

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

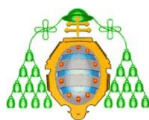
**“LA ESPECTROSCOPIA INFRARROJA COMO
HERRAMIENTA DE ANÁLISIS PARA EL CONTROL DE
CALIDAD DE LA LECHE HUMANA DONADA
PASTEURIZADA”**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER
POR**

CANDELA MELENDRERAS GARCÍA

JULIO, 2021





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. María Luisa Fernández Sánchez (Universidad de Oviedo)

Dra. Dña. Ana Belén Soldado Cabezuelo (Universidad de Oviedo)

CERTIFICA:

Que Dña. **Candela Melendreras García** ha realizado bajo nuestra dirección el Trabajo Fin de Máster al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Máster Universitario en Biotecnología Alimentaria, 15ª promoción curso 2020-2021.

Oviedo, 09 de Julio de 2021

FERNANDEZ
SANCHEZ, MARIA
LUISA
(AUTENTICACIÓN)

SOLDADO
CABEZUELO
ANA BELEN

Dña. María Luisa Fernández Sánchez Dña. Ana Belén Soldado Cabezuelo

VºBº

Manuel Rendueles de la Vega

Coordinador del Máster en Biotecnología Alimentaria

AGRADECIMIENTOS

A Ana Soldado y a María Luisa Fernández por confiar en mí para realizar este trabajo, por las tutorías, por los ánimos y por haberme enseñado tanto.

A todas las mujeres que de manera altruista donan su leche para que otros niños puedan beneficiarse.

A mis amigos de Biología, por cuatro años intensos pero inolvidables.

A mis amigos del Máster, por habernos tomado con humor un año tan atípico.

A mis amigas de Llanes, Leyre, Irene, Marina, Lucía y las demás, por haber construido una amistad así.

A mis abuelos, por cuidarme siempre.

A mis padres y mi hermano, por apoyarme y comprenderme.

A Miguel, por acompañarme y enseñarme cada día a creer en mí.

Gracias.

ÍNDICE

RESUMEN.....	I
ABSTRACT	II
ÍNDICE DE FIGURAS.....	III
ÍNDICE DE TABLAS	IV
1. INTRODUCCIÓN	1
2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS.....	3
2.1. LECHE MATERNA.....	3
2.1.1. COMPOSICIÓN	3
2.1.2. BENEFICIOS DE LA LACTANCIA MATERNA	8
2.2. BANCOS DE LECHE MATERNA DONADA.....	9
2.2.1. FUNCIONAMIENTO DE UN BANCO DE LMD.....	10
2.3. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CERCANO (NIR).....	12
2.4. ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICO Y SU APLICACIÓN EN NIRS	17
2.4.1. ANÁLISIS CUANTITATIVO.....	19
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
3.1. TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	22
3.2. ESPECTROS NIRS DE LECHE MATERNA	23
3.3. DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE CALIBRACIONES NIRS	25
3.3.1. SOFTWARES.....	25
3.3.2. PRETRATAMIENTO.....	26
3.3.3. MODELOS ESTADÍSTICOS.....	26
4. RESULTADOS EXPERIMENTALES	27
4.1. EVALUACIÓN DE LA INFORMACIÓN ESPECTRAL	27
4.2. DESARROLLO DE MODELOS DE CALIBRACIÓN	30
5. ESTUDIO ECONÓMICO.....	40
6. CONCLUSIONES	41
7. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	42
8. BIBLIOGRAFÍA	43
ANEXO I.....	52

RESUMEN

La leche materna es un alimento óptimo, cubre todas las necesidades del recién nacido para su correcto desarrollo. Es un fluido dinámico cuya composición varía con el periodo de lactancia. En las unidades de Neonatología de los hospitales, existen bancos de leche humana, un servicio que analiza, almacena y distribuye leche humana donada. Esta leche sirve para alimentar a niños prematuros (nacimiento antes de las 32 semanas de gestación o con un peso inferior a los 1500 g) que, por alguna razón, sus madres no pueden alimentarlos con la suya propia.

El presente Trabajo de Fin de Máster trata de desarrollar un método de análisis de leche humana basado en la tecnología del infrarrojo cercano (NIRS). Para ello, se utilizará un instrumento NIRS portátil que permite llevar a cabo el análisis *in situ* y en tiempo real, a bajo coste y sin generación residuos.

Para la calibración del equipo NIRS se tomaron 17 muestras facilitadas por el Banco de Leche Materna de Asturias, a partir de ellas se crearon mezclas y/o diluciones para aumentar la variabilidad muestral. Los parámetros estudiados fueron: grasa, proteínas, carbohidratos, energía y sólidos totales. Una vez preparadas las mezclas y diluciones, se procedió a la recogida de la información espectral en el rango de 1596 nm a 2396 nm, de los espectros de NIR de cada muestra. Con la información espectral y la de referencia se construyó una base de datos que permitió el desarrollo de los modelos de calibración para cada uno de los parámetros de calidad objeto de estudio.

Se ensayaron cuatro combinaciones de pretratamientos de información espectral, dos de primera derivada y dos de segunda derivada con pretratamiento de corrección de dispersión de la luz o *scattering*, *Standard Normal Variate and Detrend* (SNVD).

Una vez desarrollados los modelos de calibración se seleccionaron los mejores tratamientos en función de los valores de los estadísticos obtenidos. Las mejores calibraciones fueron aquellas que obtuvieron los valores más altos para los coeficientes de determinación (RSQ y 1-VR) y los valores más bajos de error (SEC y SECV). Finalmente, se ha conseguido la cuantificación de los seis parámetros estudiados.

ABSTRACT

Breast milk is an optimal food, covering all the needs of the newborn. It is a dynamic fluid whose composition varies with the lactation period. In the neonatal units of hospitals, there are human milk banks, a service that analyses, stores and distributes donated human milk. This milk is used to feed premature infants (born before 32 weeks of gestation or weighing less than 1500 g) who, for some reason, their mothers cannot feed them with their own milk.

This Master's thesis aims to develop a method for the analysis of human milk based on near infrared technology (NIRS). For this purpose, a portable NIRS instrument will be used, which allows in situ, real-time, low-cost and waste-free analysis.

For the calibration of the NIRS equipment, 17 samples provided by the Asturias Breast Milk Bank were taken, from which mixtures and/or dilutions were carried out to increase sample variability. The parameters studied were fat, protein, carbohydrates, energy and total solids. Once dilutions and mixtures were prepared, spectral information was collected in the range of 1596 nm to 2396 nm. A data base was built with spectra and reference data, and it was used to develop NIR calibration models.

Four combinations of chemometric strategies using first and second derivatives and Standard Normal Variate and Detrend (SNVD) were tested.

Once the calibration models were developed, the best treatments were selected according to the the best values of the statistics obtained. The best calibrations were those that obtained the highest values for the determination coefficients (RSQ and 1-VR) and the lowest error values (SEC and SECV). Finally, quantification of the six parameters studied has been achieved.

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. COMPARACIÓN ENTRE DOS MUESTRAS DE LECHE, A LA IZQUIERDA CALOSTRO Y A LA DERECHA LECHE DE TRANSICIÓN. FOTOGRAFÍA TOMADA EN EL LABORATORIO.	3
FIGURA 2. DISMINUCIÓN DE LA FRACCIÓN PROTEICA EN LM EN FUNCIÓN DEL TIEMPO POST-PARTO. (LÖNNERDAL ET AL., 2017)	5
FIGURA 3. LOGOTIPOS DE LA EMBA, LA AEBLH Y DEL BANCO DE LECHE MATERNA DE ASTURIAS. 10	
FIGURA 4. ESQUEMA DEL FUNCIONAMIENTO DE EN UN BANCO DE LECHE. ADAPTACIÓN DE BANCO DE LECHE MATERNA DE ASTURIAS, 2019.....	11
FIGURA 5. ESPECTRO ELECTROMAGNÉTICO, ADAPTACIÓN (PAVIA ET AL., 2014).....	14
FIGURA 6. VIBRACIONES MOLECULARES ENTRE DOS ÁTOMOS CON RESPECTO A UN ÁTOMO. ELABORACIÓN PROPIA.....	15
FIGURA 7. FENÓMENOS DE INTERACCIÓN ENTRE RADIACIÓN Y MATERIA.	16
FIGURA 8. BANDAS DE ABSORCIÓN EN LA REGIÓN NIR (MURRAY ET AL., 2004).....	17
FIGURA 9. ESQUEMA DEL EQUIPO MICROPHAZIR MOD 1640 (THERMO FISHER SCIENTIFIC INC., WILMINGTON, MA, USA).	23
FIGURA 10. CUBETA DE CUARZO Y ALUMINIO UTILIZADA PARA EL ANÁLISIS NIRS.....	24
FIGURA 11. TOMA DEL ESPECTRO NIRS CON EL EQUIPO PHAZIR, EMPLEANDO LA CUBETA.....	24
FIGURA 12. DISTRIBUCIÓN ESPECTRAL DE LAS MUESTRAS DE LECHE. A) ESPECTROS PROMEDIO DE CADA UNA DE LAS 68 MUESTRAS DE LA POBLACIÓN CALIBRACIÓN, B) ESPECTRO DEL PROMEDIO DE TODA LA POBLACIÓN DE CALIBRACIÓN.	28
FIGURA 13. ESPECTROS DE MUESTRAS INDIVIDUALES. A) MUESTRA 2 Y B) MUESTRA 12 SE ASEMEJAN ENTRE SÍ, DEL MISMO MODO QUE LO HACEN C) Y D).	29
FIGURA 14. REPRESENTACIÓN TRIDIMENSIONAL DE LA POBLACIÓN DE MUESTRAS SEGÚN LA DISTANCIA DE MAHALANOBIS. SE INDICA EL NÚMERO DE MUESTRAS QUE SE ENCUENTRAN A MAYOR DISTANCIA DEL CENTRO.	30
FIGURA 15. CORRELACIÓN ENTRE LOS VALORES DE REFERENCIA VS LOS PREDICHOS NIRS PARA LOS PARÁMETROS A) GRASA Y B) ENERGÍA.	38
FIGURA 16. CORRELACIÓN ENTRE LOS VALORES DE REFERENCIA VS LOS PREDICHOS NIRS PARA LOS PARÁMETROS A) PROTEÍNA CRUDA (PC), B) PROTEÍNA REAL (PR), C) CARBOHIDRATOS (HC), D) SÓLIDOS TOTALES (TS).....	39

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. COMPARACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LECHE MADURA DE DISTINTOS ANIMALES. ADAPTACIÓN DE (ZHANG ET AL., 2016).....	4
TABLA 2. COMPONENTES DE LA LECHE MATERNA EN FUNCIÓN DE SU SOLUBILIDAD. ADAPTACIÓN DE (LAWRENCE & LAWRENCE, 2015).....	4
TABLA 3. APLICACIÓN DE LA QUIMIOMETRÍA A LA TECNOLOGÍA NIRS.	18
TABLA 4. INFORMACIÓN QUÍMICA SOBRE LAS MUESTRAS DE LMD	22
TABLA 5. RESUMEN DE LA INFORMACIÓN QUÍMICA DE CADA PARÁMETRO ANALIZADO.....	23
TABLA 6.. ESTADÍSTICOS DE CALIBRACIÓN OBTENIDOS TRAS APLICAR UN TRATAMIENTO DE PRIMERA DERIVADA 1.4.4.1.....	32
TABLA 7.ESTADÍSTICOS DE CALIBRACIÓN OBTENIDOS TRAS APLICAR UN TRATAMIENTO DE PRIMERA DERIVADA 1.10.5.1.....	33
TABLA 8.ESTADÍSTICOS DE CALIBRACIÓN OBTENIDOS TRAS APLICAR UN TRATAMIENTO DE SEGUNDA DERIVADA 2.6.4.1.....	35
TABLA 9. ESTADÍSTICOS DE CALIBRACIÓN OBTENIDOS TRAS APLICAR UN TRATAMIENTO DE SEGUNDA DERIVADA 2.5.5.1.....	36
TABLA 10.VALORES DE LOS MEJORES RESULTADOS OBTENIDOS.....	37

1. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS), y Asociaciones de Pediatría tanto Nacionales como Internacionales consideran que los Bancos de leche materna son necesarios para garantizar una alimentación adecuada en los niños recién nacidos prematuros (nacidos antes de las 32 semanas de gestación o con un peso inferior a 1500 g) o enfermos que, por alguna razón, no sea posible alimentar con la leche de su propia madre. Además, es necesario señalar que este tipo de alimentación redundaría en una mejora de la salud materno-infantil en la población general. Los bancos de leche son un servicio especializado integrado en las unidades de Neonatología de los hospitales, sus objetivos son la promoción y el apoyo a la lactancia materna, para ello se encargan de la selección de donantes, almacenamiento, procesamiento, análisis y distribución de la leche.

Con el fin de garantizar la seguridad de la leche donada, esta se somete a un proceso de pasteurización (62.5°C durante 30 minutos y después se enfría rápidamente en menos de 15 minutos hasta 4°C), el objetivo es eliminar las bacterias contaminantes y asegurar la ausencia de virus. A continuación, para determinar la calidad de la leche se lleva a cabo un análisis nutritivo de la misma, que incluye entre otros parámetros, proteínas, grasa y lactosa. Este análisis nutritivo, permite clasificar la leche nutricionalmente de manera que a cada recién nacido se le proporcione la leche más adecuada de acuerdo con sus necesidades.

Pues bien, entre las técnicas analíticas para llevar a cabo el análisis de alimentos, la espectroscopía en el infrarrojo cercano (NIRS) es una tecnología rápida, no contaminante y versátil, capaz de producir información sobre atributos de calidad de los mismos *in-situ* y en tiempo real. Además, no es necesario llevar a cabo ningún pretratamiento de la muestra para el análisis, por lo que es una técnica que no genera residuos, a diferencia de los análisis de componentes nutricionales tradicionales (método Soxhlet, método Kjeldahl, etc.).

Esta técnica espectroscópica se basa en la interacción de la radiación infrarroja con la muestra que llevará asociada una absorción de radiación que dependerá de los enlaces orgánicos presentes en las moléculas que constituyen la muestra.

La representación gráfica de la absorción, el espectro NIR, permite una primera visualización de los componentes del producto analizado. Sin embargo, su interpretación es muy compleja debido a la superposición de las bandas de absorción, la colinealidad, el elevado número de datos o las diversas fuentes de error, por ello la

aproximación univariante no resulta útil, es necesario aplicar análisis quimiométricos más complejos.

La Quimiometría es una disciplina de la Química Analítica que, mediante el uso de métodos estadísticos, matemáticos y lógicos, permite el diseño o selección de procedimientos óptimos de medida y trata de obtener el máximo de información relevante a partir de datos químicos. Para ello, los datos se someten a una serie de tratamientos matemáticos que posteriormente permitirán la obtención de información tanto cuantitativa como cualitativa.

El objetivo del presente trabajo es el de estudiar una alternativa metodológica basada en la espectroscopía de Infrarrojo cercano (NIRS) para cuantificar parámetros de calidad en leche materna donada. Para llevar a cabo este objetivo será necesario abordar las siguientes actividades:

- I. Familiarización con los equipamientos utilizados, NIRS, entendiendo su funcionamiento y el tratamiento de los datos obtenidos.
- II. Creación de una biblioteca de espectros de leche materna donada.
- III. Desarrollo de modelos quimiométricos de regresión multivariante, para extraer la máxima información posible de los espectros NIRS y posibilitar la cuantificación de distintos parámetros de calidad de le leche.

2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS

2.1. LECHE MATERNA

La leche materna (LM) es un fluido complejo y extremadamente variable que proporciona los nutrientes y componentes bioactivos necesarios para el correcto crecimiento y desarrollo de los lactantes.

Se considera alimento óptimo para el lactante durante los primeros meses de vida, puesto que aporta todos los nutrientes necesarios para su correcto desarrollo. La OMS recomienda **“la alimentación exclusiva al pecho durante los primeros 6 meses de vida del niño y continuar con el amamantamiento junto con otros alimentos que complementen la alimentación hasta los 2 años o más, mientras madre e hijo lo deseen”** (World Health Organization, 2003).

2.1.1. COMPOSICIÓN

La composición de la LM va cambiando a lo largo del periodo de lactancia, adaptándose a las necesidades nutricionales en esta etapa de rápido crecimiento del recién nacido. Según el momento de lactancia se pueden diferenciar tres clases, el calostro, la leche de transición y la leche madura (**Figura 1.**)



Figura 1. Comparación entre dos muestras de leche, a la izquierda calostro y a la derecha leche de transición. Fotografía tomada en el laboratorio.

El calostro es la primera leche, difiere de la leche madura tanto en volumen como en apariencia y composición, se produce los cuatro primeros días tras el parto en un volumen bajo, es un líquido amarillento y denso. Su alto contenido en componentes del sistema inmunológico como la inmunoglobulina A (IgA) indica que el papel principal del calostro es inmunológico, más que nutricional (Mosca & Gianni, 2017). A partir del quinto día la LM cambia gradualmente, la leche de transición presenta características intermedias entre el calostro y la leche madura, la cantidad total de proteínas e inmunoglobulinas disminuye y aumenta la cantidad de lactosa, lípidos y el aporte

calórico. Tras la segunda semana de lactancia la leche se considera prácticamente madura (Lawrence & Lawrence, 2015).

La LM está compuesta por: agua, proteínas, grasas, hidratos de carbono, vitaminas y minerales, además de contener hormonas, enzimas y otros compuestos bioactivos. En la **Tabla 1** se incluye la composición normal de leche humana madura y de otras especies (Zhang et al., 2016).

Tabla 1. Comparación de la composición de leche madura de distintos animales. Adaptación de (Zhang et al., 2016).

	ENERGÍA (Kcal/100ml)	PROTEINA (g/100 ml)	GRASA (g/100 ml)	CH (g/100 ml)	MI (g/100 ml)	ST (g/100ml)	HUMEDAD (g/100 ml)
HUMANO	65	1.1	3.5	7.2	0.2	12	88
VACA	67	3.3	3.8	4.8	0.7	12.6	87.4
PERRO	136	9.6	9.5	3.1	1	23.2	76.8
GATO	90	7	4.8	4.8	1	17.6	82.4
CABRA	65	2.9	3.8	4.7	0.8	12.2	87.8

CH: carbohidratos, MI: materia inorgánica, ST: sólidos totales.

El agua es el componente más abundante de la leche, el resto de los componentes se encuentran en disolución en fase acuosa (87%), en emulsión (4%), en las membranas del glóbulo graso (2%) en dispersión coloidal (0,3%) y células vivas (Lawrence & Lawrence, 2015) (**Tabla 2**).

Tabla 2. Componentes de la Leche Materna en función de su solubilidad. Adaptación de (Lawrence & Lawrence, 2015)

Compartimento		Componentes principales
Descripción	Contenido (%)	
Fase acuosa	87,0	<p>Calcio, magnesio, fosfatos (PO₄), sodio, potasio, cloro, CO₂, citratos</p> <p>Proteínas del suero: α-lactoalbúmina, lactoferrina, IgA, lisozima, albúmina sérica</p> <p>Lactosa y oligosacáridos</p> <p>Compuestos de nitrógenos no proteico: glucosamina, urea, aminoácidos</p> <p>Vitaminas hidrosolubles</p>
Dispersión coloidal	0,3	Caseínas: β y κ, Ca, PO ₄
Emulsión Glóbulos grasos	4,0	Triglicéridos, ésteres de glicerol
Membrana del glóbulo graso	2,0	Proteínas, fosfolípidos, colesterol, enzimas, minerales, vitaminas liposolubles
Células		Macrófagos, neutrófilos, linfocitos, células epiteliales

Proteínas

Las proteínas son el tercer componente más abundante presente en la LM por detrás de los carbohidratos y los lípidos. El contenido total de proteínas decrece bruscamente tras el primer mes de lactancia y sigue disminuyendo a un ritmo menor en los meses consecutivos (**Figura 2**), también existe una mayor variabilidad en el contenido de proteínas al comienzo de la lactancia que va decreciendo con el tiempo (Lönnerdal et al., 2017).

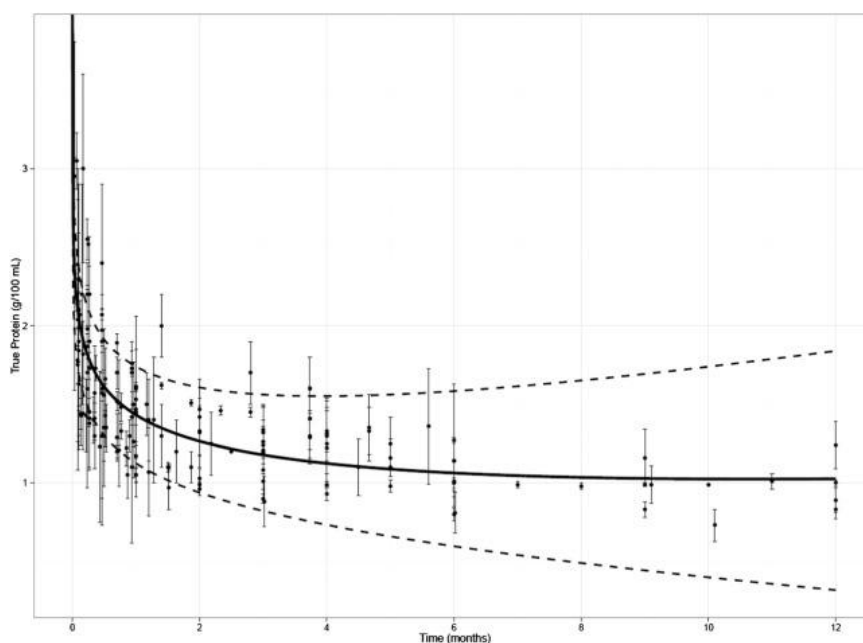


Figura 2. Disminución de la fracción proteica en LM en función del tiempo post-parto. (Lönnerdal et al., 2017)

Existen más de 400 proteínas de la leche que desempeñan diferentes funciones (Lönnerdal, 2004):

- contribuyen a la defensa del recién nacido frente a infecciones
- acción prebiótica facilitando la proliferación de la microbiota normal a la vez que impiden el asentamiento de bacterias patógenas
- desarrollo y maduración de las barreras mucosa
- intervienen en la absorción de otros nutrientes

Las proteínas presentes en la leche se pueden clasificar en tres grupos, en función de su solubilidad: mucinas, caseínas y proteínas del suero.

Las mucinas, son proteínas que se localizan en la membrana de los glóbulos lipídicos y que contribuyen muy poco en el porcentaje total de proteínas (Patton & Huston, 1986),

como su contenido está directamente relacionado con el contenido de grasa, éste no varía prácticamente durante la lactancia (Lönnerdal, 2003).

La caseína predominante en la LM es la beta-caseína (Jensen, 1995), normalmente se presenta en forma de micelas complejas de caseinato y fosfato cálcico. Las proteínas del suero son: alfa-lactoalbúmina, lactoferrina, seroalbúmina, inmunoglobulinas, glicoproteínas, lisozima y otras enzimas, moduladores del crecimiento y hormonas. Es importante destacar en el suero, el gran contenido en alfa-lactoalbúmina, una proteína que juega un papel importante en la síntesis de lactosa y que es fuente de aminoácidos esenciales, especialmente triptófano, lisina y cistina (Aguayo Maldonado et al., 2004).

El contenido de estos dos últimos grupos varía mucho durante la lactancia, en los primeros días la concentración de proteínas del suero es muy elevada y las caseínas son prácticamente indetectables, a medida que suceden los días, las caseínas comienzan a ser sintetizadas en la glándula mamaria y la concentración aumenta. La proporción aproximada de ambos grupos de proteínas es de 60:40 aunque varía desde un 80:20 en la leche de inicio y un 50:50 en leche madura (Lönnerdal, 2003).

El contenido real de proteínas se suele sobreestimar debido a la gran porción de nitrógeno no proteico presente en la leche humana (Donovan & Lönnerdal, 1989).

Nitrógeno no proteico

El nitrógeno no proteico se mantiene estable a lo largo del tiempo, principalmente por el contenido de urea.

Otros compuestos nitrogenados, además de la urea, son aminoácidos libres, péptidos y nucleótidos, en total representan el 25% del nitrógeno presente en la LM. Es una fracción poco estudiada constituida principalmente por compuestos bioactivos con funciones implicadas en el desarrollo y maduración del aparato digestivo, la correcta formación de la microbiota y la maduración del sistema inmune (Andreas et al., 2015).

Carbohidratos

El principal carbohidrato de la leche es la lactosa, un disacárido compuesto por galactosa y glucosa. De hecho, la LM presenta los niveles más elevados de lactosa en comparación con otras especies debido a la alta demanda energética del sistema nervioso central (SNC), su concentración media es de 6,8 g/100 ml (Jensen, 1995). Su contenido comienza a incrementarse de manera rápida los primeros días de lactancia, y es uno de los compuestos más estables de la LM (Picciano, 2001). La lactosa facilita la absorción del calcio, previene trastornos como el raquitismo y es una fuente de galactosa, un nutriente esencial para el correcto desarrollo del SNC.

Otros hidratos de carbono presentes en LM son: monosacáridos, oligosacáridos, glucopéptidos, glicoproteínas, glucosa y sacarosa. Además, hay presentes otros carbohidratos complejos, libres o unidos a aminoácidos y proteínas, como la N-acetilglucosamina (Lawrence & Lawrence, 2015).

Los oligosacáridos representan una fracción muy importante de la LM, varía de 2,09 g/100 ml a los cuatro días posparto a 1,29 g/100 ml en la leche madura. Son compuestos indigeribles por el aparato digestivo de los niños, su función es prebiótica, permiten el desarrollo de la microbiota del recién nacido, en especial la promoción de distintas especies de bifidobacterias en el intestino, estas bacterias generan un pH ácido que inhibe el crecimiento de otras bacterias patógenas (Coppa et al., 1993).

Lípidos

Los lípidos son los componentes más variables de la leche humana, las concentraciones aumentan desde 2g/100ml en el calostro, hasta los 4-4,5g/100 ml a los 15 días posparto, en ese momento la concentración se estabiliza y se mantiene constante, pero con variaciones interpersonales tanto en contenido total como en composición (Crawford et al., 1976).

La fracción lipídica de la LM representa la principal fuente de energía y suministra nutrientes esenciales como vitaminas liposolubles y ácidos grasos poliinsaturados (Koletzko & Rodriguez-Palmero, 1999). La asimilación de lípidos es esencial para el desarrollo de los recién nacidos, no solo por el aporte calórico, sino también para la síntesis y desarrollo del SNC.

Los triglicéridos representan el 98% de los ácidos grasos de la leche, en concreto, predominan los ácidos grasos de cadena larga e insaturados y una gran cantidad de ácidos grasos esenciales (ácido linoleico y linoléico). La composición de estos ácidos en la leche puede variar según la dieta de la madre (Brooks et al., 2000).

Otros componentes

Además de los macronutrientes, la LM contiene una gran variedad de micronutrientes y sustancias bioactivas indispensables para un correcto desarrollo (Lawrence & Lawrence, 2015).

- **Minerales.** Su concentración está adaptada a las necesidades del recién nacido, su biodisponibilidad es alta en forma de iones, sales no ionizadas o débilmente ionizadas. Entre los principales se encuentran: sodio, potasio, calcio, magnesio, fosfato, cloro y citrato.

- Vitaminas. Son necesarias en cantidades mínimas para catalizar el metabolismo celular, el crecimiento y mantenimiento del organismo. Vitaminas hidrosolubles: la vitamina C y del grupo B y liposolubles: A, D, E, K.
- Enzimas. La LM aporta principalmente, dos grupos de enzimas: enzimas digestivas, que facilitan la digestión como las lipasas (lípidos) o amilasas (polisacáridos) y enzimas defensivas, como la lisozima que posee un factor antimicrobiano no específico.
- Hormonas. Hormonas proteicas como la prolactina y hormonas esteroideas como estrógenos y corticoides. También están presentes ciertas prostaglandinas, un grupo de sustancias lipídicas que actúan como moduladores celulares, pueden desempeñar funciones como la vasodilatación, la estimulación del músculo intestinal o la agregación plaquetaria.
- Componentes defensivos, dotan a la leche de su valor inmunológico. Se incluyen componentes celulares tales como macrófagos, leucocitos polimorfonucleados, linfocitos y componentes humorales como las inmunoglobulinas, sobre todo en el calostro.

2.1.2. BENEFICIOS DE LA LACTANCIA MATERNA

La LM posee múltiples beneficios, para el lactante y para la madre, pero también beneficios para la comunidad y el entorno.

Como se ha mencionado anteriormente, la alimentación con leche materna es necesaria para el desarrollo del recién nacido y lo protege frente a diversas infecciones, entre las que se incluyen meningitis bacterianas, diarreas, infecciones del tracto respiratorio superior, enterocolitis necrotizante, otitis, infecciones de orina y en último término, una sepsis (Heinig, 2001). Se ha comprobado que la muerte posneonatal (entre el primer y el decimoprimer mes de vida) se reduce en un 21% en aquellos niños que se alimentan con LM (Chen & Rogan, 2004). También existen estudios que sugieren que la lactancia también se relaciona con menor incidencia del síndrome de muerte súbita infantil durante el primer año de vida, diabetes mellitus, linfomas, leucemia, sobrepeso y obesidad, hipercolesterolemia, alergias y asma, en niños y adultos que recibieron LM en comparación con los que no (Eidelman et al., 2012)

Sin embargo, la lactancia no solo es beneficiosa para el recién nacido, sino que hay evidencias de que también lo es para la madre (Labbok, 2001), desde una mejor recuperación del parto, menos sangrado, una involución del útero más rápida gracias a la liberación de oxitocina y facilidad para recuperar el peso de antes del embarazo a una

disminución del riesgo a: padecer cáncer de mama o de ovario, de rotura de huesos y de osteoporosis en el periodo menopáusico (Eidelman et al., 2012).

Por último, cabe destacar que es una práctica más económica que la alimentación con leche de fórmula, supone un ahorro a nivel familiar y un ahorro del sistema sanitario (Weimer, 1999), es la mejor opción de alimentación para niños prematuros o con enfermedades digestivas (Bernardo *et al.*, 2013; Eidelman *et al.*, 2012; Lawrence & Lawrence, 2015) y es una práctica sostenible con el medio ambiente, ya que genera menos residuos que la lactancia artificial (Radford, 1992).

2.2. BANCOS DE LECHE MATERNA DONADA

A principios del siglo XX, debido al contexto social asociado al número creciente de huérfanos, la disminución de nodrizas y el desarrollo de la tecnología de los alimentos, se ponen en funcionamiento los primeros bancos de leche materna donada (LMD) en Europa y Estados Unidos, el primero de ellos se inauguró en Viena en el año 1909, a partir de ese momento tuvo lugar la primera expansión de estos centros en numerosos países. En la década de los 80, con la aparición del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y la constatación del paso del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) a través de la leche se redujo drásticamente el desarrollo de los bancos, sin embargo, una década después, gracias a diversas investigaciones sobre la seguridad de los procesos de pasteurización y congelación, los bancos de leche vuelven a expandirse, además también aumentan los estudios que demuestran los beneficios de la LM para los recién nacidos prematuros o enfermos (Asociación Española de Bancos de Leche Humana, 2021; Moro, 2018).

En el año 2010 se funda la Asociación Europea de Bancos de Leche (EMBA), con el fin de promover los bancos de leche y facilitar la cooperación internacional entre los países europeos. En la actualidad, hay bancos de leche por todo el mundo y la tendencia es hacia la creación de nuevos bancos (Asociación Española de Bancos de Leche Humana, 2021; Moro, 2018). En España existen 16 bancos de leche humana, la Asociación Española de Bancos de Leche Humana (AEBLH) es la encargada de diseñar y mejorar guías con el objetivo de homogenizar criterios y unificar métodos de trabajo (Asociación Española de Bancos de Leche Humana, 2021; Calvo *et al.*, 2018). El Banco de Leche Materna de Asturias es una Unidad especializada del Servicio de Neonatología del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) ubicado en Oviedo y posee dos centros satélites para la entrega de la leche donada en el Hospital Universitario de Cabueñes (Gijón) y en el Hospital Universitario San Agustín (Avilés) (Banco de Leche Materna de Asturias, 2019) (**Figura 3**).



Figura 3. Logotipos de la EMBA, la AEHLH y del Banco de Leche Materna de Asturias.

2.2.1. FUNCIONAMIENTO DE UN BANCO DE LMD

Los bancos de LM son un servicio especializado orientado a la promoción y el apoyo a la lactancia materna y responsable de proporcionar LMD a los pacientes que la precisen, garantizando su seguridad y calidad. En él, se desempeñan las funciones de selección de donantes, almacenamiento, procesamiento, análisis y distribución de la leche (Gormaz *et al.*, 2011). En nacimientos prematuros, es común que la madre no genere leche o que lo haga en una cantidad insuficiente, en estos casos, la mejor alternativa es recurrir a la alimentación con leche donada (Bernardo *et al.*, 2013; Eidelman *et al.*, 2012; Lawrence & Lawrence, 2015). En general, son candidatos para recibir LMD neonatos con un peso al nacer inferior a los 1500 g o menores de 32 semanas de gestación y niños con problemas digestivos graves, con malformaciones digestivas u otras patologías que puedan comprometer gravemente el tubo intestinal (Banco de Leche Materna de Asturias, 2019).

Cualquier mujer lactante sana puede donar su leche de forma voluntaria y altruista. En este grupo de mujeres se incluyen aquellas cuyo hijo haya fallecido pre o posnatalmente, para el resto de los casos, para donar leche, deben de haber transcurrido al menos 2-4 semanas tras el parto y debe de estar bien establecido el amamantamiento de su propio hijo y en ningún caso se podrá poner en riesgo este amamantamiento (Banco de Leche Materna de Asturias, 2019).

El esquema del funcionamiento de trabajo en un banco de leche se resume en la **Figura 4**. Como se puede observar es un proceso altamente monitorizado que asegura la trazabilidad, calidad y seguridad de la leche donada.

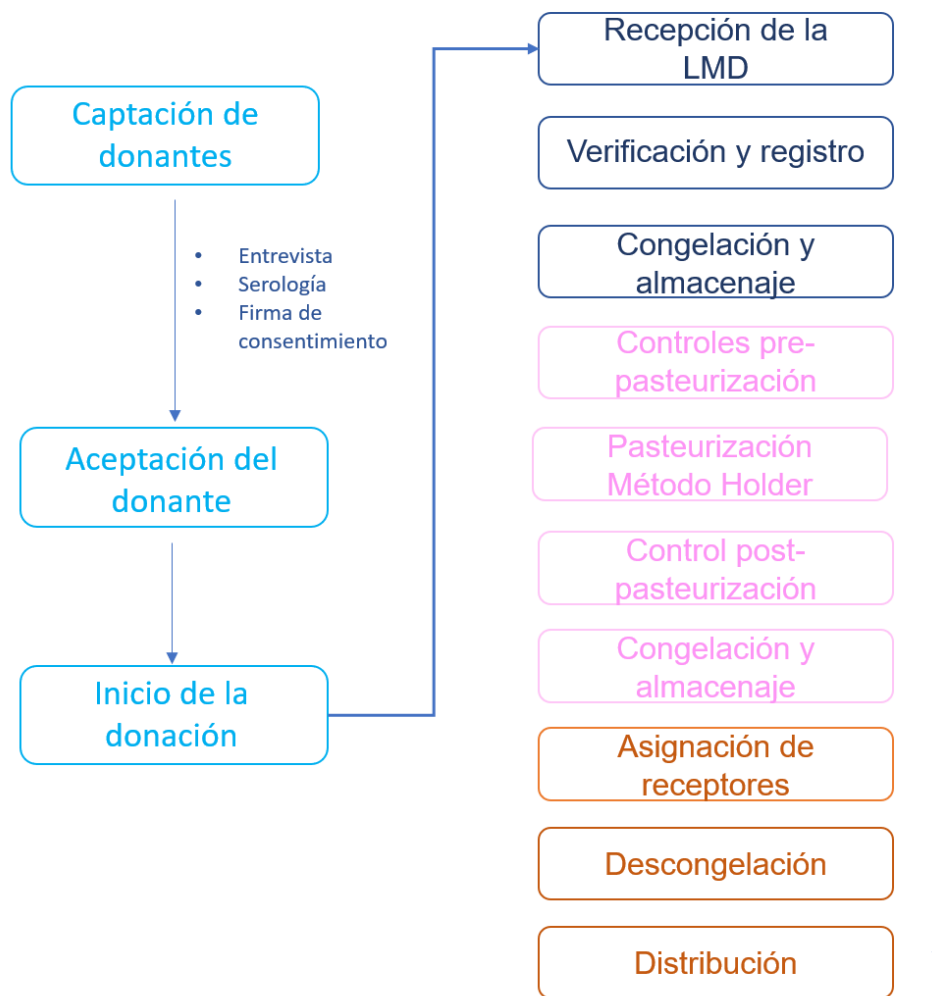


Figura 4. Esquema del funcionamiento de en un banco de leche. Adaptación de Banco de Leche Materna de Asturias, 2019

En el control, antes de la pasteurización se realiza una primera selección de la leche, lo cual permite descartar muestras contaminadas. En primer lugar, se analizan las características organolépticas: color, olor y presencia de cuerpos extraños o impurezas, a continuación, se debe realizar un control microbiológico, en el cual se descartarán las leches con una cantidad superior a las 10^5 unidades formadoras de colonias (ufc)/ mL, en este análisis se presta especial atención en la presencia de *Staphylococcus aureus* y *Bacillus spp.* esporulados. También, la leche se valora por su acidez en grados Dornic, se descartan aquellas muestras cuya acidez sea superior a los 8º Dornic, ambas pruebas están estrechamente relacionadas. Una vez descartadas las muestras que no son válidas, se analiza el contenido de proteínas, hidratos de carbono y lípidos (Calvo *et al.*, 2018).

Toda la LMD ha de ser pasteurizada para la inactivación de posibles agentes patógenos como virus y bacterias (Arslanoglu *et al.*, 2010). El método de pasteurización utilizado en los bancos de leche es el método Holder: calentamiento de la leche a 65°C durante 30 minutos y a continuación, se enfría rápidamente (menos de 20 minutos) a 4°C (Calvo *et al.*, 2018). Múltiples estudios han corroborado que, la pasteurización por el método Holder no afecta al valor nutricional de la leche (Peila *et al.*, 2016).

Una vez pasteurizada, la leche se somete de nuevo a un análisis microbiológico, se desechará cualquier muestra en la que se detecte un contenido superior a 10 ufc/ml. La LMD que no haya sido descartada se almacena en un congelador un máximo de 3 meses a -20/-30°C y hasta 12 meses a -80°C (Calvo *et al.*, 2018).

Es importante destacar que en ocasiones la LMD no es capaz de cubrir todas las necesidades nutricionales del recién nacido prematuro, por tanto, para optimizar los aportes nutricionales se han diseñado fortificantes que aportan energía, proteínas, minerales y vitaminas, la mayoría de ellos son preparados multicomponentes derivados de leche de vaca (Arslanoglu *et al.*, 2019).

2.3. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CERCANO (NIR)

La región del espectro infrarrojo se descubrió en el año 1800, cuando William Herschel estudiaba el color del calor de la luz solar dentro del rango visible del espectro electromagnético. Para ello, equipado con un prisma para separar los colores de la luz y un termómetro, pudo observar un incremento de la temperatura al mover el termómetro más allá de la región del rojo, a esta radiación fuera del rango visible la denominó radiación infrarroja (Herschel, 1800).

Los espectros de absorción de bandas anchas, solapadas y de poca intensidad de la región del infrarrojo cercano hacían que se considerara esta zona del espectro de poco interés, la asignación de bandas a estructuras o grupos funcionales específicos era demasiado compleja, siendo en el año 1881 cuando se documentaron los primeros espectros líquidos orgánicos en el intervalo espectral de 700 a 1200 nm (Abney & Festing, 1881).

Sin embargo, no fue hasta la segunda mitad del siglo XX cuando se empezaron a desarrollar la tecnología y los instrumentos necesarios para la aparición de los primeros espectrofotómetros comerciales NIR, posibilitando también el desarrollo de las primeras aplicaciones analíticas (Kaye, 1954). Uno de los precursores del uso de esta técnica fue el grupo de investigación de Karl Norris en el Departamento de Agricultura de Estados Unidos, que en la década de los 60 comienza a publicar estudios sobre su aplicabilidad

en el sector agroalimentario demostrando un gran potencial analítico (Ben-Gera & Norris, 1968; Karl H. Norris, 1964) . El auge definitivo se alcanza en la década de los 80 y de los 90 gracias al avance paralelo de la tecnología NIRS y de la informática.

En la actualidad, esta tecnología está difundida en diferentes campos de investigación y en sistemas de control de calidad en diversos sectores como el agroalimentario, farmacéutico, químico y petroquímico, textil, ambiental y en biología y medicina (Garrido *et al.*, 1997; Kaffka & Giarmati, 1995).

Entre las numerosas ventajas que presenta la espectroscopia NIR habría que destacar:

- Proporciona un análisis rápido (minutos o milisegundos).
- Se realiza un análisis simple, con escasa o nula preparación de la muestra.
- No existe destrucción de la muestra.
- Bajo coste económico, tanto instrumental como de procedimiento, no requiere disolventes
- Es multiproducto.
- Modo de análisis respetuoso con el medioambiente, no genera residuos.
- Es multiatributo con reducido coste analítico por muestra en análisis de rutina.
- Ofrece diseños instrumentales versátiles, flexibles, miniaturizables, portátiles y con conexión inalámbrica a la red de computación en la nube.

También es necesario señalar sus inconvenientes:

- Es un método analítico secundario, precisa de un análisis de referencia para elaborar modelos de calibración.
- No es un método universal, los modelos desarrollados son solo de aplicación para muestras bien definidas.
- La baja sensibilidad de la señal dificulta la determinación a bajas concentraciones
- El coste medio del desarrollo de modelos multivariados es elevado.
- Requiere de personal técnico cualificado.
- Es necesario el empleo de distintos métodos matemáticos de estandarización para transferir los modelos de calibración de un instrumento a otro.

La región del infrarrojo (IR) se encuentra en el intervalo del espectro electromagnético comprendida entre la región visible y la de microondas, intervalo espectral $770\text{-}10^6$ nm. A su vez esta región se divide en tres zonas diferentes (**Figura 5**):

- Infrarrojo cercano (NIR): $770\text{-}2500$ nm
- Infrarrojo medio (MIR): $2500\text{-}5 \times 10^4$ nm

- Infrarrojo lejano (FIR): $5 \times 10^4 - 10^6$ nm

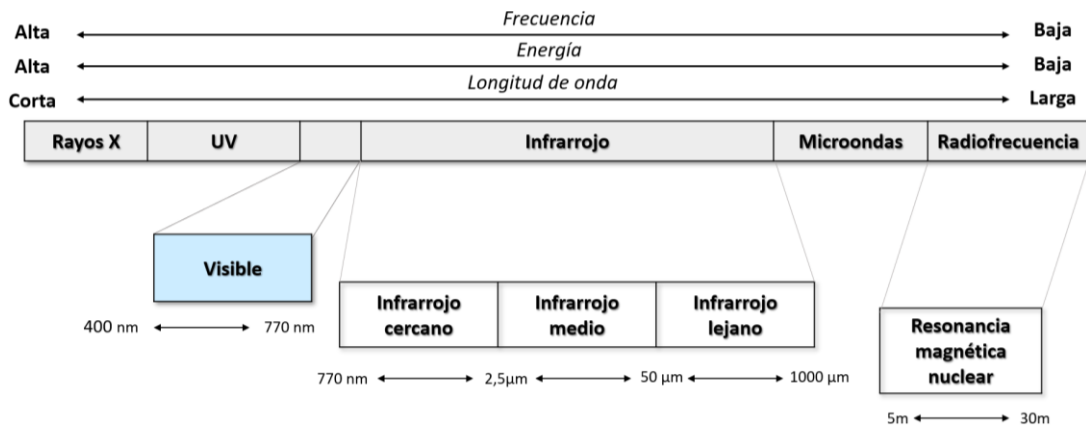


Figura 5. Espectro electromagnético, adaptación (Pavia et al., 2014)

Las longitudes de onda de la región NIR son las más energéticas de todo el rango del infrarrojo, tiene menor frecuencia que la luz visible y mayor que las microondas, por lo tanto, sus frecuencias características le proporcionan una serie de propiedades específicas.

La tecnología NIR, como técnica espectroscópica vibracional, se define como la emisión de un haz de luz sobre la muestra, la cual en función de su composición, en concreto, de la naturaleza de los enlaces presentes en sus moléculas (C-H, N-H, O-H y C-O) interaccionará con ellos absorbiendo una determinada cantidad de radiación NIR (Burns & Ciurczak, 2008).

Para que una molécula pueda absorber radiación infrarroja, la energía de radiación tiene que coincidir con la diferencia de energía entre dos estados energéticos y debe de producirse un cambio en el momento dipolar de la molécula debido a los movimientos vibratorios (Siesler, 2007). Los modos de vibración más importantes se suelen clasificar en dos grupos: las vibraciones de tensión (*stretching*), que pueden ser simétricas o asimétricas y las vibraciones de deformación o flexión (*bending*), que pueden ser en el mismo plano o fuera de él (**Figura 6**).

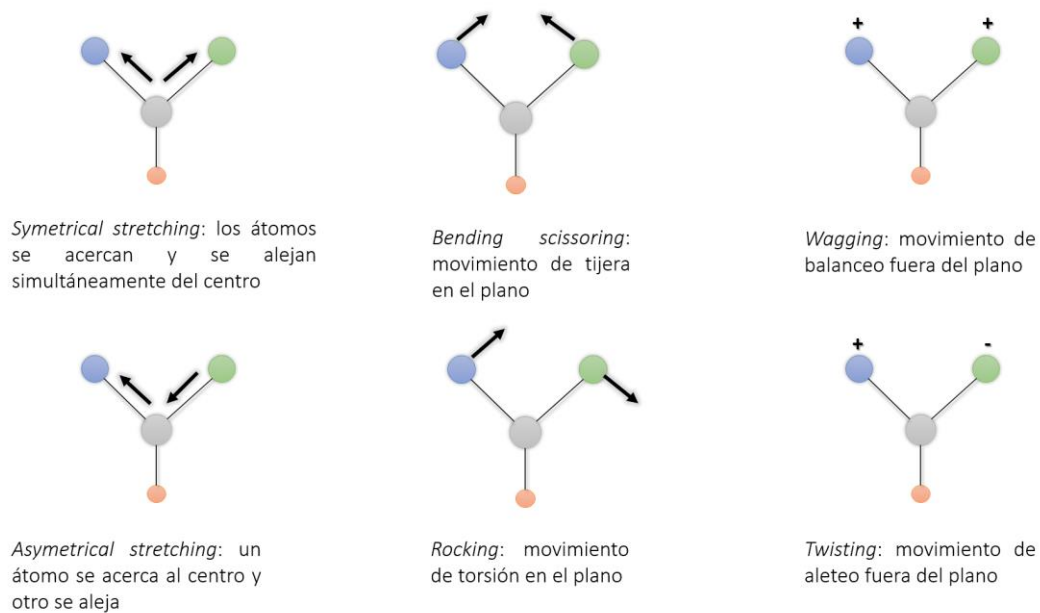


Figura 6. Vibraciones moleculares entre dos átomos con respecto a un átomo. Elaboración propia.

La energía absorbida incrementa la energía de los modos de vibración en las moléculas a través de tres mecanismos:

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

La radiación absorbida no puede ser calculada directamente, en su lugar se puede medir la absorción relativa respecto a una referencia estable, para ello se mide la transmitancia o reflectancia difusa y se correlaciona con la luz absorbida. Este proceso, tanto para la energía transmitida [1] como reflejada [2] sigue la ecuación de Lambert-Beer (Bertrand & Dufour, 2000; Burns & Ciurczak, 2008; Osborne *et al.*, 1993) :

$$[1] \text{ Absorbancia} = \log \frac{I_0}{I_t} = -\log T = \varepsilon(\lambda) \cdot b \cdot c$$

$$[2] \text{ Absorbancia} = \frac{1}{R} = -\log \frac{I_0}{I_r} = \frac{\varepsilon(\lambda) \cdot b \cdot c}{s}$$

Los términos de la ecuación se corresponden con: la intensidad de radiación incidente en la muestra (I_0), intensidad de radiación transmitida a través de la muestra (I_t), intensidad reflejada (I_r), transmitancia (T), reflectancia (R), absortividad molar (o

coeficiente de extinción molar) (ϵ), longitud de onda (λ), paso óptico de la luz a través de la muestra (b), concentración de las moléculas absorbentes (c) y el coeficiente de dispersión (s). Esta ecuación permite relacionar la absorbancia de una muestra con la concentración de una molécula o analito capaz de absorber radiación presente en la misma muestra (Bertrand & Dufour, 2000; Osborne *et al.*, 1993; Shenk & Westerhaus, 1995). Sin embargo, esta teoría no se puede aplicar al 100% a la tecnología NIR ya que para que sea válida tiene que haber ausencia de luz dispersa (efecto *scatter*), a pesar de ello, es ampliamente utilizada (Osborne, 2006). En la **Figura 7** se representan esquemáticamente los diferentes fenómenos de interacción entre radiación y materia.

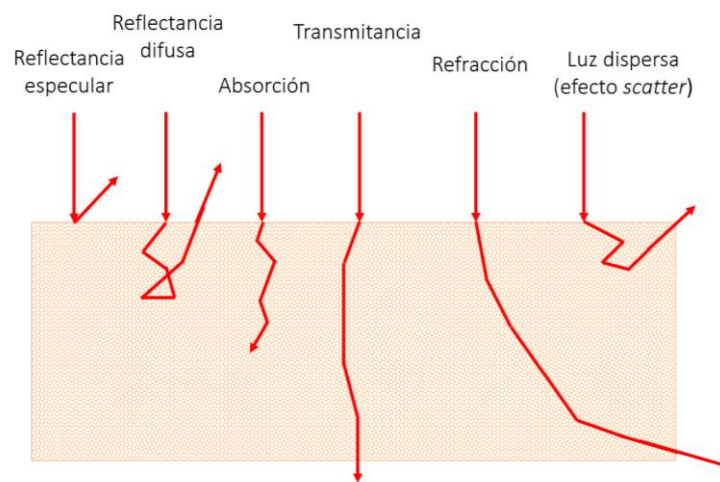


Figura 7. Fenómenos de interacción entre radiación y materia.

La representación gráfica de los valores de absorbancia obtenidos en diferentes longitudes de onda del rango NIR da lugar a una curva denominada espectro NIR, el cual es el resultado de los sobretonos, bandas de combinación y absorciones de radiación de los grupos funcionales presentes en las moléculas de la muestra (**Figura 8.**) (Bertrand & Dufour, 2000; Burns & Ciurczak, 2008; Murray *et al.*, 2004).

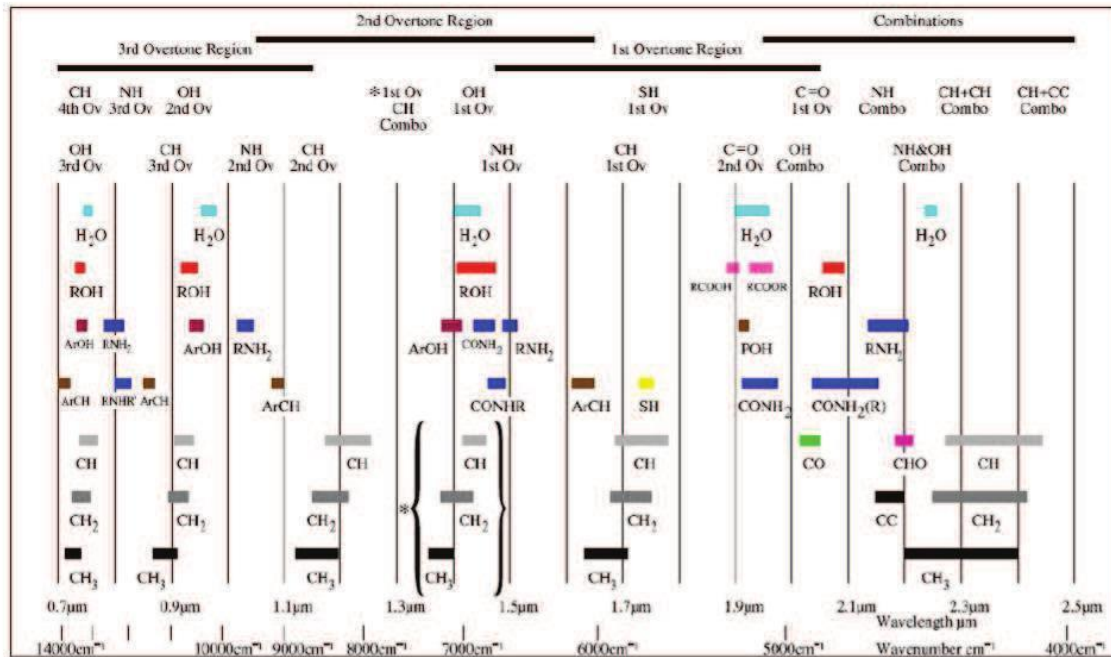


Figura 8. Bandas de absorción en la región NIR (Murray et al., 2004)

En las bandas se encuentran principalmente enlaces moleculares tipo X-H, donde X puede ser: un átomo de nitrógeno, carbono, oxígeno, azufre o grupos C=O, lo que se traduce en un espectro muy complejo propio de cada material (Osborne *et al.*, 1993; Williams & Norris, 2001).

Si bien, los espectros NIR son muy complejos de interpretar, por el hecho de que las vibraciones de diferentes enlaces moleculares estén involucradas en la misma banda de absorción, quedando la información solapada, estos pueden ser utilizados para aportar información relevante. Es importante destacar que, dos espectros de un mismo material pueden presentar diferencias debido a factores como la humedad, cristalinidad, temperatura, tamaño de partícula, etc., que pueden producir efectos multiplicativos y/o errores de base. Además, existen otras fuentes de error, relacionadas con el instrumento y la operación. Por tanto, para extraer la información es necesario el uso de análisis multivariante (Burns & Ciurczak, 2008; Naes *et al.*, 2002; Osborne *et al.*, 1993).

2.4. ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICO Y SU APLICACIÓN EN NIRS

La quimiometría es un término que introdujo Wold en el año 1972, fue definida como la disciplina de la Química Analítica que, mediante el uso de métodos estadísticos, matemáticos y otros de lógica formal, diseña o selecciona procedimientos y experiencias óptimos de medida y/o trata de obtener la máxima información química relevante a partir de datos químicos (Wold, 1972). En la actualidad, la quimiometría es una aplicación

esencial tanto dentro de la química como en otras ciencias (Massart *et al.*, 1998; Wold & Sjöström, 1998).

La gran superposición de las bandas de absorción de los constituyentes de la muestra, el elevado número de datos y la colinealidad (información redundante) provocan una baja selectividad de los datos espectrales NIRS. Es por eso mismo que la aproximación univariante que se suele utilizar en el resto de las técnicas espectroscópicas no resulta útil (Osborne *et al.*, 1993).

Además de los factores mencionados, para la extracción de información relevante de los datos es importante tener en cuenta las posibles fuentes de error. Dichas fuentes pueden agruparse en tres grupos: los errores relacionados con el instrumento (relación señal/ruido, exactitud y precisión en la longitud de onda, linealidad de la señal, tipo y tamaño de cápsula, etc.), relacionados con la muestra (homogeneidad, densidad, textura, granulometría, estabilidad ante fluctuaciones de temperatura, etc.) y operacionales (preparación de la muestra, errores del analista, estrategias y procedimientos analíticos empleados, etc.) (Williams, 1987).

Por todo ello, es necesario emplear herramientas quimiométricas complejas, entre ellas destacan los métodos de análisis multivariante (Otto, 1999). El análisis multivariante se define como diferentes métodos ya sean estadísticos, matemáticos o gráficos, empleados en el análisis de datos siempre y cuando se consideren para dicho análisis varias variables de forma simultánea (Martens & Martens, 2001; Martens & Naes, 1989; Naes *et al.*, 2002). En el caso de la tecnología NIRS, los métodos de análisis multivariante se emplearán para estimar cualquier propiedad de la muestra (físico-química) a partir de múltiples variables espectrales (absorbancia a diferentes longitudes de onda) (**Tabla 3**).

Tabla 3. Aplicación de la Quimiometría a la tecnología NIRS.

QUIMIOMETRÍA	
Tratamiento de los datos espectrales para obtener información relevante	Desarrollo de modelos predictivos
Reducción del ruido espectral	Regresión lineal múltiple
Corrección de la línea de base	Regresión por componentes principales
Mejora de la resolución espectral	Regresión por mínimos cuadrados
Centrado y normalización	

El procesado de los datos espectrales requiere de algunas transformaciones matemáticas que permitan eliminar cambios de línea de base, cambios de pendiente y curvilinearidad de espectros, es decir, reducir la influencia de determinados factores

físicos. Las transformaciones matemáticas que habitualmente se llevan a cabo en los espectros NIR son las siguientes:

- Primera y segunda derivada (Osborne *et al.*, 1993). Aplicando el concepto matemático de derivada a los datos espectrales, se reduce el efecto del tamaño de la partícula, simplificando la correlación entre los datos espectrales a diferentes longitudes de onda y corrigiendo la línea de base del espectro.
- *Standard normal variate* (SNV) (Barnes *et al.*, 1993; Rinnan *et al.*, 2009). Es la transformación matemática de los espectros en $\log(1/R)$, cuya finalidad es reducir el efecto de la dispersión, que consiste en restar a cada valor original de absorbancia la media del espectro y dividir este resultado por la desviación típica del mismo.
- *Detrend* (DT) (Barnes *et al.*, 1993). Es la aplicación de una función polinómica de segundo grado sobre los valores de reflectancia en $\log(1/R)$ para eliminar la curvatura lineal y cuadrática de cada espectro. En el caso de muestras sólidas, son debidas a las diferentes presiones de empaquetamiento.
- *Standard normal variate transformation and detrending* (SNVD) (Barnes *et al.*, 1989). Combinando las dos anteriores, corrige la línea de base y elimina las interferencias entre espectros correspondientes a muestras de similar composición química, pero con tamaño de partícula diferentes.
- *Multiplicative scatter correction* (MSC) (Isaksson & Næs, 1988). Su finalidad es reducir o eliminar las diferencias asociadas con la radicación difusa entre muestras antes de efectuar la calibración. Consiste en una regresión lineal entre los valores espectrales de cada muestra, cuyas absorbancias son valoradas de acuerdo con su desviación estándar, y el espectro promedio. A cada valor de $\log(1/R)$ se le resta la constante de intersección y se le divide por la pendiente de la recta de regresión estimada.

Los datos obtenidos, sometidos o no a algún tipo de tratamiento quimiométrico, pueden ser empleados tanto en análisis cuantitativo como en cualitativo.

2.4.1. ANÁLISIS CUANTITATIVO

El análisis cuantitativo es el más extendido dentro de las aplicaciones de la tecnología NIRS, permite estimar la concentración de un analito en una determinada muestra. Implica el desarrollo de una ecuación matemática que relacione los valores espectrales expresados como $\log(1/T)$ o $\log(1/R)$ y los de un método analítico de referencia, en muestras de composición conocida. A este proceso se le denomina etapa de calibración, a la relación matemática, ecuación de calibración y al grupo de muestras de composición

conocida, colectivo de calibración o aprendizaje. Una vez establecida la ecuación de calibración, ésta permite predecir la concentración de analitos en otras muestras similares a las del colectivo de calibración (Shenk & Westerhaus, 1993, 1995, 1996).

La primera etapa en el desarrollo de la ecuación de calibración es la selección de las muestras que conformarán el colectivo de calibración. Esta etapa es de gran importancia, ya que debe de ser un conjunto de muestras que representen la variabilidad espectral y química del colectivo para el cual vamos a desarrollar el modelo de calibración. Para ello existen diferentes herramientas de selección, la mayoría de ellas se basan en la realización de un análisis de componentes principales (CP), seguido del cálculo de distancias entre muestras (espectros) en un espacio n-dimensional, a través generalmente de lo que conocemos como distancia de Mahalanobis (Shenk & Westerhaus, 1993, 1995, 1996). La distancia de Mahalanobis, calcula la distancia entre dos puntos en el espacio de longitud de onda. Esta distancia se puede usar en NIR de diferentes formas: para calcular la distancia al centro de la población (el punto donde todos los componentes principales confluyen) y para encontrar la distancia de vecindad respecto a cada una de las muestras.

Una vez seleccionadas las muestras, éstas deben de ser analizadas mediante el método de referencia, y el espectro NIRS debe ser recogido con el equipamiento y en las condiciones experimentales más adecuadas para el ensayo concreto. A continuación, se seleccionan las variables espectrales a considerar para poder desarrollar el modelo matemático que relacione ambos tipos de datos. Para ello existen diferentes métodos de regresión (Naes *et al.*, 2002), siendo los más utilizados:

- Regresión lineal múltiple (MLR).
- Regresión por componentes principales (PCA)
- Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS)

La regresión MLR, lleva a cabo la regresión a partir de un pequeño número de variables seleccionadas de entre todo el espectro. Las variables son seleccionadas mediante un test F, son aquellas que presentan una mayor correlación entre el valor de absorbancia a una longitud de onda determinada y el dato de composición química.

Los métodos de regresión PCA y PLS se asemejan en sus fundamentos, ya que en ambos casos se pretende generar nuevas variables, combinar linealmente los datos espectrales originales y emplear estas nuevas variables para desarrollar la ecuación de regresión (Martens & Martens, 2000; Shenk & Westerhaus, 1995), de esta manera solo se considera, en el desarrollo de la regresión, la información realmente relevante de los datos espectrales. La principal diferencia entre ambos métodos se basa en el tipo de

combinaciones lineales que se construyen a partir de los datos originales. El análisis PCA emplea los valores de los componentes principales. El análisis PLS construye unos factores, los cuales se seleccionan de manera que expliquen el mayor porcentaje de variabilidad, no solo en los datos espectroscópicos, sino que también la mayor variabilidad en los datos de composición química, estos factores maximizan la varianza explicada de la matriz espectral de forma que sean relevantes para predecir parámetros de la muestra con los datos de referencia (Martens & Naes, 1989; Naes *et al.*, 2002; Shenk & Westerhaus, 1995; Wold *et al.*, 2001) .

Durante el desarrollo de calibración, siempre se observa la presencia de muestras que, por diversos motivos, presentan un comportamiento diferente al resto de muestras presentes en el colectivo de calibración. La detección de muestras atípicas o *outliers* es un paso fundamental, estas muestras se agrupan en dos grandes categorías: anómalos espectrales y anómalos químicos.

Para la detección de anómalos espectrales, normalmente se emplean métodos como el cálculo de distancias en espacios n-dimensionales, como la distancia de Mahalanobis o el estadístico de Leverage y el cálculo de residuales de los datos espectrales, es decir, espectros que presenten una parte importante de su variabilidad sin explicar por el modelo generado (Shenk & Westerhaus, 1995).

Tras el desarrollo de la ecuación, es esencial de determinar su capacidad de predicción de muestras que no hayan intervenido en la calibración. Este proceso se denomina etapa de validación (o validación externa), las muestras empleadas en dicha etapa se designan como colectivo de validación.

Una variante a este método de validación es la validación cruzada, que se basa únicamente en los datos empleados en la etapa de calibración (Stone, 1974). Para ello, se eliminan de forma sucesiva muestras del colectivo de calibración que son empleadas para validar la ecuación desarrollada a partir del resto de muestras del colectivo de calibración que no han sido eliminadas. El procedimiento se repite hasta lograr que todas las muestras hayan sido utilizadas una vez para realizar la validación. Con ello se logra obtener una estimación de la capacidad de predicción de una ecuación más real que la obtenida durante el desarrollo del modelo de calibración.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Para el desarrollo de este trabajo se han empleado un total de 17 muestras de LMD pasteurizada procedentes del Banco de Leche Materna de Asturias (HUCA). La información relativa a los parámetros nutritivos y de calidad de las muestras se adjunta en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Información química sobre las muestras de LMD

Nº Muestra	GRASA (g/100ml)	PC (g/100ml)	PR (g/100ml)	HC (g/100ml)	ENERGÍA (Kcal/100ml)	TS (g/100ml)
1	1.9	1.1	0.9	7.7	53	10.9
2	4.1	1	0.8	8	74	13.2
3	2.6	1.3	1	7.8	61	11.9
4	1.7	1.1	0.9	7.8	52	10.9
5	4.5	1.1	0.9	8.4	80	14.2
6	2.1	1.5	1.2	8.8	61	12.6
7	2	1.5	1.2	8.8	61	12.5
8	4.4	1.3	1	8.4	80	14.3
9	3.7	-	0.8	8.2	72	-
10	5.3	1	0.8	8.1	86	14.6
11	4.5	1.7	1.4	8.1	81	14.5
12	4.6	1.1	0.9	8.4	81	14.3
13	3.5	1.1	0.9	8	70	12.9
14	3.9	1	0.8	8.3	73	13.3
15	4.1	1.1	0.9	8.6	77	14
16	2.2	2.5	2	8.2	64	-
17	5.1	0.9	0.7	8.4	85	-

PC: proteína cruda (proteína y nitrógeno no proteico); PR: proteína real; HC: hidratos de carbono; TS: sólidos totales.

3.1. TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras se descongelaron y se atemperaron en un baño termostático a 37° C (RAYPA). A partir de las 17 muestras originales, con el fin de incrementar la variabilidad muestral se generaron otras 3 baterías de 17 muestras cada una, para ampliar el colectivo de calibración mediante mezcla y/o dilución con agua de las originales. En la **Tabla 5** se recogen los estadísticos que describen la población de calibración.

Tabla 5. Resumen de la información química de cada parámetro analizado.

	GRASA (g/100ml)	PC (g/100ml)	PR (g/100ml)	HC (g/100ml)	ENERGÍA (Kcal/100ml)	TS (g/100ml)
Promedio	2.43	0.85	0.72	5.76	49.48	7.55
Máximo	5.30	2.50	2.00	8.80	86.00	14.60
Mínimo	0.51	0.00	0.21	2.31	15.60	0.00
DS	1.32	0.50	0.38	2.56	22.87	4.87

PC: proteína cruda (proteína y nitrógeno no proteico), PR: proteína real, HC: hidratos de carbono, TS: sólidos totales, DS: desviación estándar.

La información composicional de cada una de estas muestras se adjunta en el **Anexo I**.

3.2. ESPECTROS NIRS DE LECHE MATERNA

Para la obtención de los espectros NIRS se ha empleado un equipo portátil microPHAZIR Mod. 1624 (*Thermo Fisher Scientific Inc.*, Wilmington, MA, USA), con un peso de 1,8 kg, provisto de una pantalla LCD y baterías recargables con 10 horas de autonomía. Incluye un sistema electromecánico (MEMS) y una fuente de luz de tungsteno incandescente para a iluminación, siendo seguro para los usuarios y para la integridad de la muestra. Posee un único detector InGaAs de amplio espectro, lo que permite que sea un equipo de bajo coste, con un consumo energético eficiente y una buena respuesta espectral. Es un equipo compacto y manejable, tiene forma de pistola y referencia integrada que facilita la calibración (**Figura 9**).



Figura 9. Esquema del equipo microPHAZIR mod 1640 (*Thermo Fisher Scientific Inc.*, Wilmington, MA, USA).

Una vez preparadas y atemperadas las muestras, se procedió a su análisis NIRS, para ello se agitan suavemente con el fin de homogeneizarlas y se trasvasan 5 ml a una cubeta (**Figura 10**). La cubeta empleada posee un paso óptico de 17 mm, con una pared de cuarzo (la de incidencia de radiación) y otra pared posterior de aluminio que refleja la radiación NIR y posibilita el hecho de que la radiación atraviese doblemente la muestra (Foss, Ref. US-ISIH-0398).

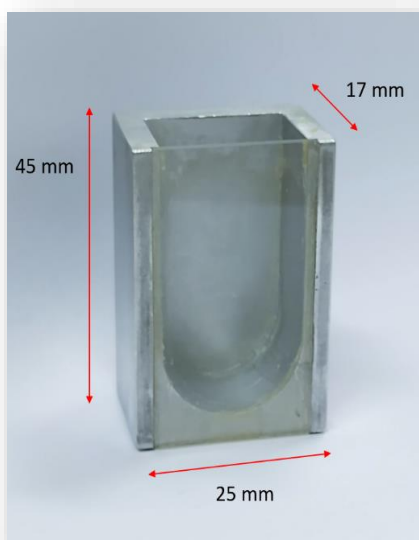


Figura 10. Cubeta de cuarzo y aluminio utilizada para el análisis NIRS.

La recogida de información espectral se realizó a partir de la exposición directa sobre la cubeta (**Figura 11**), cada espectro NIRS es el promedio de la realización de 5 barridos.



Figura 11. Toma del espectro NIRS con el equipo Phazir, empleando la cubeta.

Los resultados se recogieron como $\log(1/R)$ (**ecuación 2**) y se analizaron 3 submuestras diferentes de cada una de las muestras de leche. Los datos obtenidos se almacenan en la memoria interna del equipo y se exportan vía conexión microUSB a un ordenador.

3.3. DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE CALIBRACIONES NIRS

3.3.1. SOFTWARES

La información espectroscópica almacenada en la memoria del equipo NIRS se exportó al programa de cálculo Excel para llevar a cabo un tratamiento de la información espectral. El equipo NIRS utilizado recoge espectros en un rango comprendido entre 1596-2396nm con un intervalo aproximado 8,7nm (no constante), estos datos se interpolaron con una macro de Excel que permite obtener a partir de un espectro con 100 datos, un dato cada 2nm, constituyendo cada espectro un total de 401 datos (Modroño Lozano, 2015).

Tras la transformación de la información espectral, se llevó a cabo el análisis quimiométrico de los espectro NIRS mediante el Software, WinISI II Proyect Management v.1.50 (Infrasoft 165 International, Prot Matilda, PA, USA). Éste es un paquete de software de calibración, que contiene programas de operación de rutina e incluye herramientas útiles de pretratamiento, caracterización de señal espectral y de calibración. Además, este software permite importar directamente los espectros, gestionar las muestras y bases de datos locales para evaluar las similitudes o diferencias existentes en los valores de absorbancia entre varios espectros (Shenk & Westerhaus, 1995). Permite también estimar el espectro promedio y la desviación estándar de un conjunto de espectros procedentes de diferentes muestras y evaluar las diferencias y/o similitudes entre espectros con el estadístico RMS (raíz cuadrada del error cuadrático medio).

Las ecuaciones de calibración se desarrollaron utilizando el método de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) y validación cruzada para la selección del número óptimo de factores evitando el sobreajuste (*overfitting*). Los *outliers* químicos se detectan automáticamente mediante prueba T de Student, que compara los valores de referencia con los valores de predicción (del análisis NIRS), el software quimiométrico considera *outliers* aquellas muestras cuyos valores T fueron superiores a 2,5 (Mark & Workman, 1991).

3.3.2. PRETRATAMIENTO

Con el objetivo de corregir los fenómenos de *scattering* se aplicó el pretratamiento matemático SNVD. El programa utilizado emplea una notación de cuatro dígitos, el primer dígito (*a*) se refiere al orden de magnitud de la derivada (0 = espectro sin derivar, 1 = 1ª derivada, 2 = 2ª derivada, etc.); el segundo dígito (*b*) indica el tamaño del segmento sobre el cual se realiza la derivación (intervalo expresado en nanómetros donde se realiza el cálculo de la derivada). Los dígitos tercero (*c*) y cuarto (*d*) muestra el tamaño de los intervalos, expresados en nanómetros, empleados para el cálculo de suavización de la derivada. Para la elección de los tratamientos se consultó bibliografía relacionada, en concreto, sobre aplicación de tecnología NIRS en leche de vaca, los tratamientos aplicados, siguiendo el modelo *a.b.c.d*, y, fueron los siguientes: 1.4.4.1, 1.10.5.1, 2.6.4.1 y 2.5.5.1 (de la Roza-Delgado *et al.*, 2017).

3.3.3. MODELOS ESTADÍSTICOS

La evaluación de los modelos de calibración desarrollados se evaluó en base a los siguientes parámetros estadísticos:

- Coeficiente de determinación de la calibración (RSQ). Medida de bondad de ajuste del modelo de regresión utilizado. Establece una correlación entre los datos obtenidos por el método de referencia y los predichos por las ecuaciones de calibración para un determinado parámetro. Se busca el valor más próximo a 1.
- Error estándar de calibración (SEC). Error asociado a las diferencias existentes entre las medidas primarias obtenidas por los métodos de referencia y los resultantes del análisis NIRS para los parámetros analíticos determinados en las muestras utilizadas en la calibración. Dicho estadístico al ser únicamente un estimador del error del modelo quimiométrico empleado, suele sobrestimar la capacidad real de predicción de una ecuación (Mark & Workman, 1991; Naes *et al.*, 2002; Shenk & Westerhaus, 1995).
- Coeficiente de determinación para la validación cruzada (1-VR). Porcentaje de la variación existente en el grupo de validación cruzada que puede ser explicado por el modelo para el parámetro estudiado. Para este estadístico se pueden tener en cuenta los siguientes criterios interpretativos (Shenk & Westerhaus, 1996) .
 - $1-VR > 0,9$, indica una calibración excelente
 - $0,89 > 1-VR > 0,7$, la calibración se puede considerar buena
 - $0,69 > 1-VR > 0,5$, el modelo obtenido permite una adecuada discriminación entre las muestras de alto, medio y bajo contenido del parámetro en cuestión

- Error estándar de validación cruzada (SECV). Error de los residuales para el colectivo de validación cruzada, el cual ha de ser el menor posible. El procedimiento de validación cruzada utilizado por el software selecciona el número de componentes del modelo de acuerdo con el valor más bajo del error de predicción.

- RPD. Es la relación entre la desviación típica del grupo de calibración y el error típico de validación cruzada o de predicción. Este cociente ha de ser mayor o igual que 3, aunque un valor de 2,5 es aceptable (Williams, 2001).

- RER. Se define como relación entre el intervalo de composición de los datos de referencia para el colectivo de calibración y el error estándar de validación cruzada. Existen cuatro niveles de exactitud (Millmier *et al.*, 2000):

- RER<4: la ecuación no es utilizable
- 4<RER<8: la calibración puede distinguir entre valores altos y bajos
- 8<RER<12: la ecuación permite predecir cuantitativamente datos
- RER> 12: indica una buena predicción

El mejor modelo de predicción fue seleccionado atendiendo a criterios estadísticos, eligiéndose aquellos con los menores valores de error estándar (SEC y SECV) los mayores coeficientes de determinación (RSQ y 1-VR).

4. RESULTADOS EXPERIMENTALES

A continuación, se detallan los resultados obtenidos tras llevar a cabo el estudio y la evaluación de la información espectral y finalmente, los modelos de calibración obtenidos para cada uno de los parámetros analizados en las muestras de LMD.

4.1. EVALUACIÓN DE LA INFORMACIÓN ESPECTRAL

Tras la recogida de información espectral con el equipo NIRS para cada una de las 68 muestras, se procedió a la exportación espectral en formato “.csv”, para detectar posibles espectros aberrantes o falta de reproductibilidad entre las tres submuestras analizadas para cada muestra de LMD. Para ello se realizó la representación gráfica de los espectros NIRS (Longitud de onda (nm) vs log (1/R)) para cada una de las tres réplicas de cada muestra analizadas, y se eliminaron aquellos espectros que se mostraron claramente diferentes.

A continuación, se promediaron los valores para cada longitud de onda, obteniéndose un espectro promedio de cada una de las muestras analizadas. En la **Figura 12.** se representan los espectros de las 68 muestras analizadas y el espectro promedio de la población global.

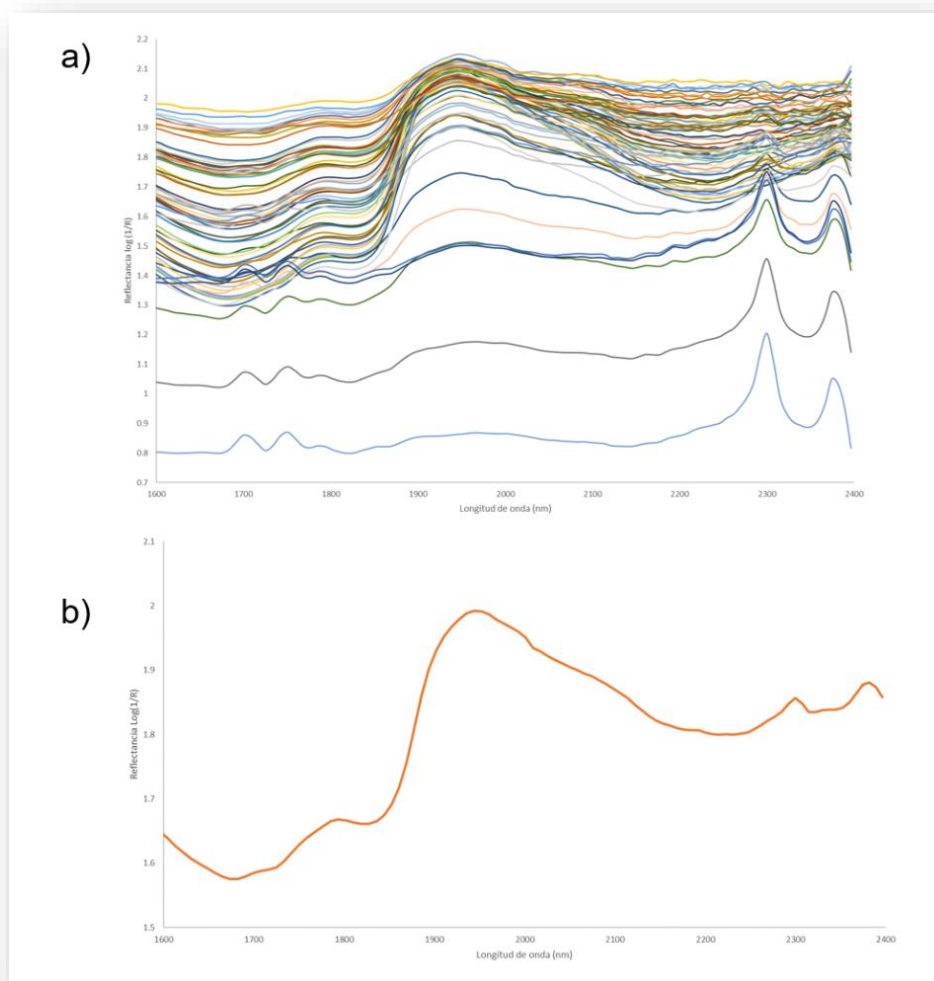


Figura 12. Distribución espectral de las muestras de leche. a) espectros promedio de cada una de las 68 muestras de la población calibración, b) espectro del promedio de toda la población de calibración.

Como se puede observar en la **Figura 12a)**, existen dos tipos de espectros totalmente diferenciados, en base a la presencia o ausencia de bandas intensas de absorción a 2300 y 2380 nm. Más aún, tal y como se muestran en los espectros recogidos en la **Figura 13a) y b)**, existen muestras de leche que no presentan la doble banda de absorción en el rango de 2300-2400nm. Con el fin de dar una respuesta a estas diferencias espectrales, se llevó a cabo la revisión individualizada de las poblaciones espectrales claramente diferenciadas, y se trató de establecer alguna diferenciación asociada a las muestras primarias, mezclas o diluciones preparadas para ampliar la variabilidad espectral, sin embargo, no se observó ninguna diferenciación clara en lo que respecta a la composición de las muestras.

Tal y como se observa en la **Figura 13** la banda más intensa y que está presente en todos los espectros es la que posee un máximo a 1950 nm, la cual se relaciona con la

presencia de H₂O debido a la absorción asociada al enlace O-H. Alrededor de 1750nm se observan también máximos de absorción (uno en la **Figura 13 a)** y **b)** y varios en las **Figura 13 c)** y **d)**), tras una revisión de las vibraciones asociadas a estas longitudes de onda, de acuerdo con la bibliografía, estos espectros corresponderían a la vibración de los enlaces C-H, asociados a hidratos de carbono (Burns & Ciurczak, 2007).

En lo que respecta a los dos máximos observados en 2300 y 2380nm, éstos se relacionan también con vibraciones de los enlaces C-H, sin embargo, a diferencia del caso anterior, la bibliografía recoge que están asociados a la presencia de grasa en las muestras (Burns & Ciurczak, 2007).

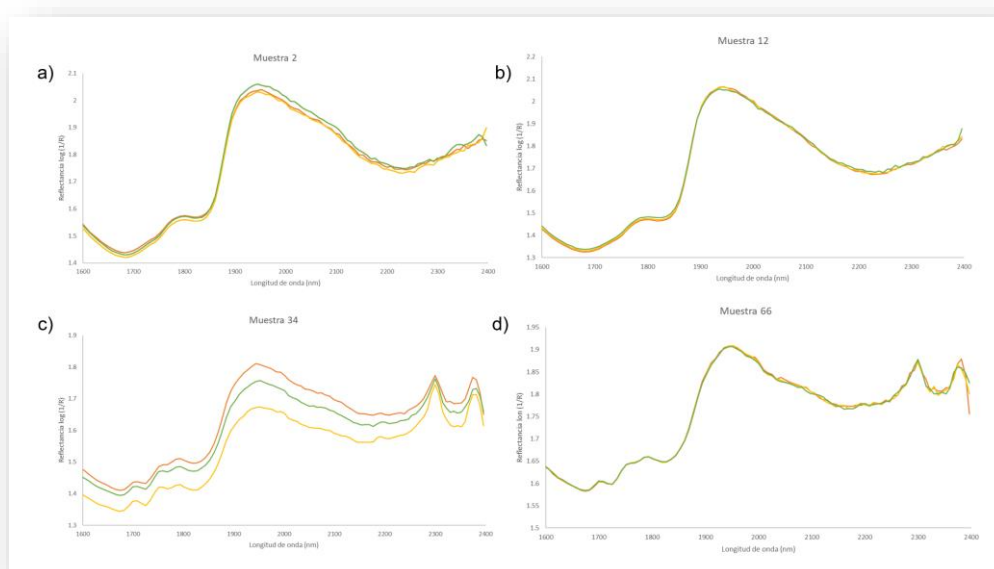


Figura 13. Espectros de muestras individuales. a) muestra 2 y b) muestra 12 se asemejan entre sí, del mismo modo que lo hacen c) y d).

En lo que respecta a la variación en la línea de base que se observa en el espectro 13 c), esto es debido a los procesos de dispersión de la luz o *scattering* que tienen lugar cuando la radiación NIR incide sobre la muestra. Para realizar la corrección de ese efecto, y que no influya en el desarrollo de los modelos de calibración, es necesario aplicar las transformaciones matemáticas detalladas en el apartado 2.4. de este trabajo (derivadas y SNV).

Una vez obtenidos los datos de referencia y seleccionada la información espectral correspondiente a cada muestra, el siguiente paso fue establecer una base de datos que incluya ordenadamente la información espectral y de referencia de todas las muestras involucradas en este trabajo. Esta base de datos es el punto de partida para el desarrollo de los modelos de calibración NIRS.

4.2. DESARROLLO DE MODELOS DE CALIBRACIÓN

Tal y como se recoge en el apartado 3. **Material y Métodos**, se ensayaron cuatro combinaciones de pretratamientos de la información espectral: 1.4.4.1, 1.10.5.1, 2.6.4.1, y 2.5.5.1, en los que el primer dígito define el orden de la derivada, el segundo indica el tamaño del segmento sobre el cual se realiza la derivación (intervalo expresado en nanómetros donde se realiza el cálculo de la derivada). Los dígitos tercero y cuarto detallan el tamaño de los intervalos, expresados en nanómetros, empleados para el cálculo de suavización de la derivada.

Una vez establecidos los pretratamientos a realizar de la información espectral, primeramente, es necesario determinar la estructura y variabilidad de la población espectral mediante el uso del algoritmo *Center* incluido en el software WinISI. Este programa realiza un análisis de componentes principales para calcular el centro de la población y la distancia de los espectros de las muestras a ese centro en un espacio n -dimensional usando la distancia de Mahalanobis (H). Las muestras con un valor estadístico superior a 3 se consideraron *outliers*. Una vez eliminados los anómalos se utilizó el resto de las muestras para desarrollar el modelo de predicción. En la **Figura 14**, se muestra la representación gráfica de la población espectral en función de los tres primeros componentes principales.

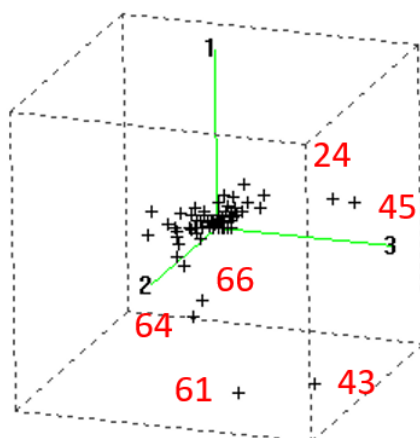


Figura 14. Representación tridimensional de la población de muestras según la distancia de Mahalanobis. Se indica el número de muestras que se encuentran a mayor distancia del centro.

Como se puede observar en la **Figura 14.**, las muestras más lejanas al centro de la población en este caso son la 24, 43, 45, 61, 64 y 66, poseen un valor de H mayor de 3 y por tanto, son *outliers* espectrales, que será necesario eliminar antes de proceder al desarrollo del modelo de calibración.

Tras la eliminación de los *outliers* espectrales, el siguiente paso fue llevar a cabo el desarrollo de los modelos de calibración para cada uno de los parámetros de interés. La calibración se llevó a cabo con todo el espectro y mediante regresión por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS) y validación cruzada con grupos aleatorios. Para cada tratamiento y parámetro se evaluaron diferentes agrupaciones de validación cruzada, concretamente 4, 7, 10 y 12 grupos.

Se desarrollaron todos los modelos planteados para cada parámetro, un cómputo de 96 modelos en total y a continuación, se seleccionó el mejor tratamiento matemático para cada caso, teniendo en cuenta los valores de los errores estándar de calibración y validación cruzada (SEC y SECV) y de los coeficientes de determinación de calibración y validación cruzada (RSQ y 1-VR). En las **Tablas 6 y 7** se muestran los estadísticos de calibración y validación cruzada para los tratamientos de primera derivada y segmentos de derivación de 4 y 10 puntos respectivamente, mientras que las **Tablas 8 y 9** recogen los resultados obtenidos cuando se utiliza un pretratamiento de segunda derivada con segmentos de derivación de 6 y 5 puntos respectivamente.

Con el fin de facilitar la evaluación de los resultados, se ha establecido un código de colores que clasifica los tratamientos en base a los criterios citados en el apartado **3.3.3. Modelos Estadísticos** de este trabajo: verde si los valores del coeficiente de determinación para validación cruzada son superiores a 0.7, lo cual significa que se ha obtenido una calibración buena o excelente si es superior a 0.9; color ámbar si los valores obtenidos son entre 0.69 y 0.5, en ese caso, el tratamiento permite discriminar entre valores altos y bajos y finalmente se resaltó en rojo a los valores inferiores de 0.5, que indican una mala calibración.

El primer tratamiento evaluado es el 1.4.4.1. Como se puede observar en la **Tabla 6**, todos los valores de 1-VR obtenidos para los parámetros grasa, HC, energía y TS son próximos a 0.8, por ello, de acuerdo con la bibliografía consultada, se consideran buenas calibraciones. Cabe destacar el valor de 1-VR obtenido con este tratamiento y con 4 grupos de validación cruzada para el parámetro energía, puesto que con un valor de 0.910, del coeficiente de validación cruzada es considerado como una calibración excelente (Shenk & Westerhaus, 1996).

En contraposición a los resultados de los parámetros anteriores, el tratamiento aplicado sobre PC y PR no permite obtener estadísticos de calibración satisfactorios. Los valores de 1-VR en los modelos con 4, 7 y 12 grupos en PC y con 7 grupos en PR son menores de 0.5, concretamente sus valores son de 0.415, 0.346, 0.375 y 0.416 respectivamente. Los modelos con 10 grupos en PC y 4, 10 y 12 grupos en PR presentan valores de entre

0.5 y 0.7, por lo que, atendiendo a la bibliografía, permitirían obtener discriminaciones entre valores altos y bajos de cada parámetro.

En cuanto al efecto del número de grupos de validación cruzada, para este tratamiento no se ve un patrón claro. Para el parámetro TS, se observa que el menor valor de SEC y el mayor valor de RSQ, 0.578 y 0.978 respectivamente, se obtienen con el menor número de grupos de validación cruzada propuesto, 4 grupos. Sin embargo, para el resto de los parámetros los valores más bajos de error y más altos de coeficiente de determinación se han obtenido con un mayor número de grupos, de 10 grupos para el caso de PC (0.120 y 0.878), HC (0.480 y 0.959) y energía (3.090 y 0.979) y de 12 grupos para grasa (0.172 y 0.977) y PR (0.097 y 0.893).

Tabla 6.. Estadísticos de calibración obtenidos tras aplicar un tratamiento de primera derivada 1.4.4.1.

Tratamiento matemático	Parámetro	grupos validación cruzada	Min	Máx	Media	SD	SEC	RSQ	SECV	1-VR
1.4.4.1	GRASA	4	0.95	5.10	2.638	1.162	0.235	0.959	0.378	0.894
		7	0.95	5.30	2.744	1.256	0.261	0.957	0.435	0.883
		10	0.78	5.30	2.581	1.269	0.272	0.954	0.420	0.891
		12	0.78	4.50	2.548	1.135	0.172	0.977	0.364	0.899
	PC	4	0.30	1.30	0.783	0.341	0.156	0.792	0.259	0.415
		7	0.30	1.30	0.821	0.346	0.170	0.758	0.291	0.346
		10	0.27	1.30	0.770	0.344	0.120	0.878	0.204	0.654
		12	0.27	1.30	0.761	0.349	0.245	0.504	0.276	0.375
	PR	4	0.21	1.20	0.662	0.298	0.124	0.827	0.190	0.598
		7	0.24	1.20	0.672	0.294	0.157	0.714	0.225	0.416
		10	0.24	1.20	0.679	0.288	0.096	0.890	0.195	0.550
	HC	12	0.24	1.20	0.677	0.295	0.097	0.893	0.170	0.665
		4	2.34	8.60	6.267	2.350	0.531	0.949	1.209	0.738
		7	2.34	8.80	6.167	2.438	0.579	0.944	1.234	0.747
		10	2.34	8.60	6.184	2.364	0.480	0.959	1.059	0.805
	ENERGÍA	12	2.34	8.80	6.094	2.421	0.566	0.945	1.190	0.761
		4	18.30	86.00	55.471	21.003	3.851	0.966	6.279	0.910
		7	21.00	86.00	54.679	21.386	3.742	0.969	7.988	0.860
		10	18.30	86.00	54.904	21.194	3.090	0.979	6.962	0.895
	TS	12	18.30	86.00	56.076	20.949	3.882	0.966	7.145	0.885
4		3.87	14.60	10.103	3.858	0.578	0.978	1.609	0.821	
		7	3.87	14.60	9.991	3.916	1.661	0.820	2.068	0.724

10	3.87	14.60	9.474	3.892	0.730	0.965	1.664	0.818
12	3.87	14.60	10.112	3.981	0.861	0.953	1.723	0.814

Min: mínimo, Máx: máximo, SD: desviación estándar, SEC: error estándar de calibración, RSQ: coeficiente de determinación de la calibración, SECV: error estándar de validación cruzada, 1-VR: coeficiente de determinación para validación cruzada, PC: proteína cruda (proteína y nitrógeno no proteico), PR: proteína real, HC: hidratos de carbono, TS: sólidos totales.

El segundo tratamiento es el 1.10.5.1, y sus resultados se recogen en la *Tabla 7*.. Como se puede observar, predominan los resultados satisfactorios (marcados en verde), es decir con valores del coeficiente de validación cruzada superiores a 0.7, en concreto, la mayoría de ellos son valores próximos o superiores a 0.9, lo que indica calibraciones excelentes.

Solo dos de las pruebas estudiadas obtuvieron valores de 1-VR inferiores a 0,69, se trata de los tratamientos con 7 y 12 grupos de validación para el parámetro PC, los valores obtenidos, 0.665 y 0.684, indican que estos modelos permitirían discriminar entre altos y bajos valores.

En este caso, al observar los resultados en función del número de grupos de calibración, se observa que, los valores de error más bajos y de coeficientes de determinación más altos son en todos los casos con 7 o 10 grupos.

Tabla 7. Estadísticos de calibración obtenidos tras aplicar un tratamiento de primera derivada 1.10.5.1.

Tratamiento matemático	Parámetro	grupos validación	Min	Máx	Media	SD	SEC	RSQ	SECV	1-VR
1.10.5.1	GRASA	4	0.85	5.30	2.626	1.270	0.240	0.964	0.337	0.934
		7	0.85	5.30	2.689	1.272	0.205	0.974	0.321	0.937
		10	0.85	5.30	2.664	1.261	0.254	0.959	0.366	0.919
		12	0.85	5.30	2.651	1.265	0.254	0.960	0.313	0.940
	PC	4	0.30	1.30	0.782	0.341	0.101	0.913	0.165	0.762
		7	0.27	1.50	0.808	0.369	0.132	0.872	0.215	0.665
		10	0.30	1.30	0.800	0.336	0.093	0.923	0.134	0.850
		12	0.30	1.50	0.821	0.351	0.142	0.837	0.201	0.684
	PR	4	0.24	1.20	0.705	0.284	0.107	0.857	0.155	0.712
		7	0.21	1.20	0.671	0.300	0.108	0.869	0.155	0.735
		10	0.24	1.20	0.692	0.288	0.067	0.946	0.107	0.866

HC	12	0.24	1.20	0.683	0.285	0.082	0.917	0.129	0.802
	4	2.40	8.80	6.475	2.268	0.381	0.972	0.810	0.887
	7	2.40	8.60	6.450	2.233	0.304	0.982	0.703	0.905
	10	2.40	8.60	6.396	2.293	0.301	0.983	0.695	0.909
	12	2.40	8.60	6.213	2.317	0.372	0.974	0.790	0.892
ENERGÍA	4	21.00	86.00	54.515	21.102	3.916	0.966	6.592	0.906
	7	21.00	86.00	57.660	20.202	3.191	0.975	5.237	0.932
	10	21.00	86.00	54.827	21.535	2.999	0.981	5.143	0.945
	12	21.00	86.00	54.656	21.267	3.252	0.977	6.160	0.920
TS	4	3.87	14.60	9.293	3.861	0.525	0.981	1.046	0.927
	7	3.96	14.60	9.835	3.879	0.428	0.988	0.943	0.942
	10	4.29	14.60	10.546	3.421	0.309	0.992	0.910	0.940
	12	3.87	14.60	9.463	3.983	0.540	0.982	1.137	0.918

Min: mínimo, Máx: máximo, SD: desviación estándar, SEC: error estándar de calibración, RSQ: coeficiente de determinación de la calibración, SECV: error estándar de validación cruzada, 1-VR: coeficiente de determinación para validación cruzada, PC: proteína cruda (proteína y nitrógeno no proteico), PR: proteína real, HC: hidratos de carbono, TS: sólidos totales.

En la **Tabla 8** se recogen los datos obtenidos al aplicar el tratamiento 2.6.4.1. Todos los valores de 1-VR para los parámetros energía y TS son próximos a 0.8 y los obtenidos para grasa a 0.9, es decir, en base a la bibliografía citada, buenas y excelentes calibraciones. Para el caso de PC, se observa que los valores más altos de 1-VR, 0.794 y 0.803, se obtienen en las pruebas con 7 y 10 grupos de validación, los resultados con 4 y 12, 0.684 y 0.562, permitirían discriminar muestras. Los resultados con 4 y 7 grupos para la PR son inferiores a 0.5, 0.274 y 0.489, y con 10 y 12 grupos se obtienen valores superiores a 0.5, 0.564 y 0.661, por lo que permitirían la discriminación. Con el parámetro CH, sucede algo similar, con el menor número de grupos de calibración se obtienen valores de 1-VR inferiores, en este caso de entre 0.5 y 0.69, 0.635 y 0.662, y superiores con 10 y 12 grupos, 0.778 y 0.841.

En relación con la influencia del número de grupos de validación, se observan efectos similares en grasa y PC: los resultados de SEC y RSQ con 4 y 12 grupos se asemejan entre sí, así como los de los grupos 7 y 10, por ejemplo, en el caso de la grasa los valores de SEC para 4 y 12 grupos son 0.220 en ambos casos y los de RSQ 0.970 y 0.968, para 7 y 10 los valores de SEC son 0.277 y 0.274 y los de RSQ 0.952 y 0.949. Para los parámetros PR y HC, como ya se ha mencionado, se observa que, los valores de 1-VR de las pruebas con un menor número de grupos son inferiores a las pruebas con más grupos. No se aprecia ningún efecto claro sobre los parámetros energía y TS.

Tabla 8. Estadísticos de calibración obtenidos tras aplicar un tratamiento de segunda derivada 2.6.4.1.

Tratamiento matemático	Parámetro	grupos validación	Min	Máx	Media	SD	SEC	RSQ	SECV	1-VR
2.6.4.1	GRASA	4	0.78	5.30	2.804	1.268	0.220	0.970	0.385	0.907
		7	0.78	5.30	2.687	1.25	0.274	0.952	0.462	0.862
		10	0.95	5.30	2.804	1.224	0.277	0.949	0.486	0.842
		12	0.78	5.30	2.871	1.233	0.220	0.968	0.378	0.906
	PC	4	0.30	1.30	0.834	0.308	0.101	0.893	0.178	0.684
		7	0.30	1.20	0.87	0.279	0.061	0.952	0.138	0.794
		10	0.30	1.30	0.853	0.315	0.074	0.945	0.143	0.803
		12	0.27	1.30	0.76	0.341	0.133	0.848	0.223	0.562
	PR	4	0.24	1.05	0.753	0.227	0.131	0.668	0.208	0.274
		7	0.24	1.00	0.708	0.24	0.137	0.674	0.172	0.489
		10	0.24	1.10	0.784	0.217	0.100	0.788	0.144	0.564
		12	0.24	1.00	0.677	0.266	0.153	0.672	0.180	0.561
	HC	4	2.40	8.60	7.515	1.641	0.527	0.897	1.196	0.635
		7	2.40	8.60	6.745	2.203	1.106	0.748	1.292	0.662
		10	2.40	8.60	7.123	2.055	0.734	0.872	0.970	0.778
		12	2.40	8.60	7.339	1.858	0.369	0.960	0.745	0.841
	ENERGÍA	4	21.90	86.00	60.523	19.826	4.454	0.950	7.274	0.865
		7	18.30	86.00	58.547	20.037	3.239	0.974	9.042	0.796
		10	22.20	86.00	62.671	17.935	5.823	0.895	6.502	0.825
		12	21.90	86.00	61.234	18.955	5.540	0.915	7.295	0.851
TS	4	3.96	14.60	10.190	3.888	0.670	0.970	1.754	0.815	
	7	3.96	14.60	11.367	3.444	1.060	0.905	1.897	0.727	
	10	3.96	14.60	11.367	3.444	0.858	0.938	1.422	0.847	
	12	3.96	14.60	11.003	3.649	0.982	0.928	1.719	0.772	

Min: mínimo, Máx: máximo, SD: desviación estándar, SEC: error estándar de calibración, RSQ: coeficiente de determinación de la calibración, SECV: error estándar de validación cruzada, 1-VR: coeficiente de determinación para validación cruzada, PC: proteína cruda (proteína y nitrógeno no proteico), PR: proteína real, HC: hidratos de carbono, TS: sólidos totales.

Por último, los resultados obtenidos para el tratamiento 2.5.5.1 se presentan en la **Tabla 9**. Para los parámetros grasa y TS se han obtenido resultados de 1-VR con valores de entre 0.7 y 0.9. En cuando a los resultados de PC, observamos que el único valor de 1-VR superior a 0.5, 0.517, se obtiene al utilizar el menor número de grupos de validación cruzada, sucede lo contrario con la PR, el único valor de 1-VR superior a 0.5, y que por tanto permite que el modelo discrimine entre valores altos y bajos es el de la prueba con

12 grupos de validación, 0.511. Los valores de 1-VR para el parámetro HC son superiores a 0.7, 0.750 y 0.719 para 4 y 7 grupos de validación e inferiores a 0.7, 0.670 y 0.590 para 10 y 12 grupos. Los valores obtenidos para el parámetro energía en las pruebas con 4, 10 y 12 grupos de validación son de entre 0.7 y 0.8, 0.717, 0.823 y 0.815, sin embargo, en la prueba con 7 grupos de validación se obtiene un valor de 1-VR inferior a 0.7, 0.678.

Para el cuarto tratamiento 2.5.5.1, no se ha encontrado ninguna tendencia debida a los grupos de validación, salvo para el parámetro PR, en el que se observa que, según aumenta el número de grupos, el valor de SEC disminuye, 0.181, 0.168, 0.161, 0.052 y el valor de RSQ aumenta, 0.467, 0.591, 0.631, 0.973.

Tabla 9. Estadísticos de calibración obtenidos tras aplicar un tratamiento de segunda derivada 2.5.5.1.

Tratamiento matemático	Parámetro	grupos validación	Min	Máx	Media	SD	SEC	RSQ	SECV	1-VR
2.5.5.1	GRASA	4	0.78	5.30	2.692	1.221	0.470	0.852	0.534	0.807
		7	0.78	5.30	2.794	1.266	0.140	0.988	0.340	0.928
		10	0.78	5.30	2.762	1.266	0.246	0.962	0.412	0.893
		12	0.78	5.30	2.797	1.260	0.235	0.965	0.430	0.883
	PC	4	0.30	1.30	0.921	0.310	0.120	0.851	0.223	0.517
		7	0.27	1.50	0.824	0.371	0.191	0.734	0.304	0.345
		10	0.27	1.30	0.769	0.331	0.209	0.601	0.261	0.428
		12	0.30	1.30	0.830	0.342	0.173	0.743	0.248	0.490
	PR	4	0.24	1.05	0.735	0.249	0.181	0.467	0.216	0.320
		7	0.24	1.05	0.689	0.263	0.168	0.591	0.202	0.411
		10	0.24	1.00	0.653	0.266	0.161	0.631	0.207	0.407
		12	0.21	1.40	0.705	0.318	0.052	0.973	0.221	0.511
	HC	4	2.40	8.60	7.614	1.571	0.317	0.959	0.773	0.750
		7	2.40	8.60	7.064	2.057	0.853	0.828	1.091	0.719
		10	2.40	8.60	6.599	2.223	0.687	0.904	1.288	0.670
		12	2.40	8.60	6.724	2.196	1.167	0.717	1.415	0.590
	ENERGÍA	4	18.30	86.00	57.506	20.748	6.712	0.895	10.928	0.717
		7	21.90	86.00	58.552	19.944	9.969	0.750	11.403	0.678
		10	21.90	86.00	60.921	19.549	4.931	0.936	8.164	0.823
		12	18.30	86.00	59.438	19.856	4.169	0.956	8.545	0.815

TS	4	3.96	14.60	10.981	3.594	0.556	0.976	1.375	0.854
	7	3.96	14.60	10.495	3.778	0.669	0.969	1.734	0.789
	10	3.96	14.60	11.213	3.497	0.592	0.971	1.381	0.847
	12	3.96	14.60	11.107	3.502	0.428	0.985	1.353	0.851

Min: mínimo, Máx: máximo, SD: desviación estándar, SEC: error estándar de calibración, RSQ: coeficiente de determinación de la calibración, SECV: error estándar de validación cruzada, 1-VR: coeficiente de determinación para validación cruzada, PC: proteína cruda (proteína y nitrógeno no proteico), PR: proteína real, HC: hidratos de carbono, TS: sólidos totales.

Una vez ejecutados y evaluados todos los tratamientos, se puede afirmar que los mejores resultados han sido con el tratamiento 1.10.5.1 para todos los parámetros, no obstante, cabe destacar que, para los parámetros grasa, energía y sólidos totales los cuatro tratamientos han resultado positivos, obteniéndose en cada caso, calibraciones buenas y excelentes. A continuación, se presenta la **Tabla 10** que recoge, a modo de resumen, el mejor tratamiento para cada parámetro. En este caso, se han calculado, además, los valores de RPD y RER que, sirven para confirmar la utilidad de las ecuaciones planteadas.

Tabla 10. Valores de los mejores resultados obtenidos.

	Tratamiento matemático	Grupo de validación	RSQ	SEC	SECV	1-VR	RPD	RER
GRASA	1.10.5.1	7	0.974	0.205	0.321	0.937	4.0	14
PC	1.10.5.1	10	0.923	0.093	0.134	0.850	2.5	7
PR	1.10.5.1	10	0.946	0.067	0.107	0.866	2.7	9
HC	1.10.5.1	10	0.983	0.301	0.695	0.909	3.3	9
ENERGÍA	1.10.5.1	10	0.981	2.999	5.143	0.945	4.2	13
TS	1.10.5.1	7	0.988	0.428	0.943	0.942	4.1	11

SEC: error estándar de calibración, RSQ: coeficiente de determinación de la calibración, SECV: error estándar de validación cruzada, 1-VR: coeficiente de determinación para validación cruzada, RPD: relación entre la DS y el SECV, RER: relación entre el rango de población y el SECV, PC: proteína cruda (proteína y nitrógeno no proteico), PR: proteína real, HC: hidratos de carbono, TS: sólidos totales.

De nuevo atendiendo a los criterios recogidos en el apartado **3.3.3. Modelos estadísticos**, podemos observar que, los valores del estadístico RPD (SD/SECV) son superiores a 3 para los parámetros grasa, HC, energía y TS, para los dos parámetros restantes, PC y PR los valores son 2.5 y 2.7 que, aunque no alcanzan el valor de los anteriores, los autores los consideran aceptables (Williams, 2001). En cuanto al estadístico RER (rango/ SECV), que nos permite saber la calidad de las predicciones de las ecuaciones resultantes, se observa que las ecuaciones planteadas para grasa y energía presentan valores superiores a 12, lo que significa, buenas predicciones, el valor

de RER para TS, 11, indica que la ecuación propuesta permite realizar predicciones cuantitativas y finalmente las ecuaciones para PC, PR y HC permitirían distinguir entre valores altos y bajos (Millmier *et al.*, 2000).

En lo que respecta a los estadísticos de calibración, si bien no se han encontrado trabajos relacionados con la cuantificación de parámetros nutritivos en LMD, De la Roza *et al.*, ha desarrollado calibraciones NIRs con equipos de laboratorio (rango de trabajo 400-2500nm) para grasa, proteína y sólidos totales no grasos, los mejores resultados con valores de 1-VR de 0.961 se obtuvieron para la cuantificación de la grasa, similares a los obtenidos en este trabajo. Sin embargo, para la proteína los valores del coeficiente de determinación de la validación cruzada fueron inferiores a 0.7, mientras que en nuestro trabajo el mejor tratamiento permitió obtener valores superiores a 0.8.

Asimismo, la interpretación de las calibraciones obtenidas pone de manifiesto la representatividad composicional de las muestras de la población de calibración. En la **Figura 15**, se representan las calibraciones para los parámetros grasa y energía. Como se puede apreciar, existe una buena correlación entre los datos de referencia y los predichos, a lo largo de todo el rango de composición de la población de calibración.

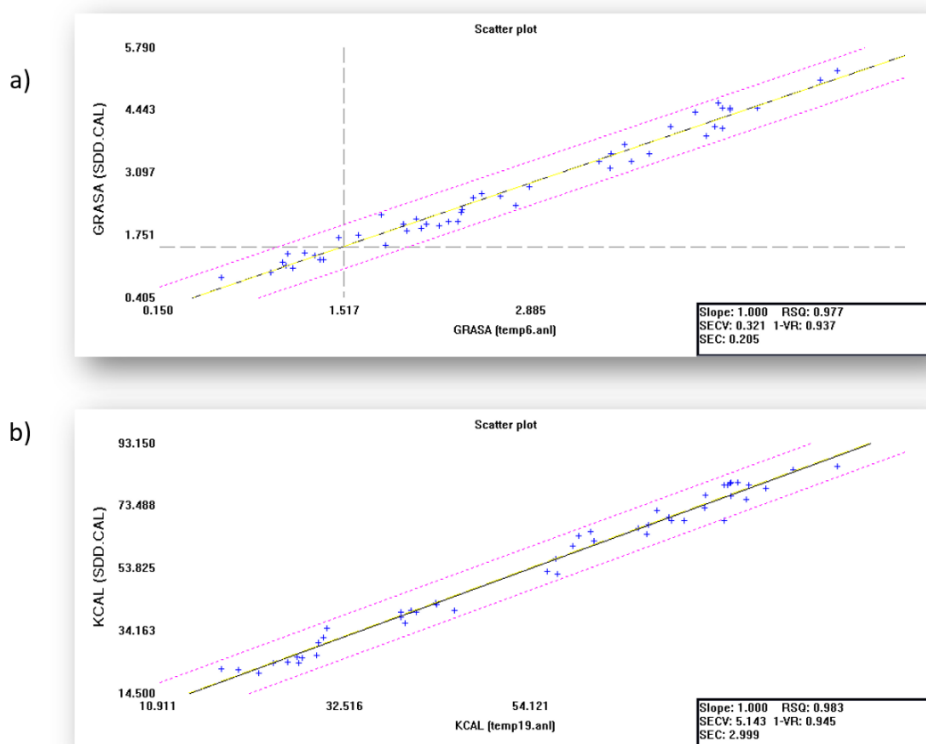


Figura 15. Correlación entre los valores de referencia vs los predichos NIRs para los parámetros a) grasa y b) energía.

Sin embargo, tal y como se muestra en la **Figura 16** en lo que respecta a los parámetros: PC, PR, HC y ST, se puede observar que las muestras se distribuyen en dos poblaciones claras, señaladas por los círculos rojos. Este hecho, explicaría la menor capacidad de predicción de las ecuaciones planteadas, debido a que no existe un número suficiente de muestras que representen la variabilidad composicional en el centro del rango de trabajo. Sin embargo, como se ha evaluado, de acuerdo con los estadísticos obtenidos, sí que se podrían discriminar muestras de alta o baja concentración de cada parámetro.

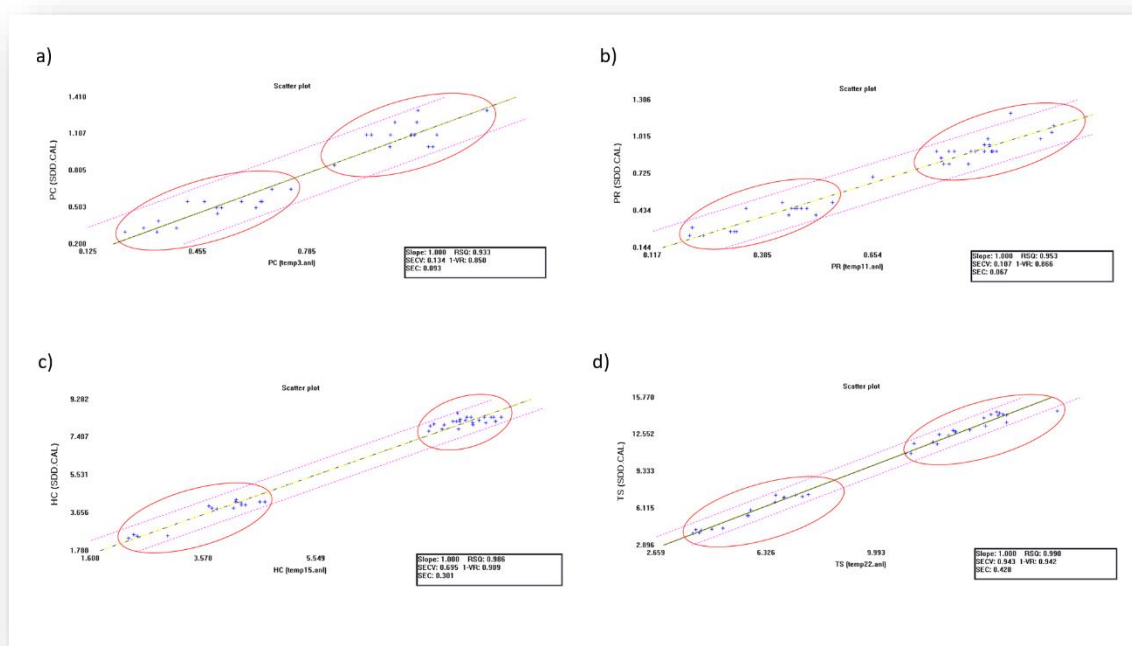


Figura 16. Correlación entre los valores de referencia vs los predichos NIRS para los parámetros a) Proteína cruda (PC), b) proteína real (PR), c) carbohidratos (HC), d) sólidos totales (TS).

A la vista de los resultados, se puede afirmar que el mejor tratamiento para la calibración de muestras de LMD es el 1.10.5.1 para todos los parámetros, en cuanto al número de grupos de validación cruzada, se observa que los mejores resultados para los parámetros grasa y TS es de 7 grupos, y para el resto de los parámetros, PC, PR, HC y energía, el mejor resultado se obtiene con 10 grupos de validación cruzada.

Aplicando las ecuaciones diseñadas se obtendrían buenas predicciones para parámetros de elevado interés para el tratamiento de prematuros, como son la grasa y la energía, además se podrían predecir también los sólidos totales y discriminar entre muestras de alto y bajo contenido en proteínas y carbohidratos.

Todo ello pone de manifiesto la capacidad de la metodología NIRS para llevar a cabo la cuantificación de componentes de LMD en tiempo real, sin realizar ningún pretratamiento. Sería conveniente ampliar el número de muestras para su análisis de

manera que se mejoraran las calibraciones de todos los parámetros, de este modo también se podría realizar una validación externa que apoya los resultados obtenidos en el trabajo.

5. ESTUDIO ECONÓMICO

El equipo utilizado en este trabajo, como se detalla en el apartado 3.2., es el microPHAZIR Mod. 1624 (*Thermo Fisher Scientific Inc.*, Wilmington, MA, USA) y para el análisis de las muestras se empleó una cubeta de cuarzo y aluminio (Foss, Ref. US-ISIH-0398), a continuación, se presentan los gastos asociados a la inversión en el equipamiento científico técnico:

- Precio de adquisición: 32.000 €

- Cubeta de cuarzo: 2.500 €

- Total: 34.500 €

- Total IVA 21% incluido: 41.745 €

Asimismo, para el desarrollo de los modelos iniciales de calibración es necesario analizar un total de unas 100 muestras haciendo uso de métodos de referencia o métodos internos validados, necesarias para el posterior desarrollo y validación del modelo. Por ello el desarrollo del modelo implicaría un gasto:

- 100 muestras de leche * 50€/muestra= 5000€

- Desarrollo del modelo de calibración: 1.000 €:

Se realiza una valoración general del coste de la implementación del equipo estudiado tomando como referencia la actividad del Banco de Leche Materna de Asturias, para ello se asumen las siguientes aproximaciones:

- Volumen de LMD: 300 l/año (1.500 muestras)

- Vida útil del equipo NIRS: 20 años

- Amortización del equipo (coste de adquisición + gastos /vida útil): 2.387 €

- Coste de mantenimiento anual: 1.000 € (análisis de 20 muestras /año para recalibración)

- Coste de personal directamente imputados (5% jornada): 2.356 €

- Salario bruto: 36.000 €/año

- Seguridad social a cargo del empleador (30,9 % salario bruto): 11.124 €/año

- Coste total anual: 2.387 € + 1.000 € + 2.356 € = 5.743 €

Coste unitario: 5.743 €/ 1.500 muestras = 3,83 €/muestra

6. CONCLUSIONES

En este trabajo se ha realizado una primera aproximación a la obtención de un método de análisis para la caracterización de LMD con un equipo NIRS portátil que permite el análisis *in situ* y a tiempo real. Las conclusiones obtenidas de este trabajo son las siguientes:

1. La metodología NIRs desarrollada ha permitido la cuantificación de los parámetros: grasa, proteína cruda, proteína real, carbohidratos, energía y sólidos totales en las muestras de leche materna sin necesidad de llevar a cabo ningún pretratamiento previo de la misma.
2. De los distintos tratamientos estadísticos evaluados para el desarrollo de los modelos de calibración NIRs, ha sido el tratamiento matemático en primera derivada 1.10.5.1. el que ha proporcionado los mejores resultados estadísticos para todos los parámetros evaluados.
3. La representación gráfica de las calibraciones para alguno de los parámetros (proteína cruda y sólidos totales) pone de manifiesto la necesidad de incrementar la variabilidad de las muestras en futuros estudios, ampliando el número de muestras del centro del rango de población, con el fin de mejorar los estadísticos de las calibraciones obtenidas.
4. La evaluación del error de las calibraciones obtenidas se ve limitada por el error del método de referencia utilizado en el análisis de las muestras de leche.
5. Aunque el método se ha desarrollado para leche materna, la metodología propuesta podría aplicarse al análisis *in situ* de cualquier producto lácteo (leche formula, leche de origen animal y derivados).

7. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AEBLH: Asociación Española de Bancos de Leche Humana

b: longitud de paso óptico de la luz

c: concentración

CP: componentes principales

DT: *Detrend*

EMBA: Asociación Europea de Bancos de Leche

FIR: región del infrarrojo lejano

HC: hidratos de carbono

HUCA: Hospital Universitario Central de Asturias

I₀: Intensidad de radiación incidente

I_g: inmunoglobulina

I_r: intensidad radiación reflejada

IR: región del infrarrojo

I_t: intensidad de radiación transmitida

LM: Leche materna

LMD: leche materna donada

MIR: región del infrarrojo medio

MLR: regresión lineal múltiple

MSC: *Multiplicative scatter correction*

NIR: región del infrarrojo cercano

NIRS: espectroscopia del infrarrojo cercano

OMS: Organización Mundial de la Salud

PC: proteína cruda

PCA: regresión por componentes principales

PLS: regresión por mínimos cuadrados parciales

PR: proteína real

R: reflectancia

s: coeficiente de dispersión

SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida

SNC: sistema nervioso central

SNV: *Standard normal variate*

SNVD: *Standard normal variate transformation and detrending*

T: transmitancia

TS: sólidos totales

ufc: unidades formadoras de colonias

VIH: virus de inmunodeficiencia adquirida

ε: coeficiente de extinción molar

λ: longitud de onda

RPD: relación entre la DS y el SECV

RER: relación entre el rango de población y el SECV

SEC: error estándar de calibración

RSQ: coeficiente de determinación de la calibración

SECV: error estándar de validación cruzada

1-VR: coeficiente de determinación para validación cruzada

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abney, W. D. W., & Festing, Lieut. -colonel. (1881). XX, 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 of London*, 172, 887-918. <https://doi.org/10.1098/rstl.1881.0020>
- Aguayo Maldonado, J., Arena Ansótegui, J., Díaz Gómez, N. M., Gómez Papí, A., Martínez Rubio, A., & Molina Morales, V. (2004). *Lactancia materna: Guía para profesionales (Monografías de la AEP Nº 5)*. Madrid: Comité de Lactancia Materna de la Asociación Española de Pediatría.
- Andreas, N. J., Kampmann, B., & Mehring Le-Doare, K. (2015). Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Human Development*, 91(11), 629-635. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.08.013>
- Arslanoglu, S., Bertino, E., Tonetto, P., De Nisi, G., Ambruzzi, A. M., Biasini, A., Profeti, C., Spreghini, M. R., & Moro, G. E. (2010). Guidelines for the establishment and operation of a donor human milk bank. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine: The Official Journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, 23 Suppl 2, 1-20. <https://doi.org/10.3109/14767058.2010.512414>
- Arslanoglu, S., Boquien, C.-Y., King, C., Lamireau, D., Tonetto, P., Barnett, D., Bertino, E., Gaya, A., Gebauer, C., Grovslie, A., Moro, G. E., Weaver, G., Wesolowska, A. M., & Picaud, J.-C. (2019). Fortification of Human Milk for Preterm Infants: Update and Recommendations of the European Milk Bank Association (EMBA) Working Group on Human Milk Fortification. *Frontiers in Pediatrics*, 7. <https://doi.org/10.3389/fped.2019.00076>

- Asociación Española de Bancos de Leche Humana. (2021). *Bancos de Leche en España*. <https://www.aeblh.org/banco-de-leche/bancos-de-leche-en-espana>
- Banco de Leche Materna de Asturias. (2019). *BANCO DE LECHE MATERNA DE ASTURIAS. HOSPITAL UNIVERSITARIO CENTRAL DE ASTURIAS*. https://www.astursalud.es/noticias?p_p_id=es_astursalud_liferay_portlet_AstursaludArticlesPortlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&_es_astursalud_liferay_portlet_AstursaludArticlesPortlet_article_id=694767&_es_astursalud_liferay_portlet_AstursaludArticlesPortlet_mvcRenderCommandName=%2Frender%2Farticle
- Barnes, R. J., Dhanoa, M. S., & Lister, S. J. (1989). Standard normal variate transformation and de-trending of near-infrared diffuse reflectance spectra. *Applied spectroscopy*, *43*(5), 772-777.
- Barnes, R. J., Dhanoa, M. S., & Lister, S. J. (1993). Correction to the Description of Standard Normal Variate (SNV) and De-Trend (DT) Transformations in Practical Spectroscopy with Applications in Food and Beverage Analysis—2nd Edition. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, *1*(3), 185-186. <https://doi.org/10.1255/jnirs.21>
- Ben-Gera, I., & Norris, K. H. (1968). Direct Spectrophotometric Determination of Fat and Moisture in Meat Products. *Journal of Food Science*, *33*(1), 64-67. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1968.tb00885.x>
- Bernardo, H., Cesar, V., & Organization, W. H. (2013). *Long-term effects of breastfeeding: A systematic review*. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/79198>
- Bertrand, D., & Dufour, E. (2000). Infrared spectroscopy and its analytical applications. *Infrared spectroscopy and its analytical applications*.
- Brooks, S. L., Mitchell, A., & Steffenson, N. (2000). Mothers, infants, and DHA: Implications for nursing practice. *MCN: The American Journal of Maternal/Child Nursing*, *25*(2), 71-75.

- Burns, D. A., & Ciurczak, E. W. (2007). *Handbook of near-infrared analysis* (3rd ed.). CRC press.
- Burns, D. A., & Ciurczak, E. W. (2008). *Handbook of Near-Infrared Analysis, Third Edition*. 150.
- Calvo, J., García Lara, N. R., Gormaz, M., Peña, M., Martínez Lorenzo, M. J., Ortiz Murillo, P., Brull Sabaté, J. M., Samaniego, C. M., & Gayà, A. (2018). *Recommendations for the creation and operation of maternal milk banks in Spain | Elsevier Enhanced Reader*. <https://doi.org/10.1016/j.anpede.2018.01.007>
- Chen, A., & Rogan, W. J. (2004). Breastfeeding and the risk of postneonatal death in the United States. *Pediatrics*, *113*(5), e435-e439.
- Coppa, G. V., Gabrielli, O., Pierani, P., Catassi, C., Carlucci, A., & Giorgi, P. L. (1993). Changes in carbohydrate composition in human milk over 4 months of lactation. *Pediatrics*, *91*(3), 637-641.
- Crawford, M. A., Hall, B., Laurance, B. M., & Munhambo, A. (1976). Milk lipids and their variability. *Current Medical Research and Opinion*, *4*(sup1), 33-43. <https://doi.org/10.1185/03007997609109350>
- de la Roza-Delgado, B., Garrido-Varo, A., Soldado, A., Arrojo, A. G., Valdés, M. C., Maroto, F., & Pérez-Marín, D. (2017). Matching portable NIRS instruments for in situ monitoring indicators of milk composition. *Food Control*, *76*, 74-81.
- Donovan, S. M., & Lönnerdal, B. (1989). Isolation of the nonprotein nitrogen fraction from human milk by gel-filtration chromatography and its separation by fast protein liquid chromatography. *The American journal of clinical nutrition*, *50*(1), 53-57.
- Eidelman, A., Schanler, R., Johnston, M., Landers, S., Noble, L., Szucs, K., Viehmann, L., Feldman-Winter, L., Lawrence, R., Kim, S., & Onyema, N. (2012). Breastfeeding and the Use of Human Milk. *Pediatrics*, *129*, E827-E841. <https://doi.org/10.1542/peds.2011-3552>
- Garrido, A., Gómez, A., Guerrero, J. E., & Fernández, V. (1997). NIRS: Una tecnología de apoyo para un servicio integral en alimentación animal. *Avances en nutrición*

- y alimentación animal: XII Curso de Especialización FEDNA, 1996, págs. 273-303, 273-303. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2378394>*
- Gormaz, M., Roqués, V., Dalmau, J., Vento, M., Torres, E., & Vitoria, I. (2011). Actividad de un banco de leche humana implantado en una unidad neonatal. *Acta Pediatr Esp*, 69(6), 283-287.
- Heinig, M. J. (2001). Host defense benefits of breastfeeding for the infant. Effect of breastfeeding duration and exclusivity. *Pediatric Clinics of North America*, 48(1), 105-123, ix. [https://doi.org/10.1016/s0031-3955\(05\)70288-1](https://doi.org/10.1016/s0031-3955(05)70288-1)
- Herschel, W. (1800). XIII. 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 inquiry into the method of viewing the sun advantageously, with telescopes of large apertures and high magnifying powers. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 90, 255-283. <https://doi.org/10.1098/rstl.1800.0014>
- Infrasoft 165 International, Prot Matilda, PA, USA. (s. f.). *ISI: The complete software solution using a single...* - *Google Académico*. Recuperado 8 de junio de 2021, de https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=The%20complete%20software%20solution%20using%20a%20single%20screen%20for%20routine%20analysis%2C%20robust%20calibrations%20and%20networking&author=ISI&publication_year=2000
- Isaksson, T., & Næs, T. (1988). The effect of multiplicative scatter correction (MSC) and linearity improvement in NIR spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, 42(7), 1273-1284.
- Jensen, R. G. (1995). Handbook of milk composition. *Food Science and Technology International Series (USA)*. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US9620789>

- Kaffka, K. J., & Giarmati, L. S. (1995). Quality determination in the food industry. *Leaping ahead with near infrared spectroscopy*. Batten, GD, Flinn, PC, Welsh, LA and Blakeney, AB (eds.). NIR Spectroscopy Group, Royal Australian Chemistry Institute, Melbourne, Australia, 261-269.
- Karl H. Norris. (1964). Simple Spectroradiometer for 0.4 to 1.2-Micron Region. *Transactions of the ASAE*, 7(3), 0240-0242. <https://doi.org/10.13031/2013.40747>
- Kaye, W. (1954). Near-infrared spectroscopy: I. Spectral identification and analytical applications. *Spectrochimica Acta*, 6(4), 257-E2. [https://doi.org/10.1016/0371-1951\(54\)80011-7](https://doi.org/10.1016/0371-1951(54)80011-7)
- Koletzko, B., & Rodriguez-Palmero, M. (1999). Polyunsaturated fatty acids in human milk and their role in early infant development. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 4(3), 269-284.
- Labbok, M. H. (2001). Effects of breastfeeding on the mother. *Pediatric Clinics of North America*, 48(1), 143-158.
- Lawrence, R., & Lawrence, R. (2015). *Breastfeeding: A Guide for the Medical Profession*. 8th Edition. Elsevier Science Inc. <https://www.elsevier.com/books/breastfeeding/lawrence/978-0-323-35776-0>
- Lönnerdal, B. (2003). Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *The American journal of clinical nutrition*, 77(6), 1537S-1543S.
- Lönnerdal, B., Erdmann, P., Thakkar, S. K., Sauser, J., & Destailats, F. (2017). Longitudinal evolution of true protein, amino acids and bioactive proteins in breast milk: A developmental perspective. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 41, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.06.001>
- Mark, H., & Workman, J. (1991). *Statistics in spectroscopy*.
- Martens, H., & Martens, M. (2000). Modified Jack-knife estimation of parameter uncertainty in bilinear modelling by partial least squares regression (PLSR). *Food quality and preference*, 11(1-2), 5-16.

- Martens, H., & Martens, M. (2001). *Multivariate analysis of quality: An introduction*. John Wiley & Sons.
- Martens, H., & Naes, T. (1989). *Multivariate Calibration*; John Willey & Sons. *Inc.: New York*.
- Massart, D. L., Vandeginste, B. G., Buydens, L. M., Lewi, P. J., Smeyers-Verbeke, J., & Jong, S. D. (1998). *Handbook of chemometrics and qualimetrics*. Elsevier Science Inc.
- Millmier, A., Lorimor, J., Hurburgh Jr, C., Fulhage, C., Hattey, J., & Zhang, H. (2000). Near-infrared sensing of manure nutrients. *Transactions of the ASAE*, 43(4), 903.
- Modroño Lozano, M. del S. (2015). *Sensores no destructivos NIRS como herramienta de calidad para la toma de decisiones en explotaciones ganaderas*. Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario [Universidad de Oviedo]. <http://serida.org/publicacionesdetalle.php?id=6805&anyo=>
- Moro, G. E. (2018). History of Milk Banking: From Origin to Present Time. *Breastfeeding Medicine*, 13(S1), S-16-S-17. <https://doi.org/10.1089/bfm.2018.29077.gem>
- Mosca, F., & Gianni, M. L. (2017). Human milk: Composition and health benefits. *La Pediatria Medica E Chirurgica: Medical and Surgical Pediatrics*, 39(2), 155. <https://doi.org/10.4081/pmc.2017.155>
- Murray, I., Pérez-Marín, D., Garrido-Varo, A., Guerrero, J. E., Puigdomènech, A., Dardenne, P., Baeten, V., & Zegers, J. (2004). *Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 11 th International Conference*. NIR Publications Chichester, UK.
- Naes, T., Isaksson, T., Fearn, T., & Davies, T. (2002). A user-friendly guide to multivariate calibration and classification. NIR Publ., Chichester, UK. *A user-friendly guide to multivariate calibration and classification*. NIR Publ., Chichester, UK.
- Osborne, B. G. (2006). Near-infrared spectroscopy in food analysis. *Encyclopedia of analytical chemistry: applications, theory and instrumentation*.

- Osborne, B. G., Fearn, T., & Hindle, P. H. (1993). *Practical NIR spectroscopy with applications in food and beverage analysis*. Longman scientific and technical.
- Otto, M. (1999). *Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc.
- Patton, S., & Huston, G. E. (1986). A method for isolation of milk fat globules. *Lipids*, 21(2), 170-174.
- Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S., & Vyvyan, J. A. (2014). *Introduction to Spectroscopy*. Cengage Learning.
- Peila, C., Moro, G. E., Bertino, E., Cavallarin, L., Giribaldi, M., Giuliani, F., Cresi, F., & Coscia, A. (2016). The effect of holder pasteurization on nutrients and biologically-active components in donor human milk: A review. *Nutrients*, 8(8), 477.
- Picciano, M. F. (2001). Nutrient composition of human milk. *Pediatric Clinics of North America*, 48(1), 53-67.
- Radford, A. (1992). The ecological impact of bottle feeding. *Breastfeeding review*, 2(Suppl 5), 204-208.
- Rinnan, A., Asmund, Van Den Berg, F., & Engelsen, S. B. (2009). Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28(10), 1201-1222.
- Shenk, J. S., & Westerhaus, M. O. (1993). Analysis of agriculture and food products by near infrared reflectance spectroscopy. *Infrasoft International, Port Matilda, PA*, 116.
- Shenk, J. S., & Westerhaus, M. O. (1995). *Routine Operation, Calibration Development and Network System Management Manual for Near Infrared Instruments*. Ver.
- Shenk, J. S., & Westerhaus, M. O. (1996). Calibration the ISI way. *Near infrared spectroscopy: The future waves*, 198-202.
- Siesler, H. W. (2007). Basic principles of near-infrared spectroscopy. En *Handbook of near-infrared analysis* (pp. 25-38). CRC press.

- Stone, M. (1974). Cross-validators choice and assessment of statistical predictions. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 36(2), 111-133.
- Weimer, J. P. (1999). *The economic benefits of breastfeeding: A review and analysis*.
- Williams, P. C. (1987). Variables affecting near-infrared reflectance spectroscopic analysis. *Near-infrared technology in the agricultural and food industries*, 143-167.
- Williams, P. C. (2001). *Near-infrared technology in the agricultural and food industries*. (2nd ed.). PK Williams & K. Norris.
- Williams, P. C., & Norris, K. (2001). Variables affecting near-infrared spectroscopic analysis. *Near-infrared technology in the agricultural and food industries*, 171-189.
- Wold, S. (1972). Spline-funktioner-ett nytt verktyg i dataanalysen. *Kemisk Tidskrift*, 3, 34-37.
- Wold, S., & Sjöström, M. (1998). Chemometrics, present and future success. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 44(1-2), 3-14.
- Wold, S., Sjöström, M., & Eriksson, L. (2001). PLS-regression: A basic tool of chemometrics. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, 58(2), 109-130.
- World Health Organization, Department of Child and Adolescent Health and Development, World Health Organization, & Nutrition for Health and Development. (2003). *Implementing the global strategy for infant and young child feeding Geneva, 3-5 February 2003: Meeting report*. Dept. of Child and Adolescent Health and Development [and] Dept. of Nutrition for Health and Development, World Health Organization. <http://whqlibdoc.who.int/publications/2003/9241562218.pdf>
- ZHANG, Z., HOU, R., LAN, J., WANG, H., KUROKAWA, H., Takatsu, Z., KOBAYASHI, T., KOIE, H., KAMATA, H., KANAYAMA, K., & WATANABE, T. (2016). Analysis of the breast milk of giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*) and the preparation

of substitutes. *Journal of Veterinary Medical Science*, 78.
<https://doi.org/10.1292/jvms.15-0677>

ANEXO I

Tabla A1.1. Información química de las muestras 18-34. Dilución 1:1 con agua destilada.

Nº Muestra	GRASA (g/100ml)	PC (g/100ml)	PR (g/100ml)	HC (g/100ml)	ENERGÍA (Kcal/100ml)	TS (g/100ml)
18	0.95	0.55	0.45	3.85	26.5	5.45
19	2.05	0.5	0.4	4	37	6.6
20	1.3	0.65	0.5	3.9	30.5	5.95
21	0.85	0.55	0.45	3.9	26	5.45
22	2.25	0.55	0.45	4.2	40	7.1
23	1.05	0.75	0.6	4.4	30.5	6.3
24	1	0.75	0.6	4.4	30.5	6.25
25	2.2	0.65	0.5	4.2	40	7.15
26	1.85	0	0.4	4.1	36	0
27	2.65	0.5	0.4	4.05	43	7.3
28	2.25	0.85	0.7	4.05	40.5	7.25
29	2.3	0.55	0.45	4.2	40.5	7.15
30	1.75	0.55	0.45	4	35	6.45
31	1.95	0.5	0.4	4.15	36.5	6.65
32	2.05	0.55	0.45	4.3	38.5	7
33	1.1	1.25	1	4.1	32	0
34	2.55	0.45	0.35	4.2	42.5	0

PC: proteína cruda (proteína y nitrógeno no proteico); PR: proteína real; HC: carbohidratos; TS: sólidos totales.

Tabla A1.2. Información química de las muestras 35-51. Mezclas de dos muestras originales.

Nº Muestra	Mezclas	GRASA (g/100ml)	PC (g/100ml)	PR (g/100ml)	HC (g/100ml)	ENERGÍA (Kcal/100ml)	TS (g/100ml)
35	4+10	3.5	1.05	0.85	7.95	69	12.75
36	16+17	3.65	1.7	1.35	8.3	74.5	0
37	1+6	2	1.3	1.05	8.25	57	11.75
38	1+7	1.95	1.3	1.05	8.25	57	11.7
39	2+17	3.15	1.75	1.4	8.1	69	6.6
40	3+16	2.4	1.9	1.5	8	62.5	5.95
41	4+15	2.9	1.1	0.9	8.2	64.5	12.45
42	1+5	3.2	1.1	0.9	8.05	66.5	12.55
43	6+13	2.8	1.3	1.05	8.4	65.5	12.75

44	7+12	3.3	1.3	1.05	8.6	71	13.4
45	8+11	4.45	1.5	1.2	8.25	80.5	14.4
46	9+10	4.5	0.5	0.8	8.15	79	7.3
47	2+3	3.35	1.15	0.9	7.9	67.5	12.55
48	5+8	4.45	1.2	0.95	8.4	80	14.25
49	9+11	4.1	0.85	1.1	8.15	76.5	7.25
50	12+13	4.05	1.1	0.9	8.2	75.5	13.6
51	3+15	3.35	1.2	0.95	8.2	69	12.95

PC: proteína cruda (proteína y nitrógeno no proteico); PR: proteína real; HC: carbohidratos; TS: sólidos totales.

Tabla A1. 3. Información química de las muestras 52-68. Dilución 3:7 con agua destilada.

Nº Muestra	GRASA (g/100ml)	PC (g/100ml)	PR (g/100ml)	HC (g/100ml)	ENERGÍA (Kcal/100ml)	TS (g/100ml)
52	0.57	0.33	0.27	2.31	15.9	3.27
53	1.23	0.3	0.24	2.4	22.2	3.96
54	0.78	0.39	0.3	2.34	18.3	3.57
55	0.51	0.33	0.27	2.34	15.6	3.27
56	1.35	0.33	0.27	2.52	24	4.26
57	0.63	0.45	0.36	2.64	18.3	3.78
58	0.6	0.45	0.36	2.64	18.3	3.75
59	1.32	0.39	0.3	2.52	24	4.29
60	1.11	0	0.24	2.46	21.6	0
61	1.59	0.3	0.24	2.43	25.8	4.38
62	1.35	0.51	0.42	2.43	24.3	4.35
63	1.38	0.33	0.27	2.52	24.3	4.29
64	1.05	0.33	0.27	2.4	21	3.87
65	1.17	0.3	0.24	2.49	21.9	3.99
66	1.23	0.33	0.27	2.58	23.1	4.2
67	0.66	0.75	0.6	2.46	19.2	0
68	1.53	0.27	0.21	2.52	25.5	0

PC: proteína cruda (proteína y nitrógeno no proteico); PR: proteína real; HC: carbohidratos; TS: sólidos totales.