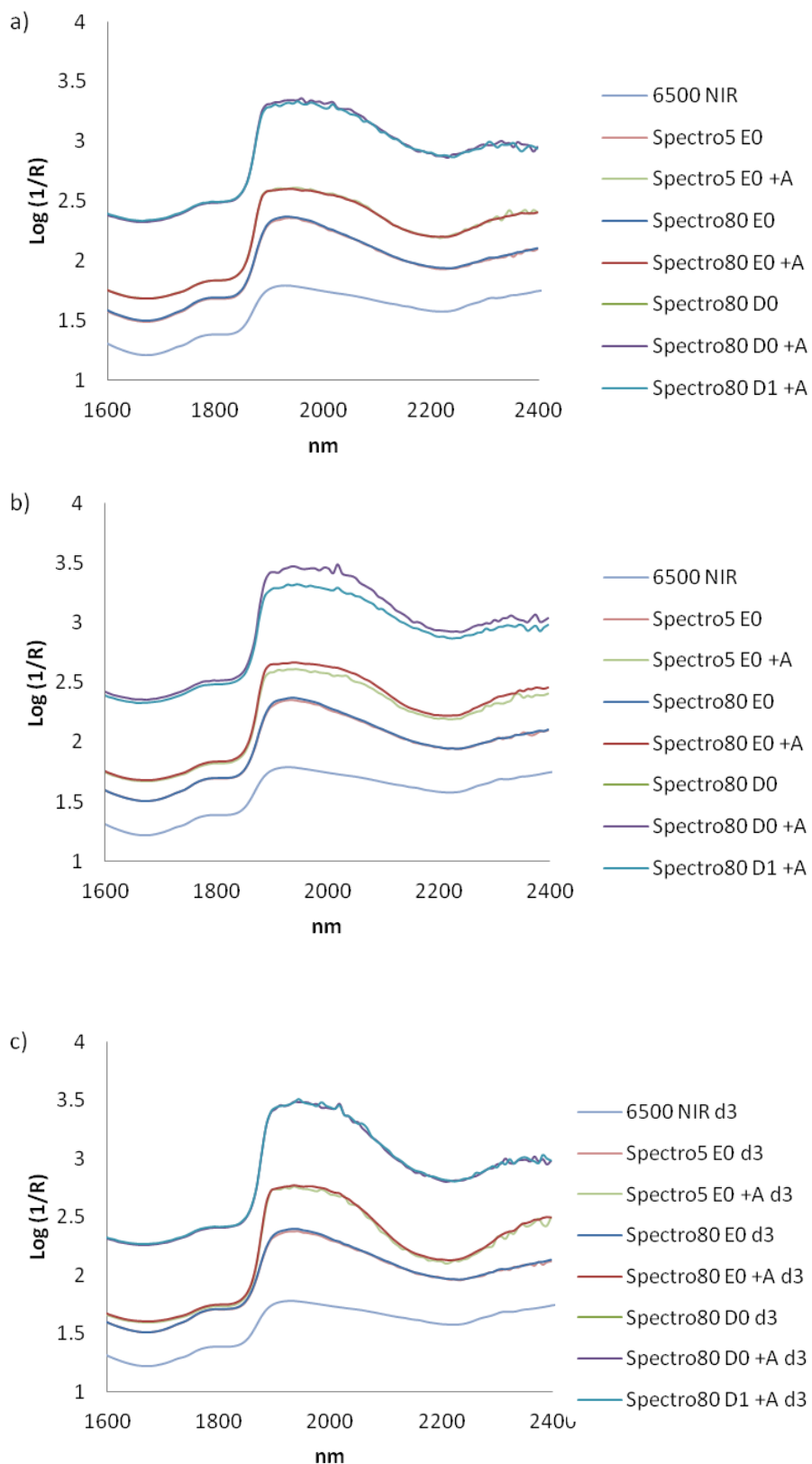
**Figura AI. 9.** Espectros promedio de tres réplicas en tres días consecutivos: día 1 (a), día 2 (b) y días 3 (c) para una muestra de leche independiente (110M), analizada con 7 modos NIR: 6500 NIR, *Spectro5 E0*, *Spectro5 E0 +A*; *Spectro80 E0*; *Spectro80 E0 +A*; *Spectro80 D0 +* y *Spectro80 D1 +A*.



**Figura AI. 10.** Espectros promedio de tres réplicas en tres días consecutivos: día 1 (a), día 2 (b) y días 3 (c) para una muestra de leche independiente (721T), analizada con 7 modos NIR: 6500 NIR, *Spectro5 E0*, *Spectro5 E0 +A*; *Spectro80 E0*; *Spectro80 E0 +A*; *Spectro80 D0 +* y *Spectro80 D1 +A*.

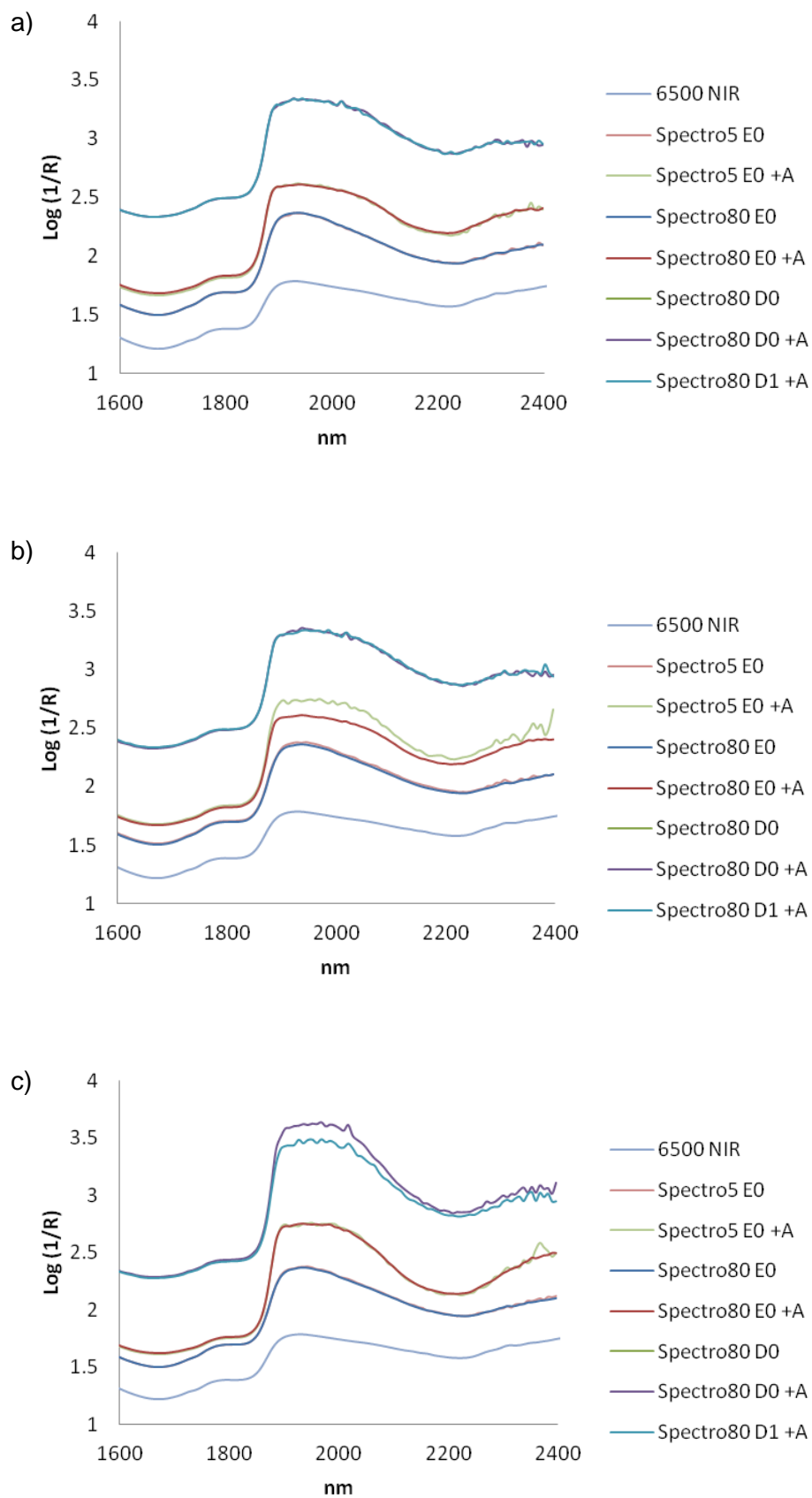


**Figura AI. 11.** Espectros promedio de tres réplicas en tres días consecutivos: día 1 (a), día 2 (b) y días 3 (c) para una muestra de leche independiente (721M), analizada con 7 modos NIR: 6500 NIR, Spectro5 E0, Spectro5 E0 +A; Spectro80 E0; Spectro80 E0 +A; Spectro80 D0 + y Spectro80 D1 +A.

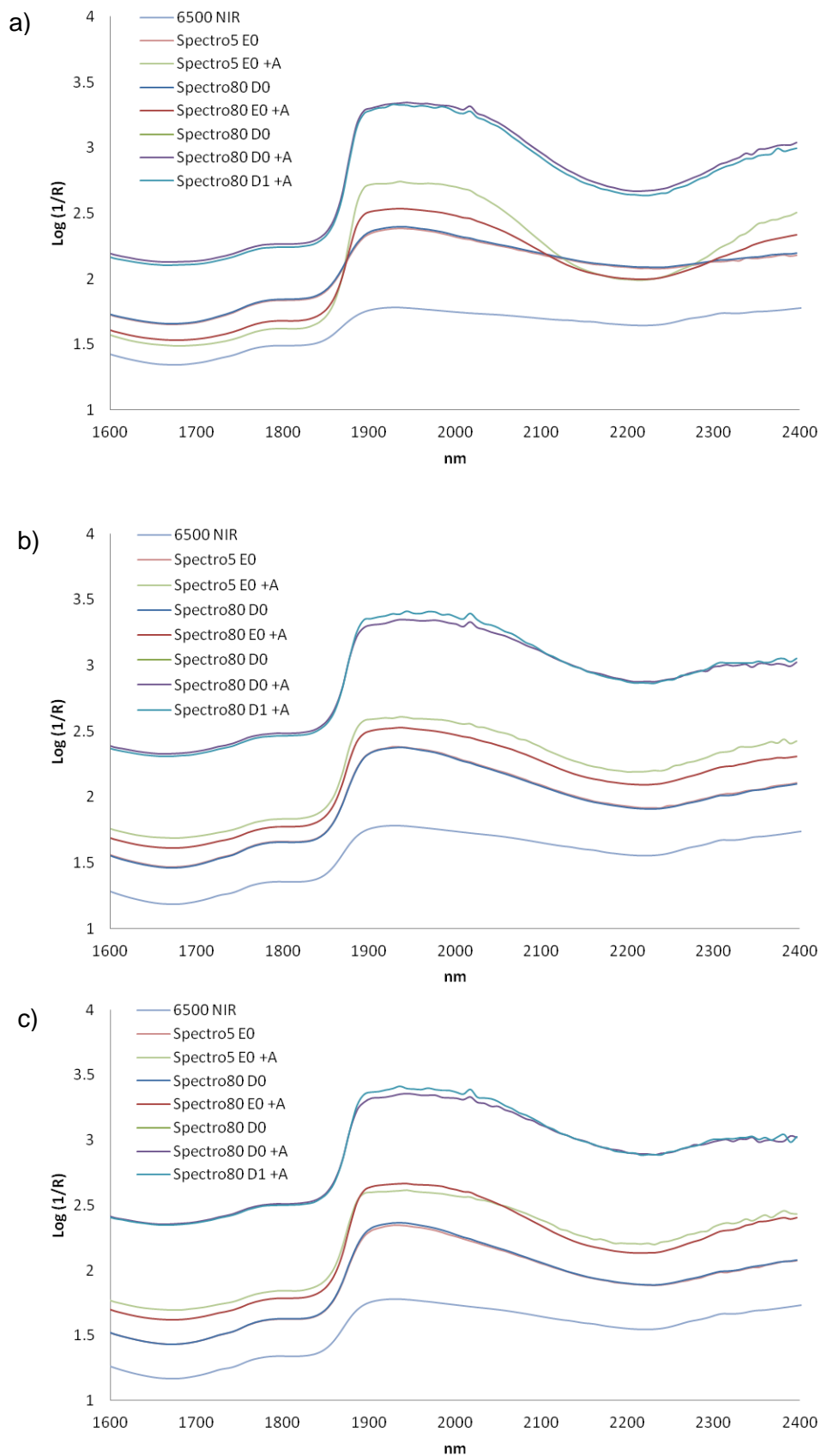


**Figura AI. 12.** Espectros promedio de tres réplicas en tres días consecutivos: día 1 (a), día 2 (b) y días 3 (c) para una muestra de leche independiente (723T), analizada con 7 modos NIR: 6500 NIR, *Spectro5 E0*, *Spectro5 E0 +A*; *Spectro80 E0*; *Spectro80 E0 +A*; *Spectro80 D0 +* y *Spectro80 D1 +A*.

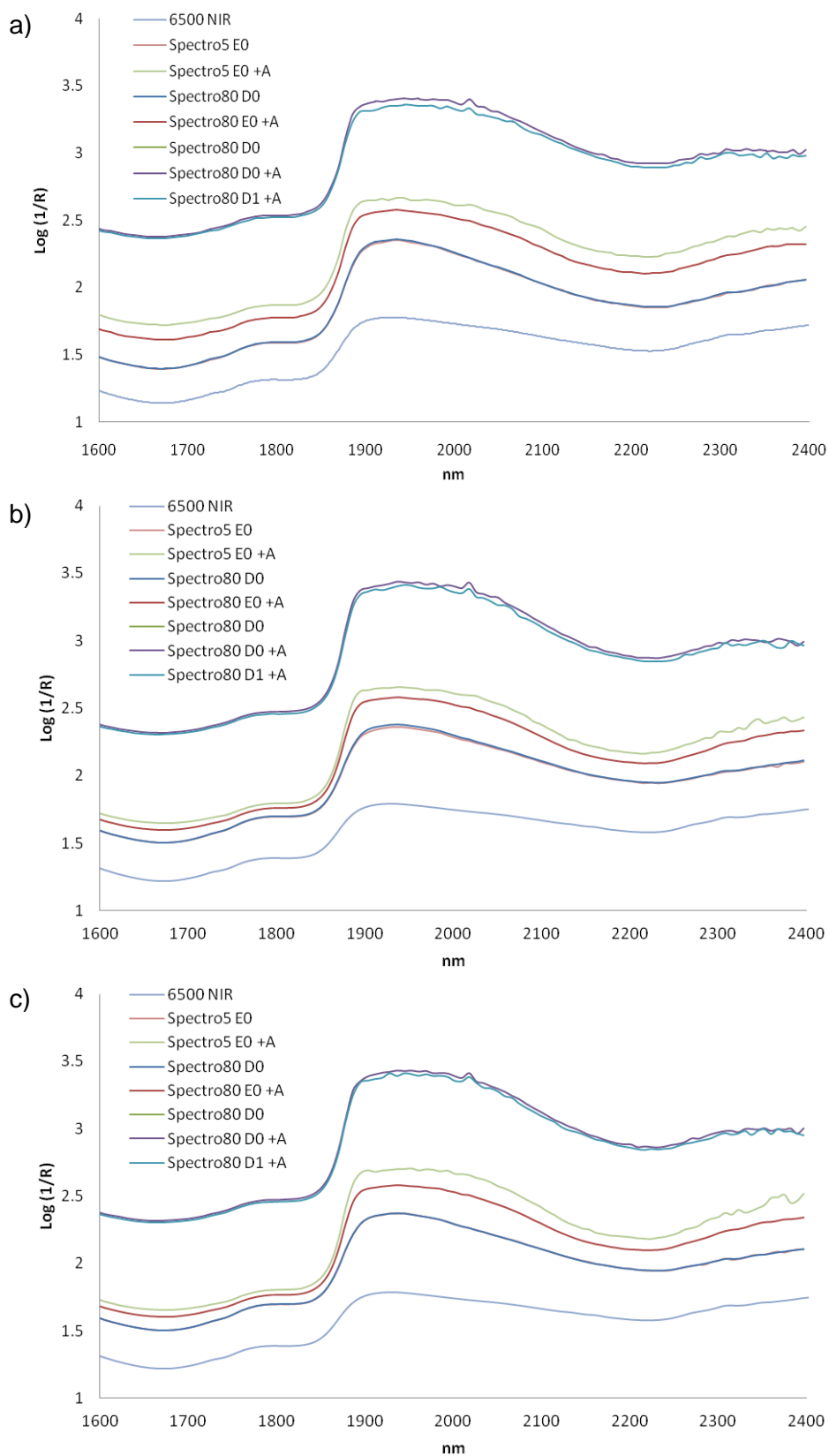




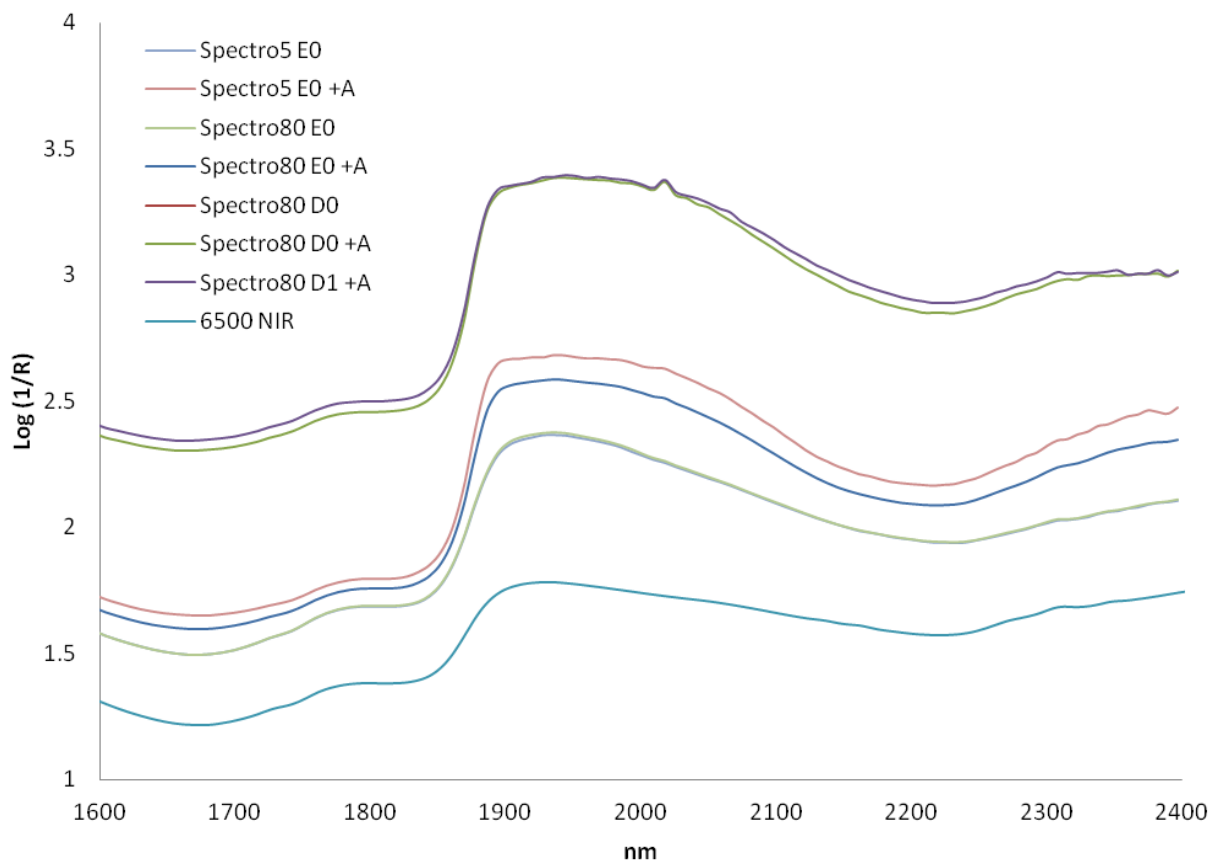
**Figura AI. 13.** Espectros promedio de tres réplicas en tres días consecutivos: día 1 (a), día 2 (b) y días 3 (c) para una muestra de leche independiente (723M), analizada con 7 modos NIR: 6500 NIR, *Spectro5 E0*, *Spectro5 E0 +A*; *Spectro80 E0*; *Spectro80 E0 +A*; *Spectro80 D0 +* y *Spectro80 D1 +A*.



**Figura A1. 14.** Espectro promedio de 9 espectros (3 días/muestra y 3 réplicas/muestra) para muestras de leche individuales: V110T (a), V110M (b) y V721T (c), analizadas con 7 modos NIR: 6500 NIR, *Spectro5 E0*, *Spectro5 E0 +A*; *Spectro80 E0*; *Spectro80 E0 +A*; *Spectro80 D0 +* y *Spectro80 D1 +A*.

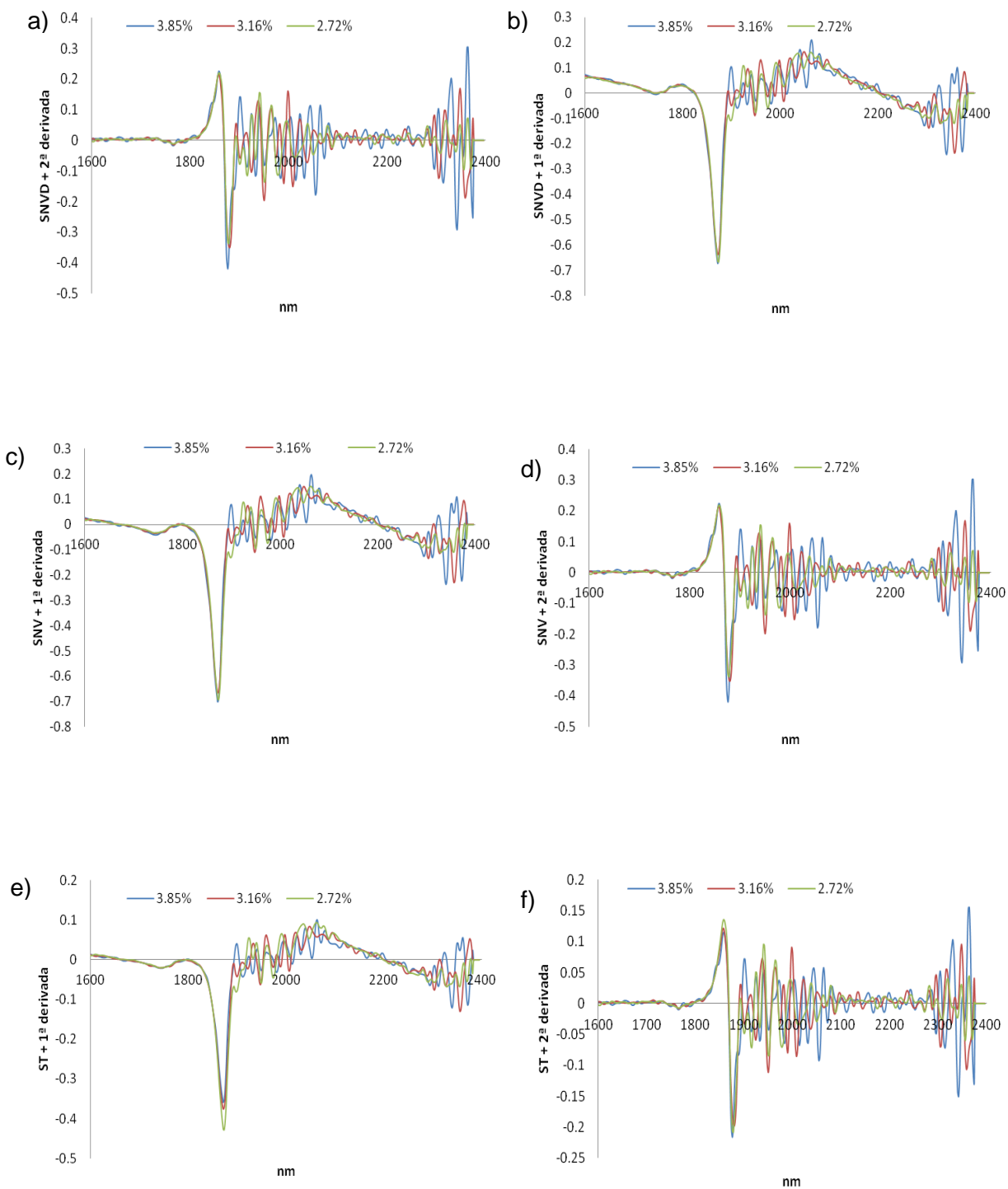


**Figura A1. 15.** Espectro promedio de 9 espectros (3 días/muestra y 3 réplicas/muestra) para muestras de leche individuales: V721M (a), V723T (b) y V723M (c), analizadas con 7 modos NIR: 6500 NIR, *Spectro5 E0*, *Spectro5 E0 +A*; *Spectro80 E0*; *Spectro80 E0 +A*; *Spectro80 D0* + y *Spectro80 D1 +A*.

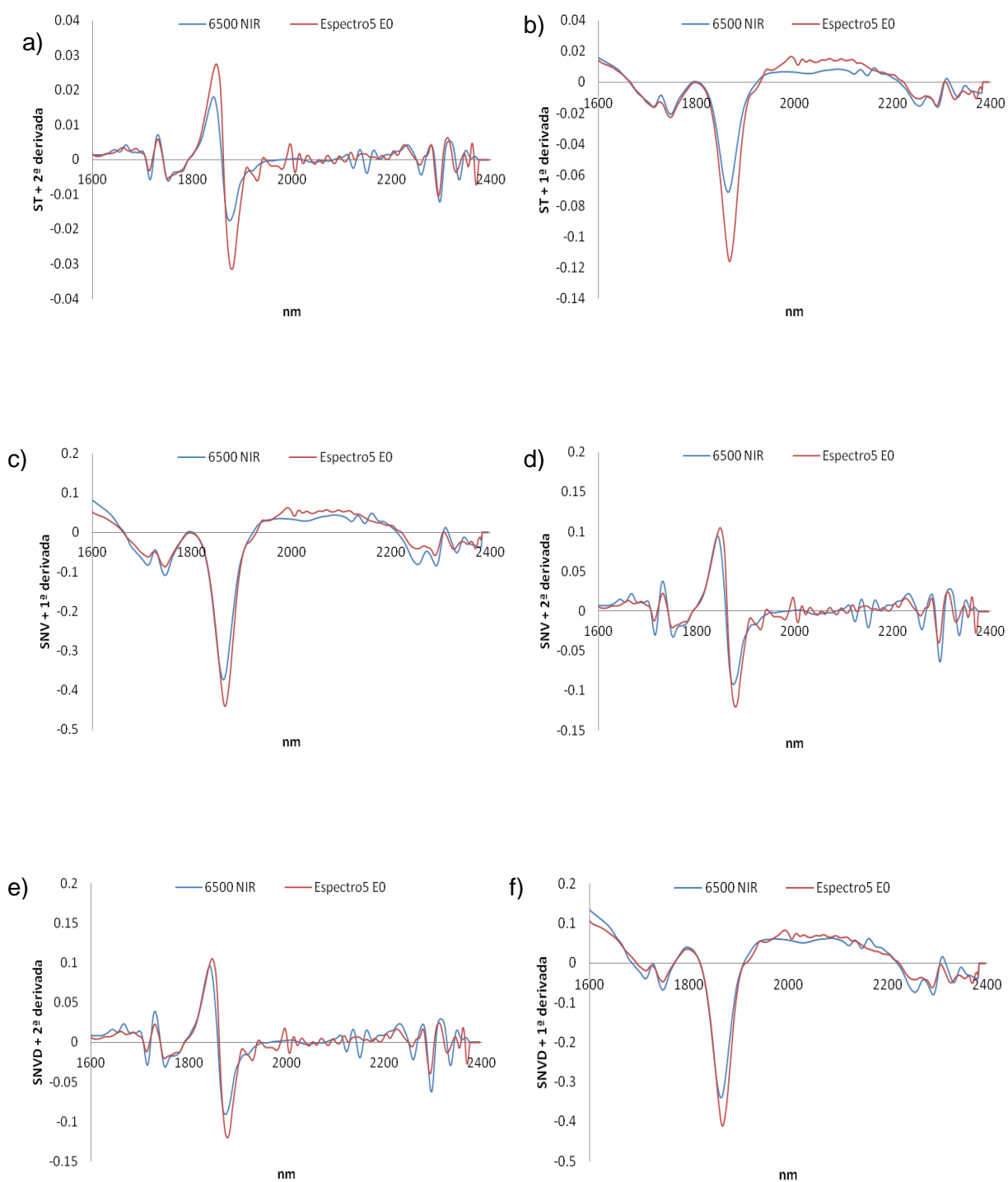


**Figura AI. 16.** Espectros promedio de 54 espectros (3 réplicas/muestra, 3 días/muestra en 6 muestras individuales) analizados por 7 modos NIR: 6500 NIR, Spectro5 E0, Spectro5 E0 +A; Spectro80 E0; Spectro80 E0 +A; Spectro80 D0 + y Spectro80 D1 +A.

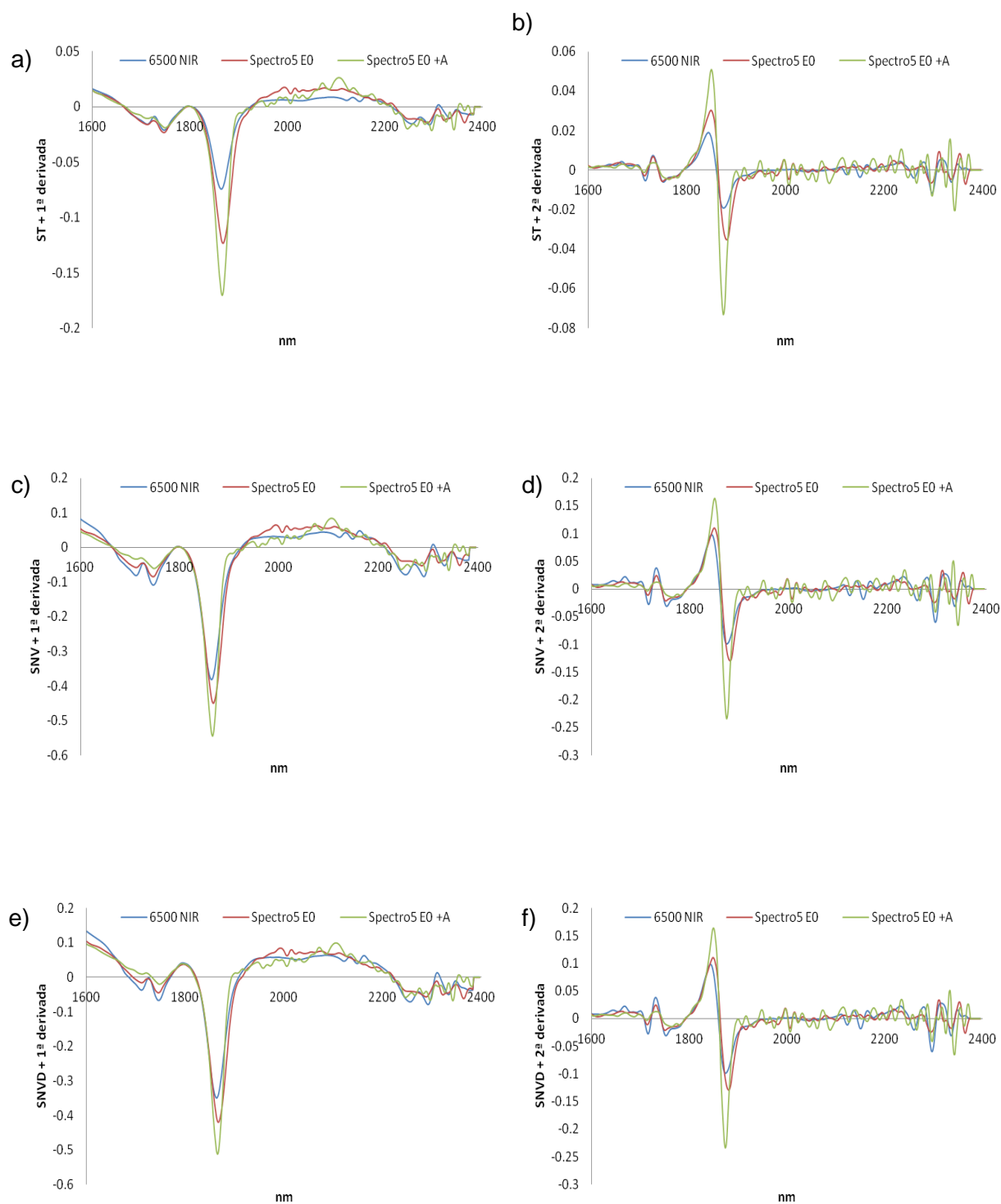
## ANEXO II



**Figura AII. 1.** Tratamientos matemáticos (tratamiento + derivada) aplicados a 3 espectros de leche individuales con distinto % de grasa, un pretratamiento de dilución al 300% y analizadas con el modo *Spectro10 D2 +A*



**Figura AII. 2.** Tratamientos matemáticos (tratamiento + derivada) aplicados a 2 espectros de leche analizadas con los modos *Spectro50 E0 +A* de microPHAZIR y *6500 NIR* de FOSS NIRSystems 6500



**Figura AII. 3.** Tratamientos matemáticos (tratamiento + derivada) aplicados a 2 espectros de leche analizadas con los modos *Spectro5 E5 +A* y *Spectro5 E0* de microPHAZIR y *6500 NIR* de FOSS NIRSystems 6500

