

**MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS**

**UNIVERSIDAD DE OVIEDO**

*Trabajo Fin de Máster*

TÍTULO:

***Caracterización y tratamiento de la señal espectroscópica NIRS  
obtenida in-situ/on-line, para el desarrollo de modelos  
quimiométricos y su aplicación en la valoración nutritiva del  
ensilado de maíz.***

AUTOR:

**Inés Fonseca Blanco**

FECHA:

**13 Julio 2012, Oviedo**





## Máster en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas

Dra. Dña. Ana Belén Soldado Cabezuelo y Dra. Dña. Begoña de la Roza Delgado del Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA).

### **CERTIFICAN:**

Que Doña Inés Fonseca Blanco ha realizado bajo nuestra dirección el Trabajo Fin de Máster, al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Máster en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas de la Universidad de Oviedo.

Oviedo, 16 de Julio de 2012

Fdo.: Ana B. Soldado Cabezuelo  
Investigadora del Área de Nutrición,  
Pastos y Forrajes

Fdo.: Begoña de la Roza Delgado  
Directora Gerente del SERIDA

VºBº

Mª Teresa Fernández-Fernández Argüelles  
Tutor de la Universidad de Oviedo

## **AGRADECIMIENTOS**

*Este proyecto no se habría podido realizar sin la colaboración de muchas personas que me han brindado ayuda, conocimientos y apoyo. Quiero agradecerles a todos ellos cuanto han hecho, para que este trabajo saliera adelante de la mejor manera posible.*

*En especial a mi directora de proyecto, la Dra. Ana soldado que me ha ayudado, motivado y apoyado en todo momento, corrigiendo minuciosamente este trabajo para mejorarlo. Sus comentarios, direcciones, sugerencias y correcciones han sido fundamentales en su elaboración.*

*Agradecer a Begoña de la Roza-Delgado, que con su calidad humana y científica me acogió en su equipo, poniendo a mi disposición los medios suficientes, para llevar a cabo las actividades propuestas durante el desarrollo de este proyecto.*

*A todos los miembros del departamento de nutrición, pastos y forrajes del SERIDA "Por hacerme tan fácil y agradable esta tarea, en el ámbito profesional y personal, ¡gracias!".*

*A aquellos amigos que han compartido conmigo los "ires y venires" darles las gracias por la fuerza y el cariño brindado día tras día".*

*Y ante todo, a mis padres y hermanos, sin los cuales no podría haber llegado hasta aquí: "Gracias por apoyame y comprendeme".*



## **ÍNDICE**

<b>1. <u>INTRODUCCIÓN PROYECTO</u></b>	<b>pg.1-13</b>
<b>1.1. EL ENSILADO</b>	<b>pg.1-4</b>
1.1.1    Calidad del ensilado	pg.2
1.1.2    Ensilados de maíz	pg.3
<b>1.2. TECNOLOGÍA NIRS</b>	<b>pg.4-13</b>
1.2.1.Bases teóricas de la absorción NIRS	pg.5
1.2.2.Instrumentación	pg.6
1.2.3.Análisis quimiométrico	pg.9
1.2.4.Clonación de instrumentos	pg. 12
<b>2. <u>OBJETIVO</u></b>	<b>pg.14</b>
<b>3. <u>MATERIAL Y MÉTODOS</u></b>	<b>pg.15-21</b>
<b>3.1. INSTRUMENTACIÓN</b>	<b>pg.15-17</b>
<b>3.2. COLECTIVOS MUESTRALES Y ANÁLISIS NIRS</b>	<b>pg.18-20</b>
3.2.1.Tratamientos quimiométricos de la señal espectroscópica	pg18
3.2.2.Eliminación de muestras atípicas	pg.19
3.2.3.Desarrollo de modelos de calibración NIRS	pg20
<b>3.3. ANÁLISIS DE REFERENCIA</b>	<b>pg.20-21</b>
<b>4. <u>RESULTADOS y DISCUSIÓN</u></b>	<b>pg.22-38</b>
<b>4.1. DESARROLLO DE MODELOS QUIMIOMÉTRICOS NIRS</b>	<b>pg.22-29</b>
<b>4.2. TRANSFERENCIA DE LOS MODELOS ESPECTRALES ENTRE EQUIPO AT-LINE Y ON-SITE</b>	<b>pg.29-38</b>
4.2.1.Desarrollo de una matriz de estandarización para la transferencia de modelos	pg.36
<b>5. <u>CONCLUSIONES</u></b>	<b>pg.39</b>
<b>6. <u>BIBLIOGRAFIA</u></b>	<b>pg.40-42</b>
<b>ANEXO I: ESPECTROS MUESTRAS INDIVIDUALES ENTRE 6500 Y CORONA</b>	<b>pg. I.1- I.10</b>
<b>ANEXO II: ESPECTROS MUESTRAS ENTRE 6500 Y CORONA ESTANDARIZADO</b>	<b>pg. II.1- II.10</b>

# **1 INTRODUCCIÓN PROYECTO**

## **1.2 EL ENSILADO**

Cualquier producto de origen vegetal o animal puede ser clasificado como un alimento, siendo los animales capaces de utilizar sus componentes orgánicos e inorgánicos (sin riesgo para su salud). Dentro de los destinados a la alimentación animal, se pueden clasificar en dos grandes grupos: forrajes y concentrados (Maiztegui, 2001).

Forraje es un término de uso común, tanto a nivel ganadero como a nivel técnico y científico, que engloba una amplia variabilidad conceptual según quien lo use. De hecho, no existe una definición ampliamente aceptada y sí una gran variación en la amplitud de alimentos que pueden ser considerados dentro de este término (Wilkins, 2000). Aceptando como buena la definición del *Forage and Grazing Terminology Committee* (1991), **un forraje** es toda parte comestible de una planta, distinta al grano separado, que puede proveer alimento a los animales en pastoreo o que puede ser cosechada para su alimentación. Según la clasificación de Barnes y Baylor (1995), el término forraje incluiría las siguientes clases: hierba, heno, ensilaje, las fracciones comestibles de las especies arbustivas y arbóreas, así como la paja. En la actualidad sería incorrecto, debido a su uso generalizado, excluir del concepto a las mezclas comúnmente empleadas en explotaciones ganaderas intensivas, en las que el forraje interviene en una proporción importante (40-60%).

El **ensilado**, en concreto, es un proceso de conservación de forrajes, u otros alimentos con un contenido en humedad elevado, mediante la acidificación que impide la actividad microbiana y vida vegetal (Argamentaría & De la Roza, 1997). El alimento, prensado en el interior del silo, experimenta una serie de transformaciones bioquímicas que permiten su preservación. Son cambios consecuencia de la acción enzimática de las plantas y de los microorganismos presentes en la superficie foliar, o incorporados en forma de aditivos o contaminantes naturales (Cañeque, 1998).

Su uso está ligado a **beneficios** como son el almacenaje de alimentos perecederos, reserva para épocas de sequía, equilibrio del contenido de nutrientes, aumento de la productividad y conservación de una forma más adecuada el excedente en producción.

Se debe poner atención en cada etapa dentro del proceso, desde la siembra hasta la confección del ensilado (Piñeiro, 2006). Los **factores que afectan al proceso de ensilado** pueden estar relacionados con:

- La naturaleza: el contenido materia seca (Weinberg, 2001), carbohidratos hidrosolubles y la capacidad tampón (Jobin, 2007). Además del grado óptimo de maduración (Cañeque, 1998).
- La realización del ensilado: éste a su vez depende de diferentes componentes como son el tamaño de la partícula (Gallardo, 2003), el pre-marchitamiento y la adición de conservantes (Cañeque, 1998).

El clima, estación, tipo y régimen de aprovechamiento, la intensidad de pastoreo, composición química y botánica, así como el estado de madurez, entre otros, son factores inherentes que determinan su aptitud para ser ensilado o ensilabilidad (Playne, 1966) (Muck, 1991).

Un mal ensilado puede producir **resultados negativos**, tales como pudrición, mermas en rendimiento, baja palatabilidad y baja producción por parte del animal. Algunos factores clave para controlar los efectos negativos en la producción son: la rapidez de llenado del silo, y la adecuada distribución del alimento sobre el mismo, el apisonado (para expulsar la máxima cantidad de aire del ensilado e impedir que el aire exterior penetre en el mismo) y el cerrado.

### **1.2.1 CALIDAD EN ENSILADOS**

La calidad de un ensilado resulta de la interacción entre la calidad del material de origen, su composición química, y del proceso de ensilado, su conservación.

La calidad se puede valorar de **forma sensorial**, manera poco precisa, con factores como son el olor, color o la apariencia. Y de una manera más precisa por la composición química antes de ensilar, que puede indicar una futura calidad nutricional del ensilado (Martinez, 2003).

Se determinan diversos componentes a **nivel nutricional** para efectuar una valoración energética y caracterizar el ensilado. Las determinaciones analíticas para valorar desde el punto de vista nutricional son el pH y el contenido en principios nutritivos (materia seca, cenizas, proteína bruta, fibra neutro detergente y estimación de la digestibilidad de la materia orgánica) (Martinez & De la Roza, Nuevas técnicas para determinar la calidad de los ensilados., 1998). En función de estos parámetros se puede efectuar la **valoración energética y estabilidad del ensilado** (Argamentoría & De la Roza, 1997).

Por su complejidad, el valor nutritivo de los ensilados viene dado ,además de por su contenido en principios nutritivos y la digestibilidad de los mismos, por su **fermentación**. Dependiendo de si esta fermentación ha sido correcta o no, se determina si el ensilado va a ser estable. Los parámetros fermentativos son el nitrógeno amoniacal y nitrógeno soluble total, azúcares residuales, alcoholes, ácido láctico y ácidos grasos volátiles (Martinez & De la Roza, Nuevas técnicas para determinar la calidad de los ensilados., 1998).

A continuación se detallan pormenorizadamente los parámetros a evaluar para llevar a cabo la determinación del valor nutricional y fermentativo de los ensilados (Martinez & De la Roza, Nuevas técnicas para determinar la calidad de los ensilados., 1998) (Maiztegui, 2001):

- **pH:** Da una visión general de la calidad fermentativa y la estabilidad del ensilado.
- **Materia seca (MS):** se trata del porcentaje del ensilado que no es agua. Es un valor importante ya que el resto de componentes, excepto digestibilidad, se expresan sobre materia seca.
- **Materias minerales (MM) o cenizas (CZ):** muestran el contenido mineral y, además, pueden ser un indicador de contaminación con tierra.
- **Proteína Bruta (PB):** es un parámetro importante dentro de la producción animal. Para ensilados de maíz en planta entera, ha de estar el contenido comprendido entre 8-10 % de MS.



- **Fibra neutro detergente (FND):** es la fracción del ensilado correspondiente a las paredes celulares y asociada a la ingestión de materia seca. El porcentaje aumenta con la madurez.
- **Fibra ácido detergente (FAD):** Resulta un residuo formado por celulosa, lignina, cenizas insolubles y proteína ligada a la pared celular, que recibe el nombre de fibra ácido detergente.
- **Almidón:** Se trata del carbohidrato que influye en las fermentaciones y en el contenido energético que posea un ensilado.
- La **digestibilidad** define la proporción del alimento que es consumido y no es excretado en las heces y, por tanto, es digerido por el animal. Al tratarse de una medida imposible de realizar en el ganado, su estimación se realiza en el laboratorio, utilizando enzimas que simulan la digestión que tiene lugar.
- **Nitrógeno soluble y amoniacal:** se utilizan como medida de la degradación de proteínas que tengan lugar en el proceso de ensilado. La presencia de residuos de azúcares solubles, es el indicador de una fermentación láctica correcta.
- **Ácido láctico:** mide el nivel de fermentación, la transformación de carbohidratos a ácido láctico, con su consiguiente reducción de pH y estabilidad en el ensilado.
- **Ácido acético y butírico:** El proceso fermentativo ideal presupone la actuación exclusiva de bacterias lácticas homofermentativas. Es por esto que no se deberían formar, en principio, ácidos grasos volátiles, ni alcoholes.  
Sin embargo, este proceso ideal nunca es posible, y ambos ácidos se forman, inevitablemente, como consecuencia de fermentaciones realizadas por bacterias coliformes y butíricas. Por tanto, el objetivo es que su presencia sea lo más baja posible.

### **1.2.2 ENSILADOS DE MAIZ**

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

El maíz forrajero destaca por las elevadas producciones que alcanza. En condiciones normales de cultivo, se pueden obtener en torno a 15-16 toneladas de materia seca por hectárea en 3,5-4 meses a partir de mediados del mes de mayo (Martínez, 2006). Además, el maíz presenta una buena ensilabilidad, sin prácticamente necesidad de empleo de aditivos, a excepción quizá de los diseñados para incrementar la estabilidad aeróbica. Los ensilados resultantes muestran altos porcentajes de digestibilidad y de contenido energético (Mendez, 2000).

El realizar una elección de las variedades a sembrar ajustada a las condiciones edafoclimáticas de la zona en la que se va a desarrollar el cultivo, es de vital importancia para conseguir optimizar la rentabilidad del mismo, dado que, las diferencias entre ellas, tanto en producción como en principios nutritivos, son importantes (Argamentoría, 2010).

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

En la Tabla 1 se recogen los valores nutricionales habituales en un ensilado de maíz, en porcentaje sobre Materia Seca (Calsamiglia, 2004).

**Tabla 1: Valores nutricionales de la composición química en función de % MS (Calsamiglia, 2004)**

MS	pH	Cenizas	PB	NH4	EE	FB	FND	FAD	Almidón
<20	3.80	6.40	9.37	0.89	4.54	28.21	56.22	32.58	10.50
20-25	3.73	6.26	9.20	0.25	4.35	27.13	52.38	30.29	12.63
25-30	3.76	5.43	8.28	0.21	4.40	23.17	47.63	26.17	24.22
30-35	3.80	4.94	7.62	0.23	4.20	20.98	44.53	23.94	28.23
>35	3.89	4.80	7.58	0.23	3.76	19.71	41.38	22.66	33.30

### 1.3 TECNOLOGÍA NIR

La industria moderna, necesita de métodos analíticos rápidos, robustos y baratos para poder monitorear la calidad de los parámetros de un producto. De manera ideal, los parámetros se miden en tiempo real sin pretratamiento de la muestra y on-site, lo que optimizaría la calidad del producto y minimizaría el impacto ambiental (Smirnov, 2012).

El uso de técnicas analíticas ricas en información como la espectroscopia vibracional, el infrarrojo medio (MIR), infrarrojo cercano (NIR) o la regresión Raman, unidas a herramientas proporcionadas por las matemáticas modernas, hacen posible la creación de métodos precisos, robustos y fiables para la predicción de propiedades en los alimentos (Hollas, 2003).

En concreto, la espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRS) es una técnica que muestra gran potencial para aplicaciones en tiempo real, capaz de recoger la información espectral de una muestra en pocos minutos (Jin, 2007). Se trata de una técnica de análisis espectral multiparamétrica, no invasiva y que no requiere de productos químicos (Kays, 2005).

En los últimos años una gran cantidad de estudios han mostrado el valor de esta tecnología NIRS. Es considerada un potente sensor para el análisis cualitativo y cuantitativo en la producción del biogás (Chitra, 2011), la composición química de diferentes vegetales (Jiang, 2010), controles medioambientales (Reed, 2011), industria farmacéutica (Olsen, 2002) así como el caso que ocupa, la alimentación animal (Cozzolino, 2006).

A lo largo de su trayectoria investigadora, el Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario de Asturias (SERIDA), ha tratado de profundizar en la implementación de la tecnología de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS), para el control de calidad, trazabilidad y seguridad desde el primer eslabón de la cadena alimentaria, que es la alimentación animal (De la Roza & Argamentería, 2009).

### **1.3.1 BASES TEÓRICAS DE LA ABSORCIÓN NIRS**

La región del infrarrojo (IR) se puede definir como la sección del espectro electromagnético comprendida entre los 780 nm, final de la región visible, hasta  $10^6$  nm. Consecuentemente, tiene menor frecuencia que la luz visible y mayor que las microondas. Dentro de esta región, se diferencian tres secciones, dependiendo del intervalo de longitudes de onda: infrarrojo medio (MIR), lejano (FIR) e infrarrojo cercano (NIR) (Burns, 2008).

El fundamento de la tecnología NIRS consiste, básicamente, en la emisión de un haz de luz sobre la muestra orgánica, que en función de su composición o de los enlaces presentes en sus moléculas (en concreto los enlaces -CH, -NH, -OH, y -CO), interaccionará con ellos absorbiendo una determinada cantidad de radiación NIR (Burns, 2008). Es una técnica de espectroscopia vibracional que se fundamenta en la posibilidad que tienen los enlaces químicos de las moléculas de emitir o absorber energía mediante cambios en el movimiento de sus electrones.

Las bandas de absorción NIR se producen cuando la radiación incide sobre la muestra a la misma frecuencia específica que los enlaces moleculares de la muestra analizada (Bertrand, 2000). Los modos de vibración más importantes se suelen englobar en dos grandes grupos: flexión (*stretching*), tanto simétricas como asimétricas, y deformación (*bending*), ya sean en el mismo plano o fuera de él.

La energía que absorbe una molécula incrementa los niveles energéticos de las vibraciones moleculares a través de tres mecanismos diferentes (Osborne, 1993):

- Sobretonos armónicos 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.

En concreto, en el NIR, las bandas de absorción son sobretonos o combinaciones de las bandas vibracionales de tensión fundamentales (Skoog, 2008).

La absorción de energía en la región NIR es cuantificada tanto por reflexión difusa como por transmisión, aunque la reflectancia es la más utilizada con creces. La energía reflejada por la muestra a diferentes longitudes de onda se expresa en unidades de absorbancia (A), definidas estas como  $A = \log(1/R)$ , siendo R los valores de reflectancia (o el cociente entre la radiación reflejada e incidente por la muestra) (Osborne, 1993).

La interpretación de los espectros NIR es muy compleja por sus modos vibracionales, las características físicas del instrumento y de la muestra. De manera que, en la mayor parte de las muestras, es casi imposible obtener un espectro NIR sin que se produzca una dispersión de la radiación incidente, indeseable en esta técnica analítica (Burns, 2008).

Las bandas de los espectros en el infrarrojo cercano son casi siempre anchas, rara vez hay bandas espectrales limpias que faciliten la simple correlación con la concentración del analito. Por tanto, para poder extraer dicha información, se hace necesario el uso de métodos quimiométricos de análisis multivariante (Skoog, 2008).

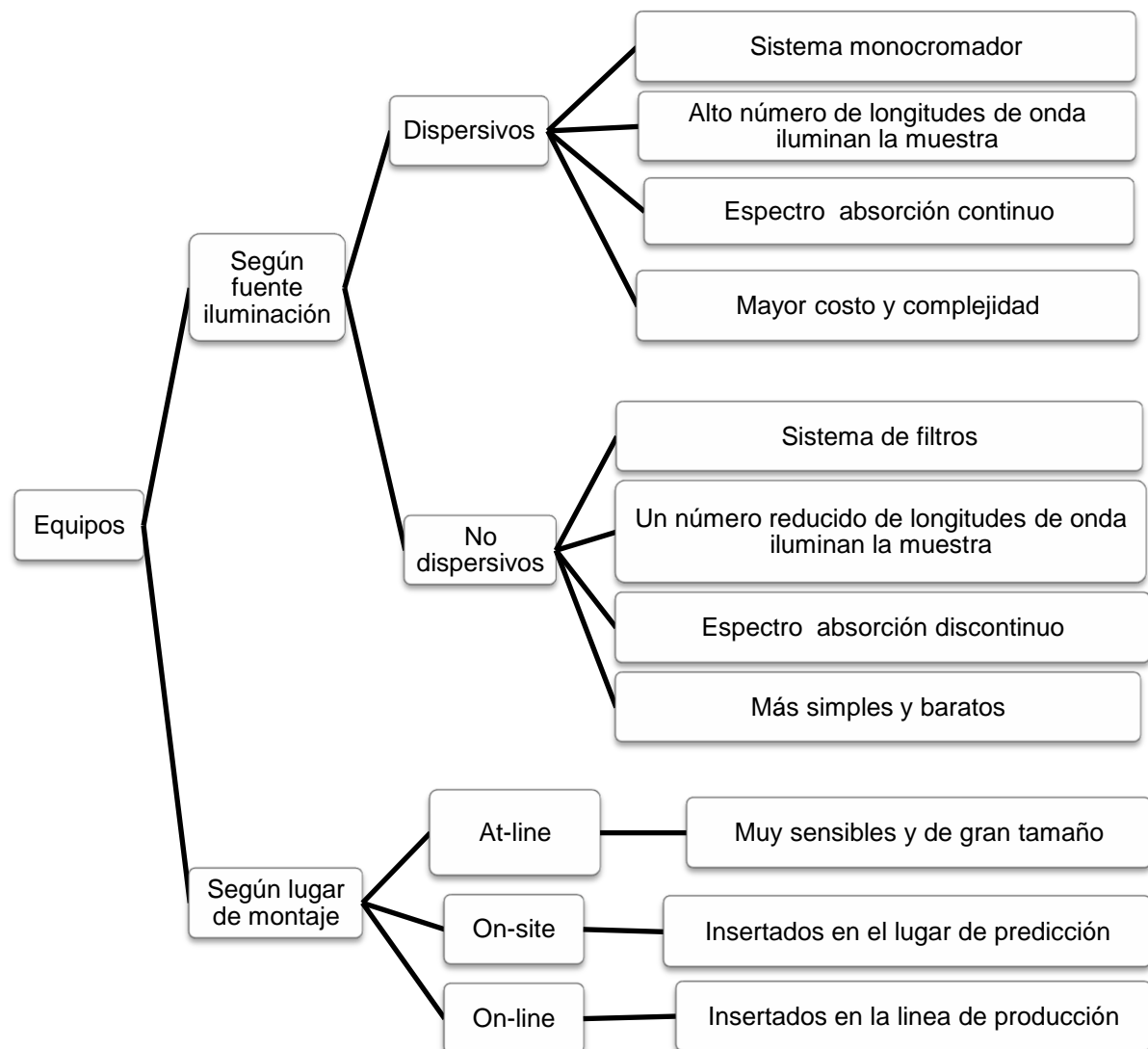
### **1.3.2 INSTRUMENTACIÓN**

Existe una amplia variedad de instrumentos NIRS, cada uno con características particulares que determinan su aptitud para distintas aplicaciones, su facilidad de uso, su grado de exactitud y precisión, y su costo.

En general, los instrumentos NIR constan de los siguientes elementos:

- Lámpara.
- Red de difracción.
- filtros.
- porta-muestras.
- detector.
- fibra óptica.
- sondas para fibra óptica.

En el Esquema representado en la Figura 1 se recogen los diferentes equipamientos NIRS existentes



**Figura 1: Tipos de equipamientos NIRS**

En cuanto a la recogida de la información espectral NIRS se encuentran los siguientes modos de análisis (Fig. 2):

- Por **transmitancia**, la radiación NIRS atraviesa la muestra, interactuando en su camino con las moléculas que la componen y siendo en parte absorbida por ellas. La energía que no es absorbida, sigue su camino y es cuantificada por los detectores ubicados detrás de la muestra (Shenk & Westerhaus, 1995a).
- En **reflectancia**, cuando la muestra es iluminada, la radiación penetra en ella (normalmente no más de 1 mm), interactuando con las partículas y siendo selectivamente absorbida. La energía que no se absorbe es reflejada y puede ser cuantificada por detectores situados frente a la muestra.

- **Transflectancia**, también denominada doble transmitancia. Se usa una cubeta porta muestras o capsula que permite la transmisión de la radiación NIR a lo largo de toda la muestra. Al final de la capsula existe una superficie especular que provoca la reflexión de la radiación, de forma que se transmite de nuevo a lo largo de toda la muestra, incidiendo sobre los detectores (Osborne, 1993).
- **Interactancia-reflectancia**. Esta modalidad supone un cambio frente a las descritas anteriormente ya que no necesita el llenado de cápsulas o cubetas. Se obtienen espectros directamente sobre las muestras, transmitiéndose a continuación la señal al instrumento mediante una sonda de fibra óptica (Osborne, 1993).

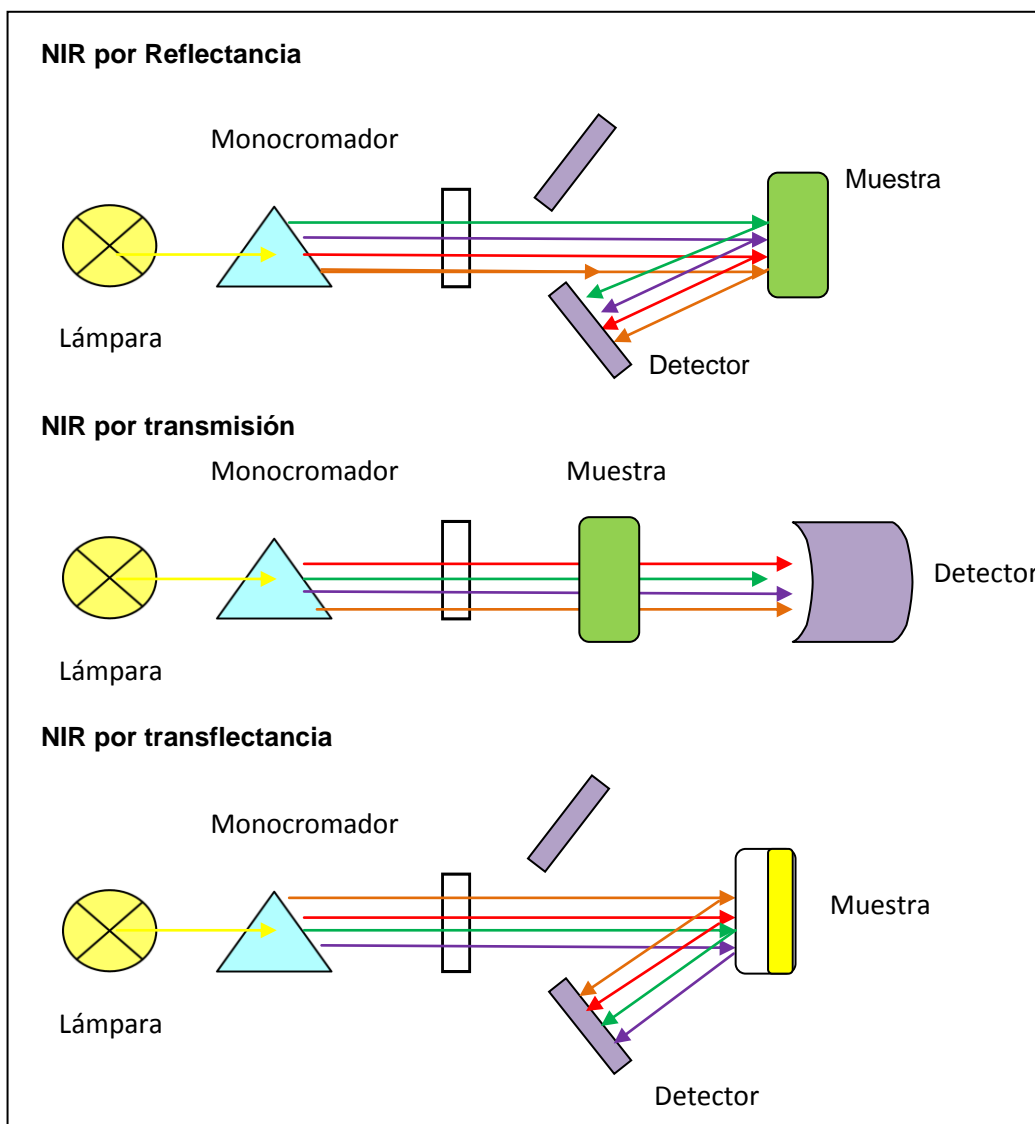


Figura 2: Modos de Análisis NIRS.

### 1.3.3 ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICO

La quimiometría trata, específicamente, todos aquellos procesos que transforman señales analíticas y datos, más o menos complejos, en información. Utiliza métodos de origen matemático, estadístico y otros procedentes del campo de la lógica formal para conseguir sus fines. Por todo ello, la quimiometría se sitúa en un campo interdisciplinar (Miller, 2002).

Como se ha venido comentando, la información espectral NIRS tiene una elevada superposición de las bandas de absorción de los constituyentes presentes en la muestra. Este hecho lleva consigo una gran cantidad de información redundante, lo que provoca una baja selectividad de los datos espectrales NIRS. Por esto, es complicado poder establecer una ecuación, mediante la ley de Lambert-Beer, para estimar una propiedad físico - química de una muestra con el valor de absorbancia a una única longitud de onda. De ahí que las aproximaciones univariante utilizadas para el resto de técnicas espectroscópicas, sean muy poco útiles en la tecnología NIRS (Burns, 2008).

Además de las complicaciones asociadas a la tecnología NIRS también se han de tener en cuenta los errores asociados a cualquier método analítico, como son (Miller, 2002):

- Accidentales.
- Aleatorios: errores inevitables que se producen por **eventos únicos** imposibles de controlar durante el proceso de medición.
- Sistemáticos (sesgo): se producen de igual modo en todas las mediciones que se realizan de una magnitud. Puede estar originado por el instrumento, el operador, etc.

Las fuentes de error en la tecnología NIRS se podrían agrupar en tres (Williams, 1987): instrumento (relación señal/ruido, exactitud, precisión, linealidad, tamaño de cápsula..), relacionadas con la muestra (homogeneidad, densidad, textura,..) y operacionales (preparación muestra, error del analista, estrategias incorrectas..).

Para poder extraer de un espectro NIRS toda la información posible, es necesario el uso de métodos quimiométricos, entre los que destaca el **análisis multivariante**, herramienta fundamental en la obtención de información relevante a partir de los datos espectrales (Otto, 1998). Por tanto, el desarrollo y la evolución de la tecnología NIRS va paralelo con los avances registrados en instrumentación y, particularmente, en el terreno de la quimiometría (Shenk & Westerhaus, 1995a).

Un aspecto que influye de forma importante en la baja selectividad de la información espectral es la dispersión de la radiación incidente, efecto *scatter*, debido principalmente a fenómenos físicos (Fernández-Canabás, 1999). Este hecho provoca numerosas variaciones no deseadas en los datos espectrales NIRS, de manera que para separar las variaciones físicas de las que aporten información química, se desarrollan métodos quimiométricos específicos y **tratamientos de corrección de scatter** (Bertrand, 2000).

Dentro de éstos, los más comunes en los programas de análisis multivariante aplicados a datos espectrales NIRS son: *multiplicative scatter correction* (MSC), *standar normal variate* (SNV) y *detrending* (DTR).

Por otro lado, se utilizan transformaciones matemáticas basadas en el tratamiento de derivadas para disminuir dos problemas de la espectrometría NIR como son la superposición de los picos de absorción y las variaciones en la línea de base de los espectros (Shenk & Westerhaus, 1995a).

En el proceso de desarrollo de un modelo quimiométrico se distinguen las siguientes etapas:

### **1. Selección del colectivo de calibración**

Se han propuesto numerosos métodos de selección de muestras para constituir el colectivo de calibración. La mayoría de dichas herramientas se basan en la realización de un análisis de componentes principales (PCA), seguido del cálculo de distancias entre muestras (espectros) en un espacio n-dimensional, a través generalmente de la distancia de Mahalanobis, que determina la similitud dos variables aleatorias multidimensionales.

### **2. Desarrollo del modelo quimiométrico**

Existen diferentes métodos de regresión (Naes, 2002), siendo los más utilizados en las aplicaciones cuantitativas NIRS la regresión lineal múltiple (MLR), regresión por componentes principales (PCR) y la regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS).

- Mediante **MLR** se lleva a cabo una regresión a partir de un número pequeño de variables espectrales, seleccionadas entre todo el espectro NIRS. Dichas longitudes de onda se seleccionan mediante un test *F* y son aquellas con una mayor correlación entre el valor de absorbancia, a una longitud de onda determinada, y el dato de composición química.
- Tanto mediante **PCR** como por **PLS** se pretenden generar nuevas variables, por combinación lineal de los datos espectrales originales y se emplean estas nuevas variables en el desarrollo de la ecuación de regresión (Martens, 2000). Ambos métodos se diferencian en el tipo de combinación lineal que construyen a partir de los datos originales. Por PCR se emplean los valores de componentes principales, mientras que por PLS la regresión se realiza por mínimos cuadrados parciales (RMPL) construyendo factores PLS.

### **3. Evaluación y selección del modelo**

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

- Coeficiente de determinación de la calibración ( $R^2$ ) o medida de la bondad de ajuste del modelo de regresión utilizado (RSQ). Establece una correlación entre los datos primarios obtenidos y los predichos por las ecuaciones de calibración para un determinado parámetro. Se busca el valor de  $R^2$  más próximo a 1.



- Error estándar de calibración (**ETC** o **SEC**) o error asociado a las diferencias existentes entre las medidas primarias obtenidas por los métodos de referencia y los resultantes del análisis NIRS para los parámetros analíticos determinados en las muestras utilizadas en la calibración. Se requiere que sea el menor posible.
- Coeficiente de determinación de la validación cruzada ( $r^2$ ) o porcentaje de la variación existente en el grupo de validación cruzada que puede ser explicado por el modelo para el parámetro estudiado (**1-VR**). Para este estadístico se tuvieron en cuenta los criterios interpretativos expuestos por (Shenk & Westerhaus, 1996):
  - Un valor de  $r^2 > 0,90$  indica que la calibración es excelente
  - Si  $0,89 > r^2 > 0,70$  la calibración se puede considerar buena
  - Si  $r^2$  toma valores entre 0,69 y 0,50, el modelo obtenido permitiría una adecuada discriminación entre muestras de alto, medio y bajo contenido en el parámetro en cuestión.
- Error típico de validación cruzada (**ETVC**) o error de los residuales para el colectivo de validación cruzada (**SECV**). El procedimiento de validación cruzada utilizado por el software WINISI selecciona el número de factores PLS de acuerdo al valor más bajo de ETVC y, posteriormente, calcula un nuevo modelo con dicho número de términos. El valor de ETVC final se calcula como la raíz cuadrada de la media de los valores de los ETVC de los distintos países de validación cruzada al cuadrado. Se busca el menor error.
- La relación entre la Desviación estándar y el error típico de validación cruzada o de predicción (**RPD**). Este cociente ha de ser menor o igual a 3, aunque un valor de 2,5 es aceptable (Williams, 2003).
- **RER**, se define como la relación entre el intervalo de composición de los datos de referencia para el colectivo de calibración y el error estándar de validación cruzada. Millmier (2000) identifica para este parámetro cuatro niveles de exactitud en la predicción :
  - $< 4$  no es utilizable.
  - Entre 4 y 8 la calibración puede distinguir entre valores altos y bajos.
  - Entre 8 y 12: hay posibilidad de predecir cuantitativamente datos.
  - $> 12$ : indica una buena predicción, pero hay que tener en cuenta que RER es bastante sensible a la presencia de *outliers* de composición.

#### **4. Validación del modelo desarrollado**

Tras haber desarrollado una ecuación de calibración mediante alguno de los métodos de regresión, es esencial determinar la capacidad de predicción de muestras que no hayan intervenido en la calibración. Este proceso se denomina etapa de validación (validación externa). Consiste en la comparación de por estadística del valor verdadero (datos de referencia) y el valor estimado (ecuación de calibración) (Massart, 1997).

### 1.3.4 CLONACIÓN DE INSTRUMENTOS

Un factor importante para la implantación de la tecnología NIRS a nivel industrial es el desarrollo de ecuaciones de calibración globales y robustas, es decir, ecuaciones de calibración obtenidas a partir de un gran número de muestras y que puedan ser empleadas para predecir con precisión y exactitud la mayor parte de las muestras de una población a lo largo del tiempo.

Sería deseable que una vez se obtienen dichas ecuaciones NIRS globales y robustas, estas pudieran ser empleadas en diferentes instrumentos localizados en el mismo laboratorio o en lugares diferentes. Para esto, es necesario que el espectro de una misma muestra obtenido en el instrumento donde fueron generadas las ecuaciones (instrumento Master) sea idéntico al espectro obtenido en aquel instrumento NIR hacia el cual se desean transferir las ecuaciones (instrumento satélite).

Hoy en día, los espectros obtenidos en diferentes instrumentos, aún siendo del mismo fabricante, presentan pequeñas diferencias derivadas de la configuración o de la óptica del instrumento. Esto hace imposible la transferencia directa de ecuaciones entre instrumentos.

Un procedimiento para llevar a cabo la corrección de las diferencias existentes entre espectros de las mismas muestras obtenidos por instrumentos diferentes, es lo denominado **estandarización** o clonación de instrumentos diferentes.

Se han desarrollado numerosas herramientas quimiométricas para poder realizar la estandarización o clonación entre instrumentos NIR, y la posterior transferencia de ecuaciones (Naes, 2002) (Dardenne, 2000). Entre ellos se pueden citar el método *Direct Standardisation* (DS) y *Piecewise direct standardisation* (PDS).

La estandarización mediante el método patentado por Shenk y Westerhaus (1989) realiza una corrección univariante del espectro completo mediante dos etapas independientes. Una primera etapa de corrección de las longitudes de onda y una segunda de corrección de los valores de absorbancias.

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

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

En la etapa de corrección de los valores de absorbancia, se llevan a cabo interpolaciones para calcular las respuestas del espectro medido en el instrumento Satélite a las longitudes de onda sugeridas por el modelo cuadrático obtenido en la etapa anterior.

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

En concreto, Park (1999) ha mostrado la posibilidad de clonar instrumentos y por tanto de transferir ecuaciones de calibración NIRS, para el análisis de ensilado fresco, incluso presentando diferentes superficies de muestra, entre los instrumentos Master y Satélite.

## **2 OBJETIVO**

Enmarcado dentro del proyecto de investigación INIA RTA 2010-00128, se ha planteado el desarrollo de este trabajo fin de máster, tratando de poner en valor el trasvase de conocimientos y tecnologías que implementen valor añadido en las producciones.

Existe una amplia información sobre la instrumentación at-line para cuantificar parámetros tanto de calidad como de seguridad alimentaria. Mientras que es necesaria una mayor profundización en el conocimiento de equipos on-site y on-line, así como en la capacidad de extraer información de los mismos.

Por ello, el objetivo ha sido optimizar el uso de sensores NIRS portátiles de redes de diodos para su utilización in-situ/ in-field en el control de calidad de las producciones forrajeras.

Para alcanzar este objetivo, se llevará a cabo el siguiente plan de trabajo:

- I. Desarrollo de modelos quimiométricos NIRS para la cuantificación de parámetros nutritivos y fermentativos en ensilado de maíz de forma intacta (N=241), utilizando para ello un equipo monocromador at-line FOSS NIR Systems 6500.
- II. Traslado de la biblioteca espectral obtenida al equipo portátil con redes de diodos, Corona 45 VisNIR 1.7.
- III. Validación externa de la transferencia de los modelos quimiométricos desarrollados.

Además de los objetivos científicos expuestos, otro objetivo de este Proyecto Fin de Máster consiste en desarrollar competencias de aprendizaje, tanto generales como específicas, que sean de utilidad a la hora de enfrentarse a un determinado problema en el ámbito laboral.

### 3 MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 INSTRUMENTACIÓN

En el desarrollo de este proyecto se han utilizado diferentes equipos NIRS disponibles en el laboratorio de Nutrición, Pastos y Forrajes del SERIDA, cuyos sistemas ópticos y de muestreo son diferentes.

Los espectros en el equipo de laboratorio fueron recogidos bajo unas condiciones de temperatura y humedad controladas (40% humedad y  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ , respectivamente)

##### **1-Equipo monocromador FOSS NIRSystems 6500 SY-II (Silver Spring, MD, USA)(Master)**

Este sistema está equipado con un módulo de transporte que realiza medidas de reflectancia en la región espectral comprendida entre 400 y 2500 nm, cada 2 nm. Los valores de absorbancia se recogen como  $\log(1/R)$ , siendo R la reflectancia de la muestra.

Se emplea una cápsula rectangular porta muestras, llamada "natural", que presenta una ventana de cuarzo de 4,7cm por 20 cm, que permite una superficie de irradiación de la muestra de  $94\text{ cm}^2$  (Fig. 3)



**Figura 3: Cápsula natural del equipo Master**

Las muestras se analizan por duplicado, preparando dos cápsulas de cada muestra y en cada capsula se recogen dos espectros, cada uno de los cuales es el resultado del promedio de 32 espectros.

En la Figura 4 se muestra el equipamiento y el modo de presentación.



**Figura 4: Equipo NIRSystems 6500 SY-II (Master)**

La información espectral se almacena y procesa con el software WinISI II v. 1.5 (Infrasoft International, Port Matilda, PA, USA, 2000). Con este mismo software se lleva a cabo el análisis quimiométrico.

#### **2-Corona 45 VisNIR 1.7 de red de diodos Ingaes (Carl Zeiss)(Satélite)**

Equipado con un ordenador portátil accesorio para conexión con el espectrofotómetro. Incluye un soporte para cargar muestras sólidas, circular. Realiza medidas en reflexión difusa en el rango del espectro de 400 a 1680 nm (cada 3 nm aproximadamente, no es un parámetro constante)

Con el corona para cada muestra se realizan 20 submuestréos. Es decir, se hacen 20 barridos espectrales para cada muestra, y posteriormente se promedian, obteniéndose un espectro lo más representativo posible, de la muestra analizada. Los datos espectrales se procesan con el software de adquisición de datos Cora.



**Figura 5: Cápsula equipo Corona, modo de carga.**

En la Figura 6 se muestra el equipamiento y modo de presentación del equipo y en la Figura 7 se representa su uso on-line sobre el ensilado de maíz.



Figura 6: Equipo Corona



Figura 7: Equipo Corona (satélite) on-line

### **3.2 COLECTIVOS MUESTRALES Y ANÁLISIS NIRS**

Se utiliza como colectivo de calibración 241 muestras de ensilado de maíz, recogidos en diferentes ganaderías de toda la comunidad asturiana durante los años 2010, 2011 y 2012.

Como colectivo de validación y estandarización se utilizan 10 muestras de ensilado de maíz recogidas en ganaderías de la Cornisa Cantábrica durante el año 2012.

La información espectral de todas las muestras del colectivo de calibración se ha recogido con el equipo FOSS- NIRSystem 6500, en modo transport y con presentación intacta.

Mientras que las muestras del colectivo de estandarización y validación han sido analizadas por ambos equipamientos NIRS, Máster (at-line) y Satélite (on-site).

Las condiciones experimentales utilizadas por ambos equipos, son las detalladas en el apartado 3.1. Basándonos en las diferencias del modo de análisis, tanto en lo referente al tamaño de la cápsula como en el modo de transport (Master) vs estático (Satélite), para el equipo Satélite se han analizado 20 submuestras, por cada muestra.

Para la medida de los parámetros nutritivos mediante NIRS, las muestras **no** son sometidas a ningún pre-tratamiento, se analizan en su modo intacto.

Antes de hacer el llenado de la cápsula (la carga), y el análisis de las muestras por NIRS, es necesario hacer una buena homogenización manual, para que el espectro recogido sea representativo del total de la muestra. Tras homogenizar la muestra, se carga la capsula. Esta etapa es muy importante, hay que repartir la muestra de forma homogénea por toda la capsula, para que pueda ser recogida la información espectral de forma correcta, y evitar huecos, que originen errores de lectura.

#### **3.2.1 TRATAMIENTOS QUIMIOMÉTRICOS DE LA SEÑAL ESPECTROSCÓPICA**

Se han ensayado diferentes pre-tratamientos matemáticos sobre los espectros para elegir la transformación más adecuada de los datos. Estos pre-tratamientos fueron los siguientes:

- DETREND, se utiliza para eliminar la curvatura lineal o cuadrática de la línea base del espectro debido a las diferentes presiones de empaquetamiento.
- SNV, *Standar Normal Variate*, cuya finalidad es reducir el efecto del tamaño de la partícula y la dispersión de la luz.
- SNVD, *Standard Normal Variate and Detrend*, que es una combinación de las anteriores, que corrige la línea base y elimina las diferencias entre los espectros correspondientes a muestras de similar composición química (**Barnes., 1989**).



Para desarrollar los modelos de regresión se evaluaron diferentes estrategias matemáticas, en primera y segunda derivada:

- 2,6,4,1.
- 1,4,4,1.
- 2,4,4,1.
- 1,5,5,1.
- 2,5,5,1.

Cada tratamiento matemático se expresa por cuatro números entre comas (a,b,c,d), siendo el primer dígito (a) el orden de la derivada, el segundo (b) el segmento y el tercer y cuarto dígito (c,d), el suavizado de la señal (Shenk & Westerhaus, 1995b) (ISI, 2000).

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

### **3.2.2 ELIMINACIÓN MUESTRAS ATÍPICAS**

Una vez obtenidos los datos, espectrales y químicos, de las muestras del colectivo de calibración, y de acuerdo con el protocolo para el desarrollo de ecuaciones de calibración NIRS descrito por Shenk y Westerhaus (1995a) (1995b) (1996), se procedió a la evaluación de anomalos espectrales mediante el cálculo del estadístico H de cada muestra al centro de la población.

La detección de las muestras atípicas dentro del conjunto de las muestras de referencia o calibración se realizó mediante el algoritmo CENTER, que permite calcular la distancia H estandarizada, una variante de la distancia de Mahalanobis, que estima un nuevo espacio vectorial, a partir de un análisis de componentes principales de los datos espectrales. Cada uno de los espectros vendrá definido por un punto con sus coordenadas (scores) sobre cada uno de los ejes definidos por las componentes principales consideradas.

La finalidad de esta etapa es reducir la dimensionalidad de una población para evaluar la presencia de muestras anómalas espectrales en dicho conjunto. mediante el cálculo de la distancia H de cada muestra al centro de la población.

Se consideran muestras atípicas la que poseen un  $H > 3$ . El espectro correspondiente a cada muestra se ordena de menos a mayor distancia H estandarizada respecto al espectro medio de la población.

### **3.2.3 DESARROLLO MODELOS CALIBRACIÓN NIRS**

Las ecuaciones de calibración se desarrollaron mediante regresión de mínimos cuadrados parciales modificada (MPLS). Estableciendo las siguientes condiciones para el desarrollo de los modelos:

- Rango espectral:
  - Foss NIRSystem 6500: 400-2500 nm.
  - Corona 45 VisNIR 1.7: 400-1710 nm.
- Utilización de validación cruzada para la validación de los modelos durante el desarrollo del mismo, subdividiendo la población de calibración en 4 grupos de validación cruzada aleatorio.
- Máximo número de términos del modelo: 15.

Se hace el análisis de componentes principales para cada modelo, para seleccionar las muestras que se utilizarán en el desarrollo del modelo de calibración, eliminándose las muestras anómalas en cada caso. Para cada ecuación, y parámetro nutritivo, se obtienen los siguientes estadísticos: error estándar de calibración (ETC), coeficiente de determinación de la calibración ( $R^2$ ), error estándar de validación cruzada (ETVC), coeficiente de determinación de validación cruzada ( $r^2$ ), estadísticos de calidad de la ecuación RER (rango/ETVC) y RPD (SD/ETVC).

La evaluación de las mejores ecuaciones se realiza en base al menor error (el más próximo a 1), y al mayor coeficiente de determinación de validación cruzada. Teniendo en cuenta siempre que no se produzca sobrecruzamiento.

En el apartado 1.2.3 de esta memoria se han detallado pormenorizadamente los criterios estadísticos.

### **3.3 ANÁLISIS DE REFERENCIA**

En los ensilados se determina, de forma inmediata tras su recepción el pH y, posteriormente, todas las muestras son llevadas al cuarto de preparación de muestras, donde son homogenizadas, por cuarteo, antes de iniciar el proceso de preparación de las muestras para el análisis vía húmeda (de referencia).

Una vez procesadas, las muestras son analizadas siguiendo métodos oficiales o validados para los siguientes parámetros:

- **pH:** La medida consiste en poner en contacto una sonda de un pH-metro (electrodo de penetración) con el ensilado.
- **Materia seca (MS):** La determinación del contenido en MS de una muestra consiste en provocar la evaporación del agua, con lo que se puede conocer el contenido en MS por gravimetría. Consiste en someter muestras a un secado en estufa a  $103 \pm 1^\circ\text{C}$ , durante cuatro horas.

- **Materias minerales (MM) o cenizas (CZ):** La determinación consiste en la oxidación de toda la materia orgánica contenida en la muestra, al someterla a una combustión en horno, a 550 °C hasta peso constante.
- **Proteína Bruta (PB):** La cuantificación del nitrógeno total/proteína bruta, con excepción de nitratos, nitritos y cianuros, se realiza mediante digestión en medio ácido y posterior volumetría - método Kjeldahl-, utilizando para tal fin un sistema de digestión y un destilador-valorador automático.  
Una vez conocido el contenido en nitrógeno de la muestra, se aplica el factor de conversión 6,25, que nos aproxima al conocimiento del contenido en PB.
- **Fibra neutro detergente (FND):** Para su determinación, se emplea una solución detergente **neutra** con Lauril sulfato sódico que disuelve las pectinas de la pared y los solubles celulares, resultando un residuo que representa el contenido en paredes celulares.
- **Fibra detergente ácido (FAD):** Para disolver los solubles celulares, la hemicelulosa y los minerales solubles, se utiliza una solución ácido detergente, de bromuro de etil-trimetilamonio.
- **La digestibilidad.** Su determinación se realiza a partir del residuo de FND, tras la adición del enzima celulasa e incubación a 40 °C durante 24h en el jugo obtenido tras el prensado del ensilado.
- **Nitrógeno soluble y amoniacal:** Se determina también mediante método Kjeldahl.
- **Ácido láctico, acético y butírico:** los ácidos grasos volátiles y el láctico se obtienen a partir del jugo de ensilado mediante HPLC utilizando una columna de intercambio iónico RSpak KC-811 con fase móvil de H<sub>3</sub> PO<sub>4</sub> al 0,025 %, en modo isocrático.
- **Almidón:** Se cuantifica indirectamente, previa hidrólisis a glucosa y posterior determinación de la misma, mediante un sensor enzimático –electroquímico.

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 4.1 DESARROLLO DE LOS MODELOS QUIMIOMÉTRICOS NIRS

En el presente trabajo se ha planteado una estrategia cuantitativa para la predicción de parámetros nutritivos y fermentativos en ensilados de maíz, en su forma intacta para la implantación de controles de calidad a pie de campo.

Para ello se toma como punto de partida la población de calibración (N=241) En la cual se han recogido los espectros NIRS en el equipo Master (Fos NIRSystem 6500). Y se han determinado los parámetros nutricionales: pH, materia seca (MS), cenizas (CZF), Proteína Bruta (PB), fibra neutro detergente (FND), fibra ácido detergente (FADLCF), digestibilidad (DEMO); y fermentativos: Amoniaco (NH<sub>3</sub>), ácido láctico(LACT), acético (ACET) y almidón (ALM).

A partir de datos de referencia (laboratorio) y espectroscópicos (NIRS) de las muestras, se han desarrollado modelos quimiométricos para cada uno de los parámetros anteriormente descritos, siguiendo la metodología descrita en el apartado de material y métodos.

Los resultados estadísticos obtenidos para cada uno de los modelos obtenidos con los diferentes tratamientos matemáticos se detallan en las tablas 2 a 6.

**Tabla 2: Estadísticos de calibración NIRS para la predicción de parámetros nutritivos y fermentativos en equipo Master (rango 400-2500nm) con tratamiento en 1ª derivada (1,4,4,1).**

	SNVD 1,4,4,1					
	SEC	RSQ	SECV	1-VR	RER	RPD
<b>pH</b>	0.110	0.538	0.126	0.396	7.734	1.289
<b>CZF (%)</b>	0.110	0.700	0.135	0.550	8.888	1.481
<b>PBF (%)</b>	0.094	0.902	0.116	0.851	15.465	2.577
<b>FNDF (%)</b>	1.158	0.897	1.484	0.830	14.557	2.428
<b>DEMO (%)</b>	1.710	0.674	1.891	0.603	9.509	1.585
<b>FADLCF (%)</b>	0.300	0.841	0.351	0.783	12.844	2.141
<b>NH<sub>3</sub> (mg/dl)</b>	3.081	0.907	4.108	0.835	14.740	2.457
<b>LACT (mg/dl)</b>	181.22	0.925	224.83	0.885	17.716	2.953
<b>ACET (mg/dl)</b>	98.83	0.93	132.15	0.877	14.717	2.851
<b>ALMF (%)</b>	0.731	0.893	0.858	0.853	15.610	2.602
<b>MS (%)</b>	0.708	0.957	0.844	0.941	24.411	4.069

**SEC:** Error de calibración; **RSQ:** coeficiente de determinación de calibración; **SECV:** error de validación cruzada; **1-VR:** Coeficiente de validación cruzada; **RER:** rango/SECV ; **RPD:** SD/SECV.

**Tabla 3: Estadísticos de calibración NIRS para la predicción de parámetros nutritivos y fermentativos en equipo Master (rango 400-2500nm) con tratamiento en 1ª derivada (1,5,5,1).**

	SNVD 1,5,5,1					
	SEC	RSQ	SECV	1-VR	RER	RPD
<b>pH</b>	0.116	0.461	0.127	0.354	7.463	1.244
<b>CZF (%)</b>	0.113	0.682	0.126	0.603	9.517	1.587
<b>PBF (%)</b>	0.090	0.899	0.114	0.838	14.919	2.487
<b>FNDF (%)</b>	1.354	0.861	1.494	0.833	14.522	2.431
<b>DEMO (%)</b>	1.818	0.637	1.895	0.604	9.557	1.593
<b>FADLCF (%)</b>	0.262	0.871	0.321	0.804	13.598	2.266
<b>NH3 (mg/dl)</b>	2.993	0.918	3.938	0.858	15.957	2.659
<b>LACT (mg/dl)</b>	186.167	0.921	224.839	0.885	17.723	2.954
<b>ACET (mg/dl)</b>	105.787	0.922	132.606	0.876	14.725	2.849
<b>ALMF (%)</b>	0.774	0.880	0.954	0.818	14.065	2.344
<b>MS (%)</b>	0.685	0.961	0.850	0.939	24.334	4.056

**SEC:** Error de calibración; **RSQ:** coeficiente de determinación de calibración; **SECV:** error de validación cruzada; **1-VR:** Coeficiente de validación cruzada; **RER:** rango/SECV ; **RPD:** SD/SECV.

**Tabla 4: Estadísticos de calibración NIRS para la predicción de parámetros nutritivos y fermentativos en equipo Master (rango 400-2500nm) con tratamiento en 2ª derivada (2,4,4,1).**

	SNVD 2,4,4,1					
	SEC	RSQ	SECV	1-VR	RER	RPD
<b>pH</b>	0.089	0.672	0.110	0.506	8.520	1.420
<b>CZF (%)</b>	0.109	0.729	0.140	0.555	8.972	1.495
<b>PBF (%)</b>	0.098	0.871	0.132	0.768	12.438	2.073
<b>FNDF (%)</b>	0.816	0.950	1.283	0.877	16.980	2.845
<b>DEMO (%)</b>	1.648	0.669	1.844	0.592	9.312	1.552
<b>FADLCF (%)</b>	0.321	0.820	0.364	0.770	12.480	2.080
<b>NH3 (mg/dl)</b>	3.241	0.898	4.485	0.808	13.576	2.263
<b>LACT (mg/dl)</b>	172.677	0.935	226.226	0.892	17.921	2.987
<b>ACET (mg/dl)</b>	80.520	0.952	117.280	0.899	16.289	3.136
<b>ALMF (%)</b>	0.730	0.893	0.881	0.846	15.207	2.535
<b>MS (%)</b>	0.625	0.967	0.784	0.948	26.260	4.377

**SEC:** Error de calibración; **RSQ:** coeficiente de determinación de calibración; **SECV:** error de validación cruzada; **1-VR:** Coeficiente de validación cruzada; **RER:** rango/SECV ; **RPD:** SD/SECV.

**Tabla 5: Estadísticos de calibración NIRS para la predicción de parámetros nutritivos y fermentativos en equipo Master (rango 400-2500nm) con tratamiento en 2ª derivada (2,5,5,1).**

	SNVD 2,5,5,1					
	SEC	RSQ	SECV	1-VR	RER	RPD
<b>pH</b>	0.104	0.566	0.119	0.436	7.976	1.329
<b>CZF (%)</b>	0.101	0.755	0.141	0.523	8.697	1.450
<b>PBF (%)</b>	0.103	0.871	0.128	0.801	13.381	2.230
<b>FNDF (%)</b>	0.798	0.953	1.229	0.888	17.860	2.988
<b>DEMO (%)</b>	1.586	0.718	1.744	0.666	10.281	1.713
<b>FADLCF (%)</b>	0.249	0.892	0.324	0.816	13.988	2.331
<b>NH3 (mg/dl)</b>	2.74	0.932	4.178	0.843	15.112	2.519
<b>LACT (mg/dl)</b>	184.017	0.925	240.790	0.877	16.788	2.798
<b>ACET (mg/dl)</b>	91.157	0.942	127.380	0.888	15.335	2.980
<b>ALMF (%)</b>	0.803	0.871	0.903	0.840	14.847	2.474
<b>MS (%)</b>	0.671	0.961	0.772	0.949	26.558	4.426

**SEC:** Error de calibración; **RSQ:** coeficiente de determinación de calibración; **SECV:** error de validación cruzada; **1-VR:** Coeficiente de validación cruzada; **RER:** rango/SECV ; **RPD:** SD/SECV.

**Tabla 6: Estadísticos de calibración NIRS para la predicción de parámetros nutritivos y fermentativos en equipo Master (rango 400-2500nm) con tratamiento en 2ª derivada (2,6,4,1).**

	SNVD 2,6,4,1					
	SEC	RSQ	SECV	1-VR	RER	RPD
<b>pH</b>	0.107	0.544	0.123	0.411	7.725	1.288
<b>CZF (%)</b>	0.113	0.691	0.136	0.549	8.940	1.490
<b>PBF (%)</b>	0.077	0.920	0.120	0.806	13.657	2.276
<b>FNDF (%)</b>	0.874	0.943	1.271	0.879	17.131	2.871
<b>DEMO (%)</b>	1.507	0.717	1.665	0.654	10.206	1.701
<b>FADLCF (%)</b>	0.327	0.786	0.375	0.716	11.278	1.880
<b>NH3 (mg/dl)</b>	2.869	0.911	4.415	0.789	13.035	2.173
<b>LACT (mg/dl)</b>	195.615	0.913	238.389	0.870	16.668	2.778
<b>ACET (mg/dl)</b>	87.400	0.949	143.636	0.865	13.802	2.691
<b>ALMF (%)</b>	0.801	0.858	0.894	0.823	14.284	2.381
<b>MS (%)</b>	0.719	0.957	0.820	0.944	25.256	4.209

**SEC:** Error de calibración; **RSQ:** coeficiente de determinación de calibración; **SECV:** error de validación cruzada; **1-VR:** Coeficiente de validación cruzada; **RER:** rango/SECV ; **RPD:** SD/SECV.

A la vista de los resultados obtenidos, y detallados en las tablas 2 a 6, se puede afirmar que los mejores estadísticos se obtuvieron con el tratamiento en segunda derivada y corrección de Scatter mediante SNVD.

Por ello, se selecciona el tratamiento **SNVD 2,5,5,1** (tabla 5) como el modelo quimiométrico con mejores parámetros analíticos estadísticos de calibración y predicción. Los valores del coeficiente de determinación para los parámetros analíticos, tanto para el colectivo de calibración ( $R^2$ ) como para el de validación cruzada ( $r^2$ ), fueron excelentes para: MS, ACET, LACT FNDF; buenos para CZF, PBF, DEMO, FADLCF, NH<sub>3</sub> y ALM; y aceptables para pH (Shenk & Westerhaus, 1996).

Analizando de una forma más detallada los componentes nutricionales, estas ecuaciones son claramente menos efectivas para pH, Cenizas (CZF) y digestibilidad (DEMO). Ninguno de estos parámetros llega a superar el 0,8 en el coeficiente de la validación cruzada y tampoco llegan a contener valores aceptables de RPD (>2.5), o aproximados, para su uso como predictores de muestras desconocidas.

Por el contrario, en el resto de constituyentes el coeficiente de determinación de validación cruzada supera los valores de 0,7 y alcanzan lo recomendado por William y Sobering (1993), es decir, valores superiores a 2,5 en su RPD.

Una vez evaluada la viabilidad del modelo desarrollado haciendo uso de la población espectral recogida en el equipo Master (at-line), el siguiente paso es el traslado de la biblioteca espectral al equipo satélite, para poder evaluar in situ los parámetros nutritivos y fermentativos.

En la tabla 7 se muestran las características de ambos equipos.

**Tabla 7: Instrumentación NIRS utilizada en los estudios.**

<b>Equipo</b>	<b>Master</b>	<b>Satélite</b>
<b>Condiciones equipo</b>	Pre-dispersivo Rango 400-2500 nm Detector sí en VIS PBs en NIR	Post-dispersivo Rango 400-1710 Detector sí en VIS InGaAs en NIR
<b>Cápsula</b>	Rectangular	Circular, en laboratorio Sin cápsula , en campo

El equipo de campo (satélite) trabaja en un rango de longitudes de onda entre 400 y 1710 nm. Por ello, para poder realizar la transferencia de la biblioteca espectral, lo primero es acortar los espectros obtenidos en el Master (400 y 2500nm), para hacer que se solapen con el rango del Satélite (400-1710 nm).

Con la nueva biblioteca espectral obtenida en el rango de longitudes de onda de solapamiento, entre 400 y 1710 nm, se desarrollan nuevos modelos quimiométricos, con el pretratamiento de la señal espectral, SNVD. Con los tratamientos en primera y segunda derivada: 1,4,4,1; 1,5,5,1; 2,4,4,1; 2,5,5,1; 2,6,4,1.

En las tablas 8 a 12 se muestran los resultados obtenidos con este nuevo rango de longitudes de onda.

De los modelos desarrollados, y atendiendo a los parámetros estadísticos de calibración y predicción, la ecuación seleccionada es la del tratamiento en segunda derivada (**SNVD 2,5,5,1**).

Además, los valores del coeficiente de determinación para los constituyentes fueron superiores a 0,8, tanto para el colectivo de calibración ( $R^2$ ) como para el de validación cruzada ( $r^2$ ), a excepción de los parámetros pH, Cenizas(CZF) y digestibilidad (DEMO), que son de nuevo claramente más bajos.

Estas excepciones son debidas en el caso del pH a la poca variabilidad. Para las Cenizas se debe a que es una medida indirecta, cenizas representan la parte mineral de la muestra y no absorbe en el rango NIR. Y lo referente a DEMO, en el análisis de referencia lleva asociado un error elevado.

Si se compara el resultado obtenido en el rango 400 a 1700 (tabla 11) con el espectro en el rango 400-2500 (tabla 5), se puede observar que los estadísticos disminuyen ligeramente al acortar el espectro, es decir, el ajuste del modelo quimiométrico empeora debido fundamentalmente a la pérdida de información espectral que existe en las bandas entre 1700 y 2500 nm (p.e. PB a 1900 nm y **EE a 2300nm**)

Como ejemplo de este empeoramiento en el ajuste puede verse con claridad en el caso de Proteína Bruta, Amoniaco o Almidón. En todos ellos, el valor del coeficiente de determinación de validación cruzada supera los valores de 0,8 en la ecuación del espectro completo y son inferiores para los espectros acortados. Esta pérdida de eficacia va ligada a una disminución clara en valores de los estadísticos RER y RPD, disminuyendo la exactitud y precisión de las ecuaciones.



**Tabla 8: Estadísticos de calibración NIRS para la predicción de parámetros nutritivos y fermentativos en equipo Master (rango 400-1710 nm) con tratamiento en 1ª derivada (1,4,4,1).**

	SNVD 1,4,4,1					
	SEC	RSQ	SECV	1-VR	RER	RPD
<b>pH</b>	0.115	0.527	0.126	0.430	7.918	1.320
<b>CZF (%)</b>	0.120	0.619	8.142	0.476	8.216	1.369
<b>PBF (%)</b>	0.128	0.823	0.161	0.724	11.342	1.890
<b>FNDF (%)</b>	1.043	0.916	1.371	0.854	15.714	2.619
<b>DEMO (%)</b>	1.703	0.677	1.816	0.635	9.903	1.650
<b>FADLCF (%)</b>	0.317	0.827	0.356	0.788	12.845	2.141
<b>NH3 (mg/dl)</b>	4.338	0.822	4.991	0.773	12.355	2.059
<b>LACT (mg/dl)</b>	238.068	0.882	299.517	0.813	13.857	2.309
<b>ACET (mg/dl)</b>	130.876	0.879	161.948	0.827	12.061	2.326
<b>ALMF (%)</b>	0.860	0.854	0.941	0.829	14.378	2.396
<b>MS (%)</b>	0.722	0.958	0.796	0.950	26.642	4.440

**SEC:** Error de calibración; **RSQ:** coeficiente de determinación de calibración; **SECV:** error de validación cruzada; **1-VR:** Coeficiente de validación cruzada; **RER:** rango/SECV ; **RPD:** SD/SECV.

**Tabla 9: Estadísticos de calibración NIRS para la predicción de parámetros nutritivos y fermentativos en equipo Master (rango 400-1710 nm) con tratamiento en 1ª derivada (1,5,5,1).**

	SNVD 1,5,5,1					
	SEC	RSQ	SECV	1-VR	RER	RPD
<b>pH</b>	0.114	0.510	0.127	0.391	7.669	1.279
<b>CZF (%)</b>	0.124	0.636	0.143	0.513	8.621	1.437
<b>PBF (%)</b>	0.123	0.795	0.146	0.717	11.185	1.864
<b>FNDF (%)</b>	1.120	0.905	1.409	0.849	15.457	2.576
<b>DEMO (%)</b>	1.688	0.676	1.876	0.607	9.489	1.582
<b>FADLCF (%)</b>	0.302	0.835	0.333	0.799	13.405	2.234
<b>NH3 (mg/dl)</b>	3.922	0.831	4.675	0.769	12.248	2.041
<b>LACT (mg/dl)</b>	235.993	0.879	280.401	0.831	14.538	2.423
<b>ACET (mg/dl)</b>	159.538	0.843	177.094	0.807	11.538	2.272
<b>ALMF (%)</b>	0.871	0.853	0.939	0.829	14.512	2.419
<b>MS (%)</b>	0.831	0.951	0.908	0.942	24.832	4.139

**SEC:** Error de calibración; **RSQ:** coeficiente de determinación de calibración; **SECV:** error de validación cruzada; **1-VR:** Coeficiente de validación cruzada; **RER:** rango/SECV ; **RPD:** SD/SECV.

**Tabla 10: Estadísticos de calibración NIRS para la predicción de parámetros nutritivos y fermentativos en equipo Master (rango 400-1710 nm) con tratamiento en 2ª derivada (2,4,4,1).**

	SNVD 2,4,4,1					
	SEC	RSQ	SECV	1-VR	RER	RPD
<b>pH</b>	0.101	0.631	0.126	0.431	7.909	1.318
<b>CZF (%)</b>	0.113	0.658	0.146	0.470	7.916	1.319
<b>PBF (%)</b>	0.100	0.860	0.136	0.740	11.743	1.957
<b>FNDF (%)</b>	0.728	0.961	1.138	0.906	19.161	3.229
<b>DEMO (%)</b>	1.592	0.708	1.831	0.613	9.654	1.609
<b>FADLCF (%)</b>	0.297	0.848	0.354	0.790	12.924	2.154
<b>NH3 (mg/dl)</b>	3.007	0.908	4.755	0.779	12.544	2.091
<b>LACT (mg/dl)</b>	213.23	0.902	274.43	0.836	14.865	2.478
<b>ACET (mg/dl)</b>	101.86	0.934	136.95	0.880	14.728	2.884
<b>ALMF (%)</b>	0.806	0.873	0.900	0.841	15.089	2.515
<b>MS (%)</b>	0.722	0.962	0.803	0.953	27.591	4.598

**SEC:** Error de calibración; **RSQ:** coeficiente de determinación de calibración; **SECV:** error de validación cruzada; **1-VR:** Coeficiente de validación cruzada; **RER:** rango/SECV ; **RPD:** SD/SECV.

**Tabla 11: Estadísticos de calibración NIRS para la predicción de parámetros nutritivos y fermentativos en equipo Master (rango 400-1710 nm) con tratamiento en 2ª derivada (2,5,5,1).**

	SNVD 2,5,5,1					
	SEC	RSQ	SECV	1-VR	RER	RPD
<b>pH</b>	0.104	0.573	0.120	0.440	8.010	1.335
<b>CZF (%)</b>	0.114	0.669	0.137	0.516	8.626	1.438
<b>PBF (%)</b>	0.111	0.866	0.145	0.771	12.516	2.086
<b>FNDF (%)</b>	0.947	0.934	1.276	0.879	17.164	2.882
<b>DEMO (%)</b>	1.710	0.664	1.905	0.581	9.291	1.548
<b>FADLCF (%)</b>	0.327	0.837	0.361	0.804	13.455	2.242
<b>NH3 (mg/dl)</b>	3.489	0.880	5.047	0.751	11.978	1.996
<b>LACT (mg/dl)</b>	185.11	0.927	258.02	0.861	15.906	2.651
<b>ACET (mg/dl)</b>	99.66	0.930	144.24	0.853	13.482	2.610
<b>ALMF (%)</b>	0.952	0.815	1.020	0.789	13.011	2.169
<b>MS (%)</b>	0.786	0.959	0.913	0.944	25.433	4.239

**SEC:** Error de calibración; **RSQ:** coeficiente de determinación de calibración; **SECV:** error de validación cruzada; **1-VR:** Coeficiente de validación cruzada; **RER:** rango/SECV ; **RPD:** SD/SECV.

**Tabla 12: Estadísticos de calibración NIRS para la predicción de parámetros nutritivos y fermentativos en equipo Master (rango 400-1710 nm) con tratamiento en 2ª derivada (2,6,4,1).**

	SNVD 2,6,4,1					
	SEC	RSQ	SECV	1-VR	RER	RPD
<b>pH</b>	0.102	0.577	0.120	0.420	7.856	1.309
<b>CZF (%)</b>	0.112	0.706	0.147	0.493	8.432	1.405
<b>PBF (%)</b>	0.110	0.823	0.139	0.720	11.328	1.888
<b>FNDF (%)</b>	0.978	0.929	1.303	0.874	16.764	2.816
<b>DEMO (%)</b>	1.574	0.695	1.707	0.647	10.023	1.670
<b>FADLCF (%)</b>	0.329	0.811	0.364	0.769	12.489	2.082
<b>NH3 (mg/dl)</b>	3.564	0.886	5.175	0.760	12.247	2.041
<b>LACT (mg/dl)</b>	215.34	0.904	267.12	0.852	15.627	2.604
<b>ACET (mg/dl)</b>	108.46	0.915	147.34	0.843	13.086	2.524
<b>ALMF (%)</b>	0.811	0.867	0.885	0.843	15.097	2.516
<b>MS (%)</b>	0.763	0.957	0.867	0.945	25.516	4.253

**SEC:** Error de calibración; **RSQ:** coeficiente de determinación de calibración; **SECV:** error de validación cruzada; **1-VR:** Coeficiente de validación cruzada; **RER:** rango/SECV ; **RPD:** SD/SECV.

#### **4.2 TRANSFERENCIA DE LOS MODELOS ESPECTRALES ENTRE EL EQUIPO AT-LINE Y ON-SITE**

Para llevar a cabo la transferencia de la librería espectral y por consiguiente, los modelos quimiométricos desarrollados, es necesario tomar como punto de partida el conjunto de muestras de estandarización (N=10, ver M. y M.), cuyos espectros han sido recogidos en ambos equipamientos.

Así, para las mismas muestras, se realiza la medida del espectro en ambos equipos con el fin de evaluar las diferencias y similitudes de la información espectral recogida en ambos equipos.

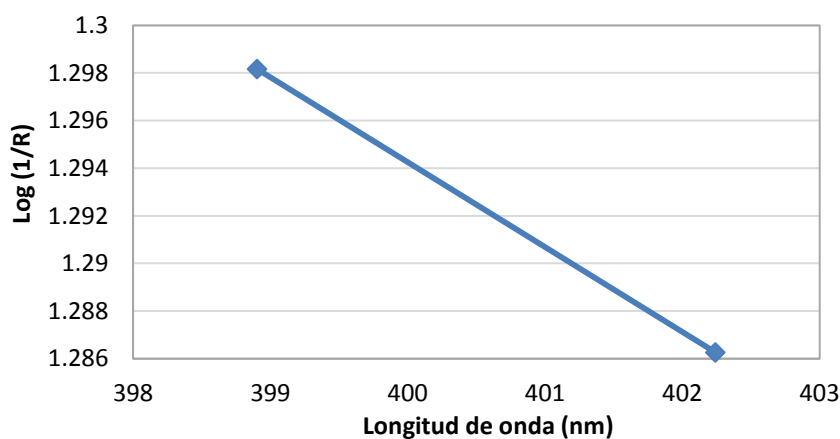
Primero, es necesario reseñar que el equipo Master toma un punto cada 2 nm, mientras que el satélite no es constante en su medida de la información espectral, toma un punto aproximadamente cada 3,1 nm. (existiendo variaciones en su segunda cifra decimal).

Por ello, para poder comparar ambos equipos, es necesario interpolar la información espectroscópica del equipo satélite para transformar los espectros y obtener la información espectral desde 400 a 1710 nm, cada 2 nm.

Así, por ejemplo, en el espectro de la muestra E12-16002, y para la longitud de onda de 400 nm, que está entre 398.9 y 402.2 nm, se calcula la recta entre las dos longitudes de onda, y se interpola el valor de la absorbancia para 400 nm ( ver tabla 13 y Figura 8).

**Tabla 13 Información espectroscópica de muestra E12-16002 en primeras longitudes de onda en Corona.**

<b>Muestra</b>	<b>Longitud onda previa</b>	<b>398.9021606</b>	<b>402.240509</b>
E12-16002	Log (1/R)	1.29816309	1.28626217
	<b>Longitud onda deseada</b>	<b>400</b>	<b>402</b>
	Log (1/R)	1.294249389	1.287119564



**Figura 8: Ejemplo de representación para interpolación espectroscópica**

Este proceso se realiza para todo el rango espectral, desde los 400 hasta los 1700 nm (601 puntos), para cada una de las muestras, obteniéndose una información espectral, adaptada a las características de los modelos quimiométricos desarrollados.

A modo de comparación, a continuación, se muestran los espectros obtenidos para las 10 muestras escaneadas en ambos equipos, master y Satélite (Fig. 9 y 10).

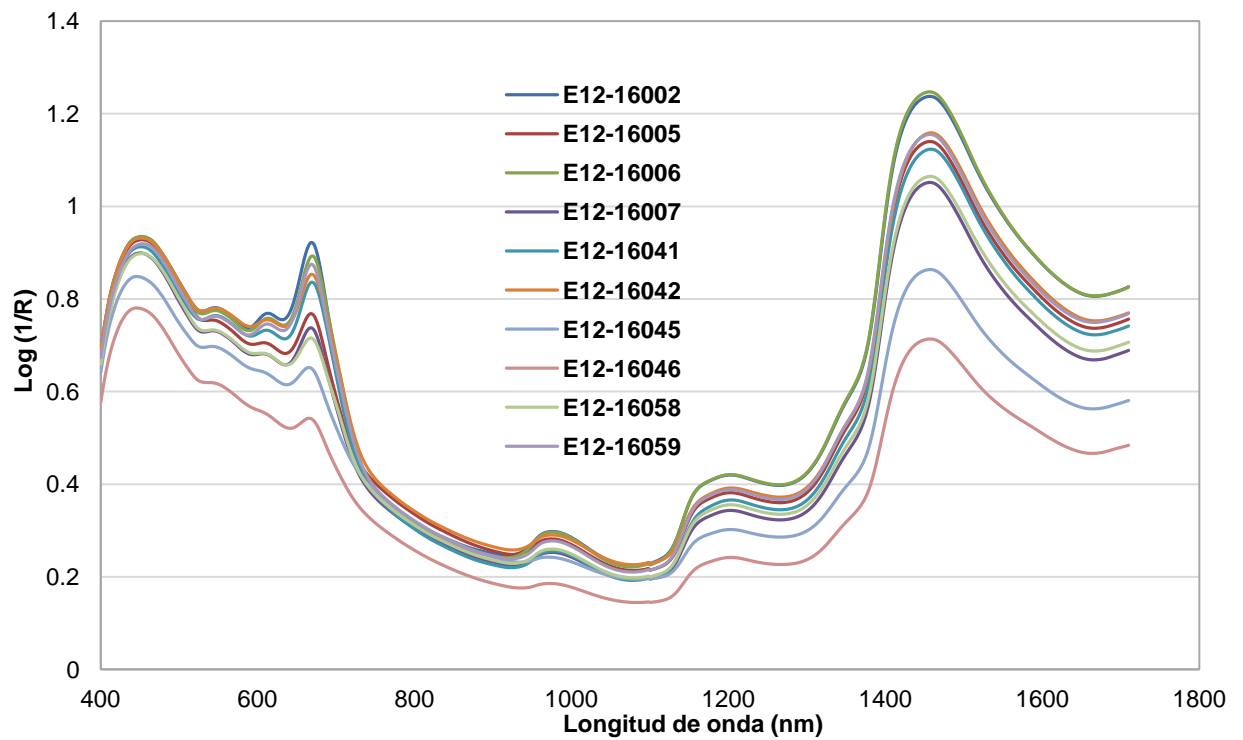


Figura 9: Espectros del colectivo de validación (n=10) obtenidos por el equipo Master (400-1700nm).

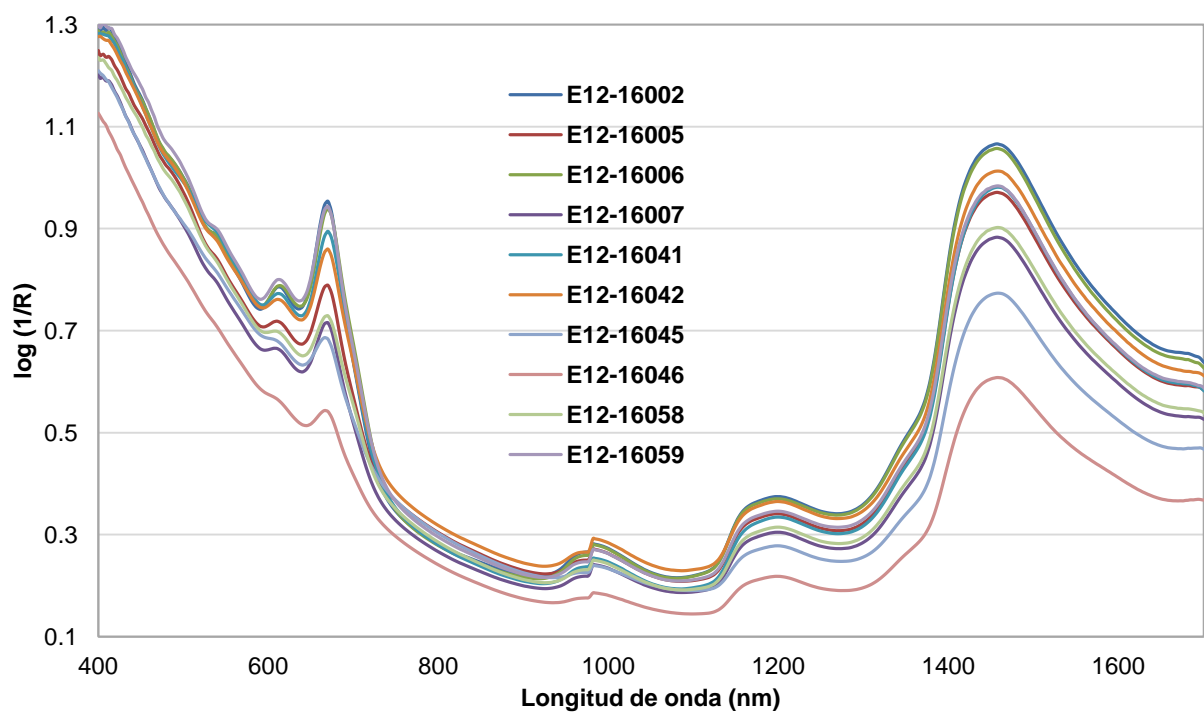


Figura 10: Espectros del colectivo de validación (n=10) obtenidos por el equipo Corona (400-1700nm).

Tal y como se observa en las Figuras 9 y 10, existen claras diferencias entre ambos equipamientos, en el rango de 400 a 600 nm. Estas diferencias están relacionadas con las características ópticas de ambos instrumentos (monocromador vs. array de diodos).

En la Figura 11, se muestran los espectros promedio de los 10 espectros de estandarización recogidos en ambos equipos. A la vista de las diferencias, como primera solución, se busca si existe una región del espectro en la que ambos colectivos de validación no posean diferencias, es decir, una región en la que exista un solapamiento. De esta manera, se espera poder aplicar el modelo matemático directamente al rango solapado, evitando los artificios matemáticos.

Para poder realizar una mejor interpretación de los colectivos de validación en los equipos, y determinar si existe una región de solapamiento entre ambos, se realizan la primera y segunda derivada en los espectros para cada una de las muestras.

En el ANEXO I se encuentran representados individualmente los espectros para cada una de las 10 muestras, sin tratamiento matemático, en primera y en segunda derivada respectivamente.

A continuación, en las Figuras 11,12 y 13 se comparan los espectros promedio de las 10 muestras, sin tratamiento matemático, en primera y en segunda derivada, para el colectivo de estandarización.

La derivatización de la información espectral nos permite maximizar las diferencias entre los espectros recogidos en ambos equipos. Así se observan diferencias en el rango entre 400 y 600 nm, alrededor de 700 nm, en el rango de 900-1100nm y en el rango 1600-1700nm.

Con el fin de evaluar estadísticamente estas diferencias se llevó a cabo la predicción de los parámetros nutritivos evaluados aplicando el modelo desarrollado en el equipo master sobre los espectros recogidos en el equipo satélite (N=10)

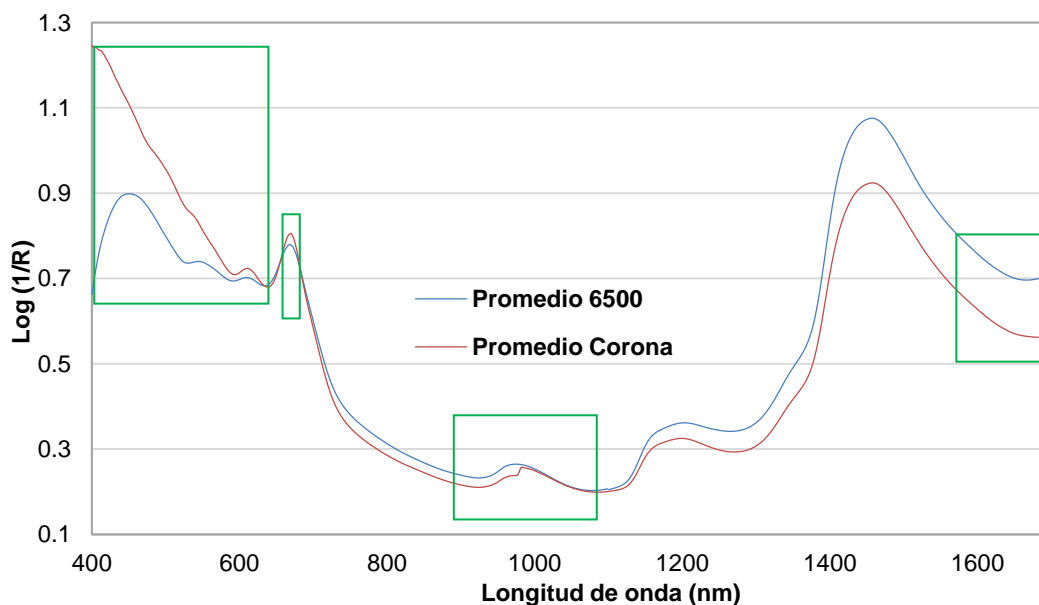


Figura 11: Espectros promedio del colectivo de validación (n=10) en Corona y Master (400-1700nm)

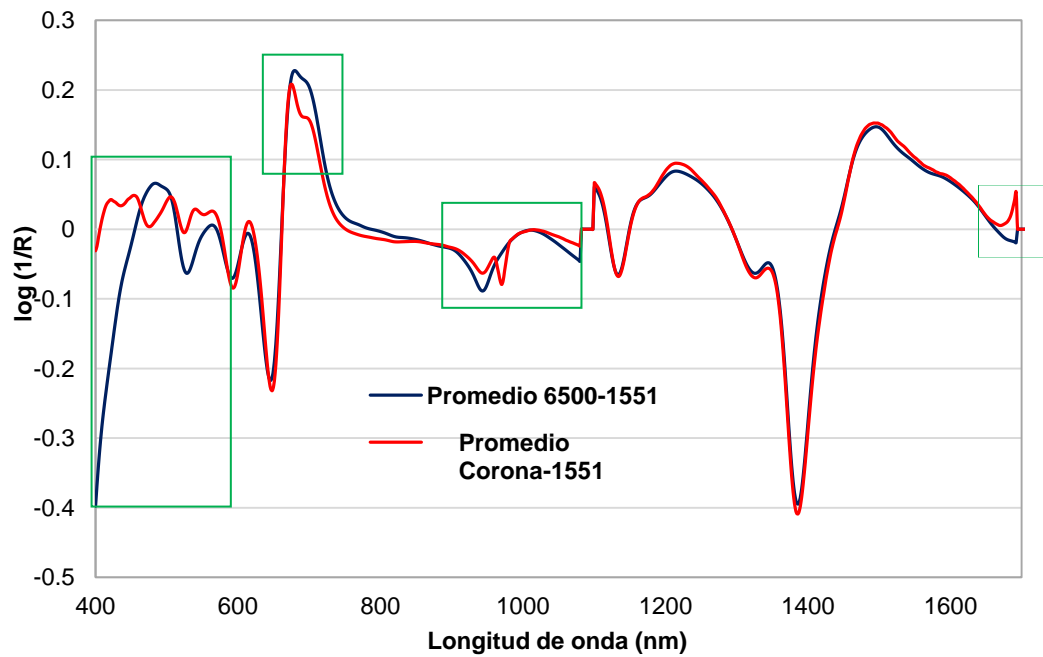


Figura 12: Espectros promedio de colectivos de validación (n=10) en primera derivada (400-1700nm).

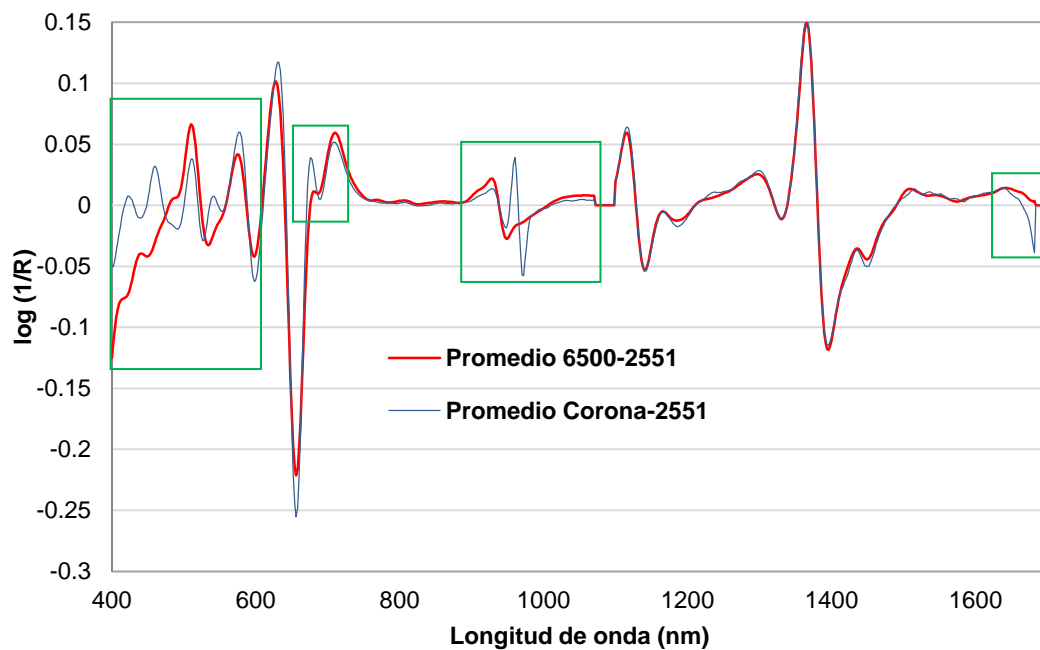


Figura 13: Espectros promedio de colectivos de validación(n=10) en segunda derivada (400-1700).

En la tabla 14 se muestran los valores para los estadísticos GH y NH para los espectros de cada equipo, frente los datos de predicción para el valor nutritivo del ensilado de maíz.

**Tabla 14: GH y NH de muestras recogidas por ambos instrumentos usando modelo de calibración.**

	Equipo Master		Equipo Satélite	
	Primera derivada	Segunda derivada	Primera derivada	Segunda derivada
<b>GH</b>	1.424	1.282	136.278	73.729
<b>NH</b>	0.787	0.843	120.638	64.760

Como se puede observar, para los parámetros nutritivos en el colectivo de estandarización del equipo Master, GH tiene un valor inferior a 3, lo que indica que los valores predichos son aceptables y puede utilizarse el modelo desarrollado para la predicción de los mismos.

Por el contrario, los valores medio predichos del estadístico H con respecto al colectivo de estandarización en el corona son muy superiores a 3, por lo que se han de considerar los espectros con los cuales se desarrolló el modelo son muy diferentes de aquellos obtenidos en el equipo satélite y que se pretenden predecir.

Al observar los estadísticos GH y NH en ambos equipos se puede concluir que es inviable una transferencia inmediata, este hecho está relacionado con las diferencias espectrales en los rangos 400 a 1100nm y 1656 a 1710 nm. Por ello, se selecciona como rango espectral de solapamiento el comprendido entre 1100 y 1656 nm.

Y de este nuevo rango de trabajo se desarrollan nuevamente los modelos matemáticos que mejores resultados habían dado anteriormente, es decir, SNVD (1,5,5,1) y SNVD (2,5,5,1).

Para ello, siguiendo la rutina de trabajo en el desarrollo de los modelos, se procede a realizar el análisis por componentes principales considerando únicamente la región espectral NIRS (1100-1656 nm). Se hace la eliminación de muestras anómalas para cada tratamiento matemático y se selecciona la población de calibración definitiva.

Los resultados estadísticos obtenidos para cada parámetro nutritivo y fermentativo, se muestran a continuación en las tablas 15 y 16.



**Tabla 15: Estadísticos de calibración NIRS para la predicción de parámetros nutritivos y fermentativos en equipo Master (rango 1102-1654 nm) con tratamiento en 1ª derivada (1,5,5,1).**

	SNVD 1,5,5,1					
	SEC	RSQ	SECV	1-VR	RER	RPD
<b>pH</b>	0.128	0.414	0.137	0.333	7.322	1.220
<b>CZF (%)</b>	0.128	0.613	0.14	0.536	8.797	1.466
<b>PBF (%)</b>	0.123	0.79	0.141	0.725	11.430	1.905
<b>FNDF (%)</b>	1.376	0.848	1.582	0.798	13.335	2.227
<b>DEMO (%)</b>	1.68	0.672	1.756	0.645	10.024	1.671
<b>FADLCF (%)</b>	0.336	0.812	0.363	0.781	12.828	2.138
<b>NH3 (mg/dl)</b>	4.475	0.8	5.146	0.74	11.660	1.943
<b>LACT (mg/dl)</b>	321.3	0.773	349.4	0.731	11.576	1.929
<b>ACET (mg/dl)</b>	164.2	0.845	194.8	0.787	10.751	2.143
<b>ALMF (%)</b>	0.91	0.835	0.953	0.818	14.096	2.349
<b>MS (%)</b>	0.788	0.949	0.815	0.945	25.579	4.263

**SEC:** Error de calibración; **RSQ:** coeficiente de determinación de calibración; **SECV:** error de validación cruzada; **1-VR:** Coeficiente de validación cruzada; **RER:** rango/SECV ; **RPD:** SD/SECV.

**Tabla 16: Estadísticos de calibración NIRS para la predicción de parámetros nutritivos y fermentativos en equipo Master (rango 1102-1654 nm) con tratamiento en 2ª derivada (2,5,5,1).**

	SNVD 2,5,5,1					
	SEC	RSQ	SECV	1-VR	RER	RPD
<b>pH</b>	0.115	0.512	0.127	0.41	7.781	1.297
<b>CZF (%)</b>	0.124	0.638	0.145	0.503	8.496	1.416
<b>PBF (%)</b>	0.116	0.833	0.14	0.76	12.195	2.032
<b>FNDF (%)</b>	1.147	0.889	1.445	0.832	14.310	2.385
<b>DEMO (%)</b>	1.772	0.644	1.841	0.623	9.676	1.613
<b>FADLCF (%)</b>	0.335	0.814	0.361	0.785	12.926	2.154
<b>NH3 (mg/dl)</b>	3.805	0.862	4.875	0.776	12.628	2.105
<b>LACT (mg/dl)</b>	253.8	0.864	294.0	0.819	14.049	2.341
<b>ACET (mg/dl)</b>	134.7	0.878	173.5	0.8	11.428	2.226
<b>ALMF (%)</b>	0.827	0.862	0.899	0.839	14.852	2.475
<b>MS (%)</b>	0.731	0.956	0.775	0.952	26.927	4.488

**SEC:** Error de calibración; **RSQ:** coeficiente de determinación de calibración; **SECV:** error de validación cruzada; **1-VR:** Coeficiente de validación cruzada; **RER:** rango/SECV ; **RPD:** SD/SECV.

Una vez desarrollados los nuevos modelos, se lleva a cabo la predicción de los 10 espectros de estandarización. Los resultados de la predicción de GH y NH se recogen en la tabla 17.

**Tabla 17: GH y NH de muestras en rango de solapamiento para ambos equipos.**

	Equipo Master		Equipo Satélite	
	Primera derivada	Segunda derivada	Primera derivada	Segunda derivada
<b>GH</b>	1.712	1.709	60.280	41.146
<b>NH</b>	0.801	1.139	48.484	32.633

Aunque a simple vista entre los espectros de esta región no existen diferencias, tampoco es viable aplicar directamente el modelo. Como se muestra en la tabla 17, los resultados de NH y GH son más bajos que los descritos en la tabla 14 (incluyen longitudes de onda entre 400 y 1700 nm), pero son muy superiores al límite aceptado para poder aplicar el modelo desarrollado. De manera que es necesario evaluar nuevas alternativas para la transferencia de los modelos.

Para ello el siguiente paso es crear una matriz de estandarización que transforme los espectros del equipo Satélite y asimile a los obtenidos en el equipo Master.

#### **4.2.1 DESARROLLO DE UNA MATRIZ DE ESTANDARIZACIÓN PARA LA TRANSFERENCIA DE LOS MODELOS**

En el apartado 1.2.4 se detallan diferentes alternativas matemáticas para llevar a cabo la estandarización de los instrumentos NIRS. En el estudio que estamos realizando utilizaremos la estandarización mediante el método patentado por Shenk y Westerhaus (1989) puesto que es éste el que incorpora el software quimiométrico WinISI v1.50 utilizado para el desarrollo del presente proyecto.

Este procedimiento corrige las longitudes de onda y las absorbancias ajustándolas a un modelo cuadrático que aproxima la información espectral (longitud de onda vs. Log 1/R) de los equipos Master y Satélite.

Para llevar a cabo la matriz de estandarización se utilizaron las 10 muestras incluidas en el colectivo de estandarización.

Las figura 14 muestra las similitudes y diferencias entre los espectros promedio de estandarización (n=10) obtenidos en el instrumento Master y en el Satélite antes y después de estandarizar con el fichero de estandarización de la matriz desarrollada.

Además en el ANEXO II se pueden comparar los espectros recogidos en cada equipo para cada muestra de forma independiente. Se observa el excelente ajuste de los espectros recogidos en ambos instrumentos.

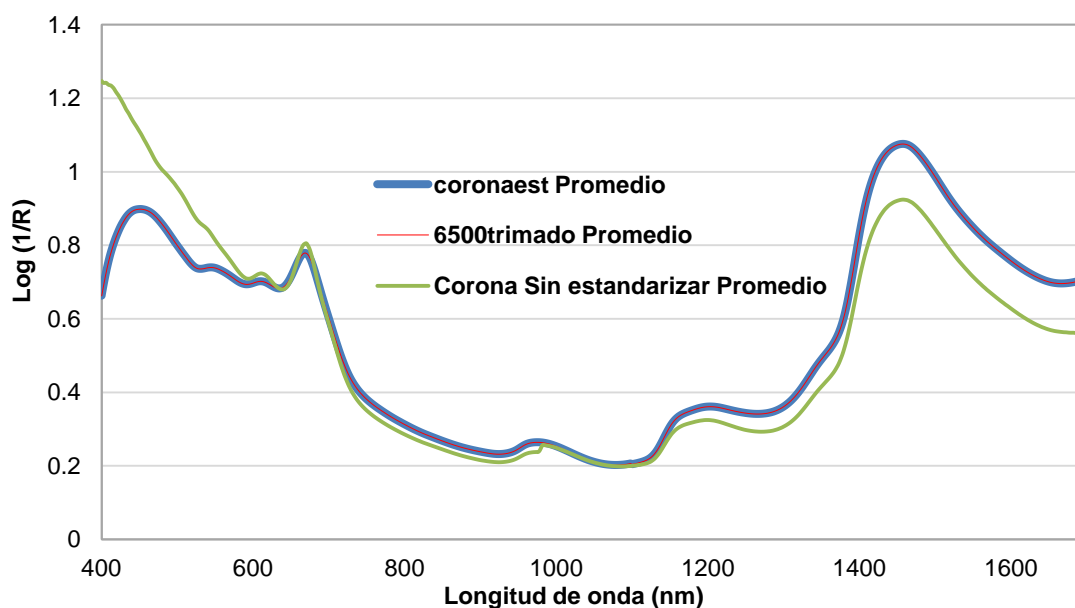


Figura 14: Espectro promedio (n=10) sin tratamiento para 6500, corona estandarizado y sin estandarizar (400-1700nm).

A continuación, y siguiendo la estrategia detallada anteriormente, se evaluó estadísticamente la viabilidad de transferencia del modelo desarrollado con el equipo Master. En la tabla 11 se muestran los estadísticos obtenidos tras predecir los parámetros nutritivos y fermentativos aplicando el modelo desarrollado en el equipo Master sobre los espectros estandarizados del equipo Satélite.

Tabla 18: GH y NH de muestras en matriz de estandarización.

	Primera derivada	Segunda derivada
GH	2.013	2.985
NH	1.341	2.221

Como se puede observar, los resultados de NH y GH se ajustan a lo recomendado, el valor de GH es menor de 3, de manera que se considera que los espectros de la población no se encuentran alejados de aquellos del colectivo de calibración obtenidos en el Master y, por tanto, es posible utilizar el modelo desarrollado en el equipo Master para llevar a cabo la predicción de espectros recogidos en el equipo Satélite (on-site).

En este punto, y para realizar la validación externa de la metodología propuesta se aplica el modelo desarrollado a los 10 espectros del colectivo de validación y se evalúan los resultados obtenidos mediante un test de comparación de medias: test estadístico *t-student* para muestras emparejadas.

En este test, cuando el valor del estadístico t es menor que el valor crítico, significa que no existen diferencias significativas. En el caso contrario (est  $t >$  valor crítico) se concluye que existen diferencias significativas entre ambos métodos. En la tabla 19 se resumen los resultados obtenidos.

**Tabla 19: Resultados prueba t para medida de dos muestras emparejadas en cada constituyente**

	Valor crítico de t (una cola)	Primera derivada		Segunda derivada	
		Estadístico t	P(T<=t) una cola	Estadístico t	P(T<=t) una cola
<b>pH</b>	1.833	0.812	0.219	-0.237	0.409
<b>MS</b>		1.345	0.106	-1.607	0.071
<b>DEMO</b>		-0.493	0.317	-0.718	0.246
<b>CZF</b>		-0.910	0.193	-1.139	0.142
<b>PBF</b>		0.088	0.466	0.084	0.467
<b>FNDF</b>		-1.326	0.109	-1.962	0.041
<b>FADLF</b>		<b>-3.579</b>	0.003	<b>-3.689</b>	0.003
<b>ACET</b>		-0.174	0.433	-0.290	0.389
<b>NH3</b>		-1.087	0.153	-0.875	0.202
<b>LACT</b>		-1.119	0.146	-0.790	0.225
<b>ALM</b>		<b>-2.419</b>	0.019	<b>-2.428</b>	0.019

Como se puede comprobar en la tabla 19, no existen diferencias significativas al comparar los resultados de la medida de cada constituyente, nutricional y fermentativo, mediante los métodos de referencia y NIRS, para ninguno de los parámetros, a excepción de las fibras y el almidón.

Si bien, al comparar los resultados obtenidos observamos que la aproximación matemática posee un sesgo positivo que está dentro del margen de error de la incertidumbre del método de referencia. Además, este sesgo se observa tanto para la predicción de los espectros recogidos en el equipo Master, como los del equipo Satélite. Mostrando que es inherente al modelo y no al proceso de transferencia.

De manera que puede concluirse que los métodos matemáticos, tanto en primera como en segunda derivada, son válidos para transformar los espectros del equipo satélite al Master, tras aplicar una matriz de estandarización.

## 5 CONCLUSIONES

Tras realizar el Proyecto Fin de Máster, se puede llegar a concluir que:

1. Las ecuaciones NIRS obtenidas para la predicción de constituyentes nutricionales y fermentativos en ensilados de maíz intactos, obtenidas con la biblioteca espectral del equipamiento Master en el rango 400-2500 nm, poseen unos estadísticos que posibilitan su empleo en la rutina de un laboratorio. Los mejores resultados se obtienen con segunda derivada.
2. No es posible el traslado de la biblioteca espectral de manera directa del equipo Master (at-line) al Corona para evaluar los parámetros nutritivos y fermentativos de los ensilados de maíz debido a las diferencias ópticas existentes entre ambos equipamientos..
3. El desarrollo de una matriz de estandarización entre instrumentos NIRS descrito por Shenk y Westerhaus ha minimizado las diferencias ópticas existentes entre los dos equipos NIRS utilizados.
4. Las calibraciones NIRS desarrolladas han sido transferidas con éxito desde el instrumento Master al instrumento Satélite.
5. La metodología desarrollada ha sido validada externamente y ha mostrado su aplicabilidad para obtener resultados analíticos en tiempo real y a pie de campo. De manera que este método es viable y está validado para transformar los espectros del equipo satélite al Master y predecir los constituyentes nutricionales y fermentativos del ensilado de maíz de forma intacta.

Por otro lado, las conclusiones de aprendizaje derivadas de la realización del se resumen a continuación:

- a) Búsqueda bibliográfica en bases de datos científicas y gestión de la información obtenida, mejorando así la capacidad de análisis y síntesis.
- b) Mejora de la capacidad para el trabajo en grupo, así como para relacionarse con científicos que trabajan en otros campos, aspecto indispensable para llevar a cabo investigación multidisciplinar de calidad.
- c) Conocimiento y aplicación de las normas para el control de la calidad en el laboratorio, los fundamentos y principios teóricos de las técnicas de análisis empleadas, y aplicar los principios quimiométricos al diseño de experimentos y al tratamiento de los resultados obtenidos.
- d) Interpretación de la información obtenida en el laboratorio, con las distintas técnicas de análisis seleccionadas, para resolver eficientemente problemas analíticos, y desarrollar la capacidad de tomar decisiones en función de los resultados de obtenidos.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Argamentería, A. L. (1995). El cultivo del maíz forrajero para ensilar. Labores, técnicas de cultivo y estados vegetativos. *Tecnología Agroalimentaria, edición especial* .
- Argamentería, G. A. (2010). Variedades de Maíz. *SERIDA* , 33.
- Argamentería, G. A., & De la Roza, B. A. (1997). El ensilado en Asturias. *Centro de Investigación Aplicada y Tecnología Agroalimentaria* , 1-127.
- Barnes, R. (1995). Forages in a changing world. In Forages, Vol. 1: An Introduction to Grassland Agriculture. *Iowa State University Press* , 2-13.
- Barnes., R. D. (1989). Standard Normal Variate transformation and De-Trending of near-infrared diffuse reflectance spectra. *Appl. Spectrosc.* , 772-777.
- Bertrand, D. (2000). La Spectroscopie Infrarouge et ses Applications Analytiques. *Tec and Doc, Lavoisier, Paris* , 2-7430-0375-8.
- Burns, D. C. (2008). *Handbook of Near-Infrared Analysis, Third Edition*.
- Calsamiglia, S. A. (2004). Tablas FEDNA de valor nutritivo de Forrajes y Subproductos fibrosos húmedos. . *Fundación para el Desarrollo de la Nutrición Animal.* , 70.
- Cañeque, V. V. (1998). Ensilado de Forrajes y Su Empleo en la Alimentación de Rumiantes. *Mundi-Prensa* , 260.
- Chitra, S. R. (2011). Comparison of near infra-red spectroscopy, neutral detergent fibre assay and in-vitro organic matter digestibility assay for rapid determination of the biochemical methane potential of meadow grasses. . *Bioresource Technology* 102 , 7835-7839.
- Cozzolino, D. F. (2006). Measurement of chemical composition in wet whole maize silage by visible and near infrared reflectance spectroscopy. *Animal Feed Science and Technology*, 129 , 329-336.
- Dardenne, P. (2000). Authentification des productions agricoles et agroalimentaires: nouveau challenge analytique. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* , 195.
- De la Roza, B., & Argamentería, A. (2009). Importancia del control de calidad, trazabilidad y seguridad en las raciones completas (unifeed) para ganado vacuno lechero. Aplicación de la tecnología NIRS. . [Edita] Servicio Regional d. *Tecnología Agroalimentaria* , 29-33.
- Dulphy, J. R., & Demarquilly, C. (1981). Problèmes particuliers aux silages. *Previsión de la valeur nutritive des aliments des ruminants* , 81-104.
- Fernández-Canabás, V. (1999). The use of "standard normal variate" and "detrending" as signal improvement tools for the interpretation of near infrared spectra of agro-food products. *Química Analítica*, 18 , 113-118.
- Gallardo, M. (2003). Tecnologías para corregir y mejorar la calidad de los forrajes conservados. *Circular planteos ganaderos, aapresid.org.ar* , 51-61.

- Hollas, J. M. (2003). *Modern Spectroscopy, 4th edn.* WileyBlackwel.
- ISI. WinISI II v. 1.5. 2000. Infrasoft International, Port Matilda, PA, USA,.
- Jiang, W. G. (2010). Fast compositional analysis of ramie using near-infrared spectroscopy. *Carbohydrate Polymers* 81 , 937–941.
- Jin, S. Y. (2007). Near-infrared analysis of the chemical composition of rice straw. *Industrial Crops and Products*, 26 , 207–211.
- Jobin, C. L. (2007). Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. *Revista brasileira de zootecnia*, v. 36, suplemento especial , 101-119.
- Kays, S. S. (2005). Near-infrared transmission and reflectance spectroscopy for the determination of dietary fiber in barley cultivars. . *Crop Science* 45 , 2307–2311.
- López-Bote, C. J. (1998). Sustained utilization of the Iberian pig breed. *Meat sci.*, 49 , s17-s27.
- Maiztegui, J. M. (2001). Los alimentos. *Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral* .
- Martens, H. (2000). *Multivariate analysis of quality. An introduction.* Wiley, Chichester.
- Martínez, A., N. P. (2006). No solo de maíz viven las vacas. *Tecnología Agroalimentaria* . , 2.
- Martínez, A. (2003). Ensilabilidad de especies prateras en Asturias. *Tesis doctoral* .
- Martínez, A., & De la Roza, B. d. (1998). Nuevas técnicas para determinar la calidad de los ensilados. *Tecnología Agroalimentaria. CIATA Nº 2* .
- Massart, D. B.-V. (1997). *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics.* Amsterdam: Elsevier.
- Mendez, M. (2000). Aprendamos sobre ensilajes. Núcleo de formación y servicios tecnológicos agropecuarios Subsector Zootecnia. Instituto Nacional de Aprendizaje (INA). . *Editorial INA* , p1-10.
- Miller, J. N. (2002). *Estadística y Quimiometría para Química Analítica (4a Ed).* Madrid: Pearson Educación, S.A.
- Millmier, A. L. (2000). Near-infrared sensing of manure nutrients. *Trans ASAE*, 43 , 903-908.
- Muck, J. Z. (1991). Silage fermentation. *Mixed Cultures in Biotechnology* , 171-204.
- Naes, T. I. (2002). *A user-friendly guide to Multivariate Calibration and Clasification.* Chichester, UK: NIR Publications.
- Olsen B.A ., M. W. (2002). Screening for Counterfeit Drugs Using Near-Infrared Spectroscopy. *Pharmaceutical Technology* , 62-95.
- Osborne, B. G. (1993). *Practical NIR Spectroscopy with Applications in Food and Beverage Analysis.* Wiley, New York.
- Otto, M. (1998). *Chemometrics: statistics and computer application in analytical chemistry.* Weinheim, Germany: Wiley-VCH.

- Park, R. S. (1999). The development of near infrared reflectance spectroscopy calibrations for undried grass silage and their transfer to another instrument using multiple and single sample standardisation. *J. Near Infrared Spectroscopy* , 117-131.
- Piñeiro, G. (2006). Cuidados en la confección de los silos de maíz. *Producir XXI, Bs. As.*
- Playne, M. J. (1966). The buffering constituents of herbage and of silage. *Journal Science Food and Agricultural* , 264-268.
- Reed, J. D. (2011). Performance parameter prediction for sewage sludge digesters using reflectance FT-NIR spectroscopy. *water research*, 45 , 2463-2472.
- Shenk, J., & Westerhaus, M. (1989). *Patente nº 4866644*. U.S.
- Shenk, J., & Westerhaus, M. (1995a). Analysis of Agriculture and Food products by Near Infrared Reflectance Spectroscopy. *Monograph, NIRSystems* .
- Shenk, J., & Westerhaus, M. (1991). New standardisation and calibration procedure for NIRS Analytical Systems. *Cro. Sci.* , 1694-1696.
- Shenk, J., & Westerhaus, M. O. (1996). Calibration the ISI way. Chichester, UK: NIR Publications.
- Shenk, J., & Westerhaus, M. (1995b). *Routine operation, calibration, development and network system management manual*. Silver Spring, M. D., USA: NIR Systems Inc.
- Shenk., J. (1990). Standardizing NIRS instruments. En *Proceedings of the 3rd International Conference on Near Infrared Spectroscopy* (págs. 649-654). Gembloux, Belgium: Agricultural Research Centre.
- Skoog, D. A. (2008). Principios de Análisis Instrumental. Cengage Learning Editores.
- Smirnov, R. M. (2012). Interpolation and extrapolation problems of multivariate regression in analytical chemistry: benchmarking the robustness on near-infrared (NIR)spectroscopy data. *Analyst*, 137 , 1604.
- Somarribas. (2007). de diferentes densidades de maíz y diferentes agotamientos del agua disponible en el suelo sobre la producción de forraje de maíz asociado con mucuna. *Tesis maestría, universidad Costa Rica* , 90p.
- Weinberg, A. G. (2001). Ensilaje de cereales y cultivos forrajeros en el trópico. Memorias de la conferencia electrónica de la FAO sobre el ensilaje en los trópicos. . *Estudio FAO producción y protección vegetal 161* , 111-119.
- Wilkins, R. (2000). Forages and their Role in Animal Systems. . *Forage Evaluation in Ruminant Nutrition, CAB International* , 1-14.
- Williams, P. C. (1987). Variables affecting near-infrared reflectance spectroscopic analysis. *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries. American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul* , .
- Williams, P. (2003). *Near infrared technology-Getting the best out of light*. Nanaimo, Canada: PDK Projects.



**ANEXO I: ESPECTROS MUESTRAS INDIVIDUALES entre 6500 y CORONA**

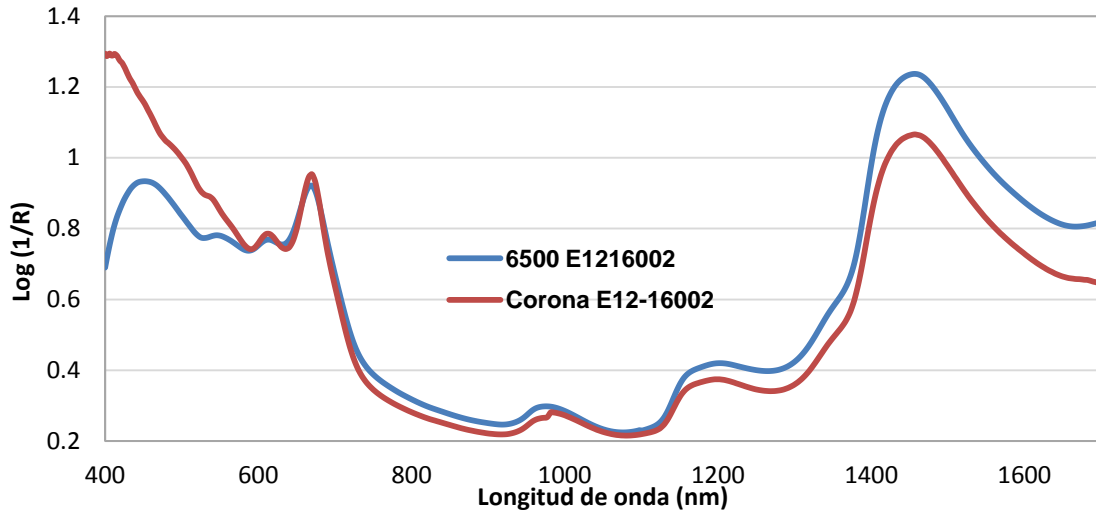


Figura I. 1: Espectro muestra 16002 sin derivar para 6500 y Corona (400-1700nm)

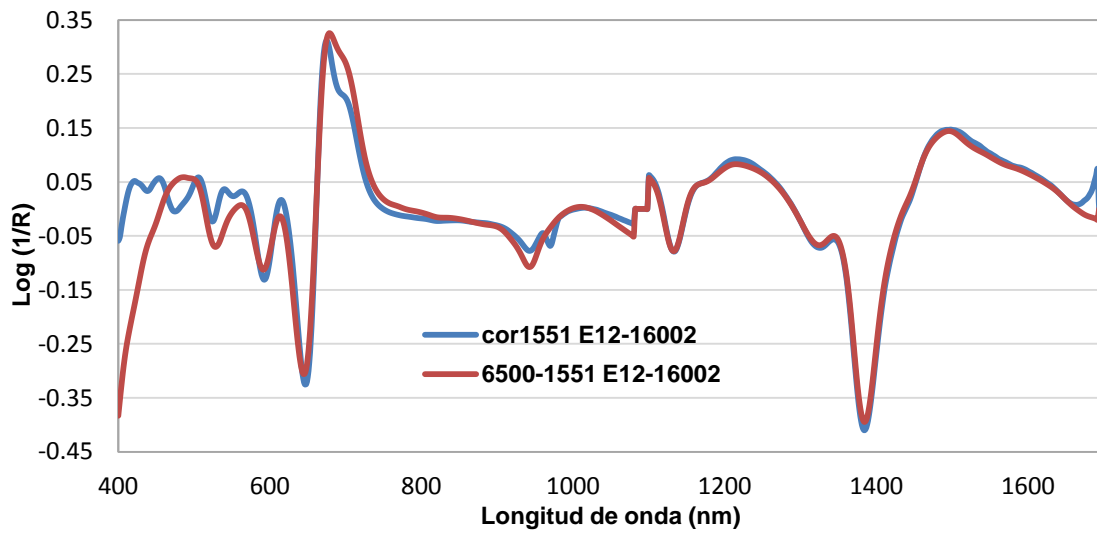


Figura I. 2: Espectro muestra 16002 en primera derivada para 6500 y Corona (400-1700nm).

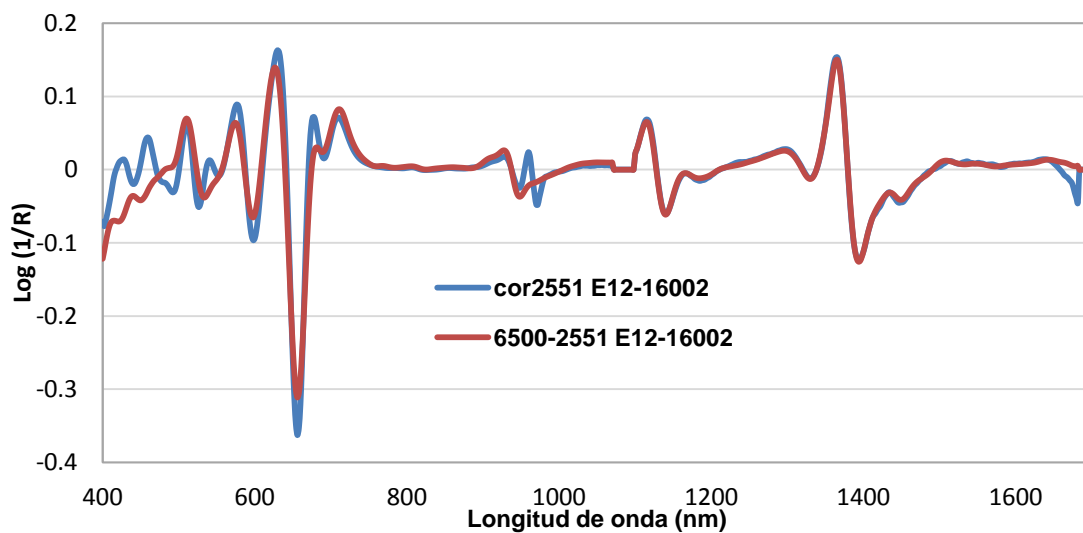


Figura I. 3: Espectro muestra 16002 en segunda derivada para 6500 y Corona (400-1700nm).

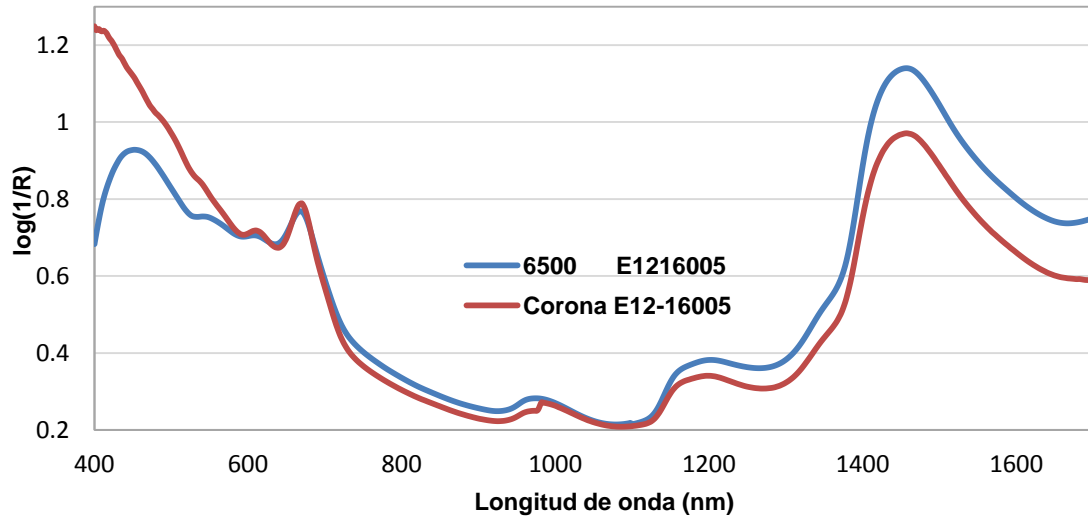


Figura I. 4: Espectro muestra 16005 sin derivar para 6500 y Corona (400-1700nm).

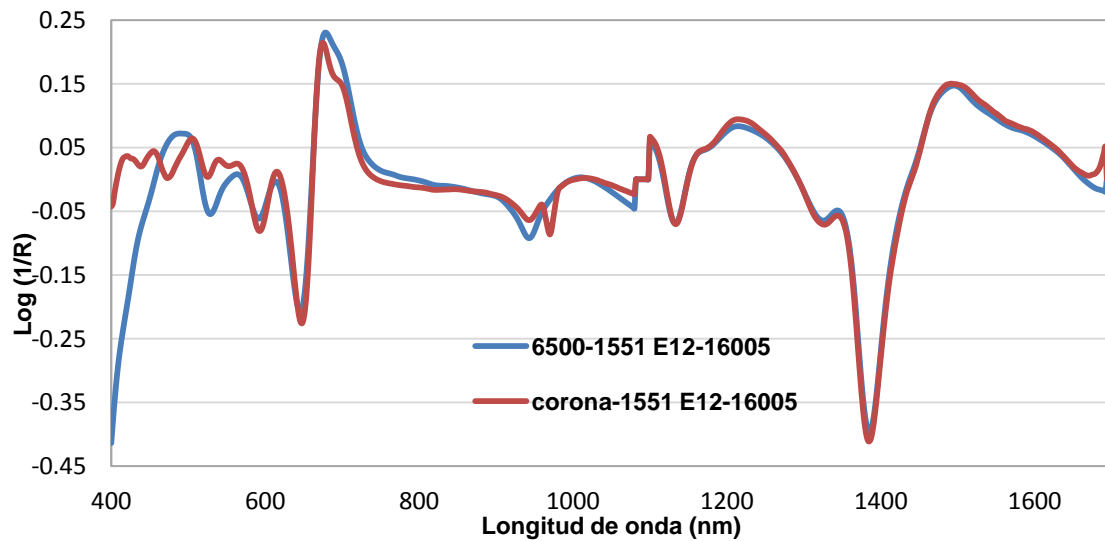


Figura I. 5 Espectro muestra 16005 en primera derivada para 6500 y Corona (400-1700nm).

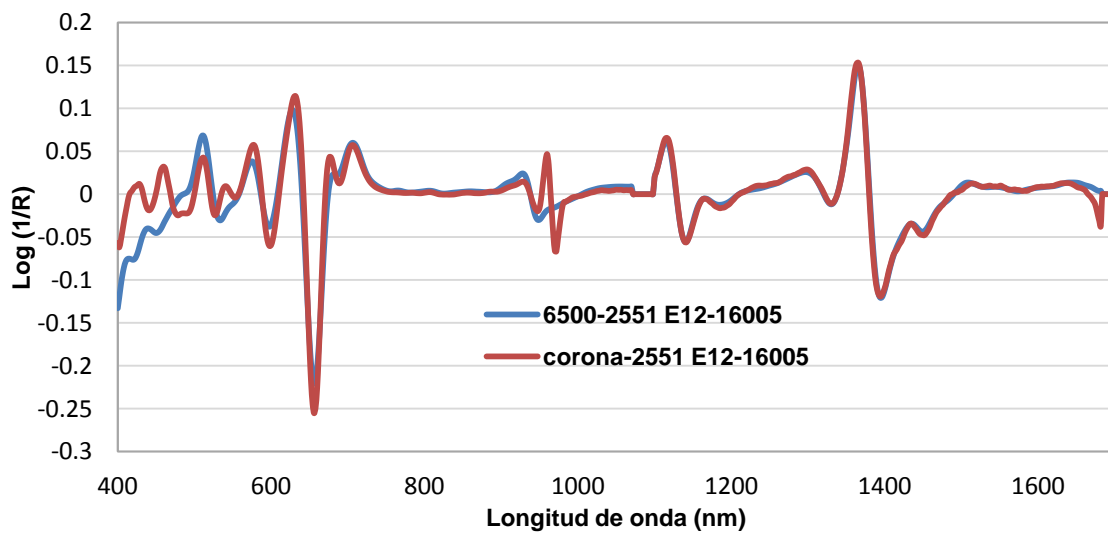


Figura I. 6: Espectro muestra 16005 en segunda derivada para 6500 y Corona (400-1700nm).

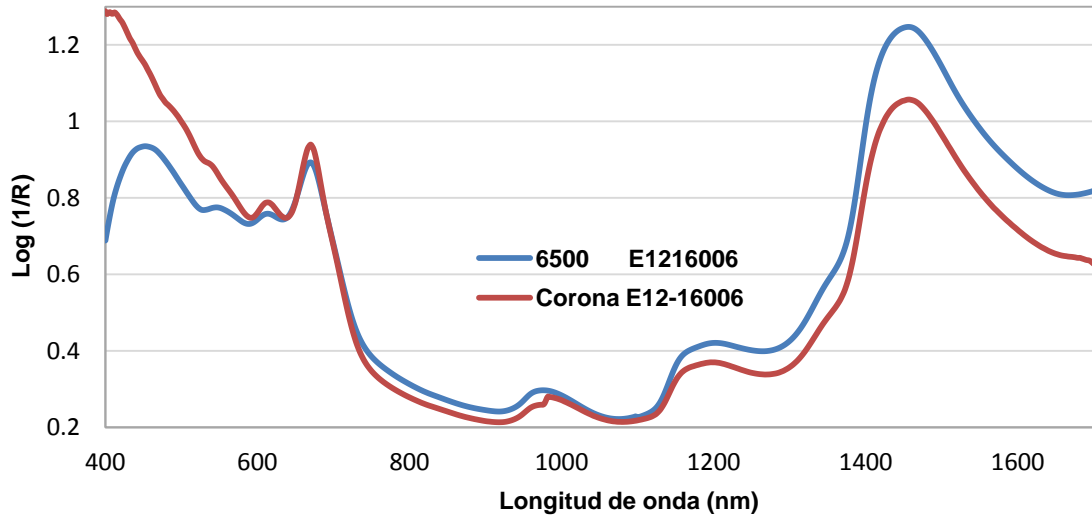


Figura I. 7: Espectro muestra 16006 sin derivar para 6500 y Corona (400-1700nm).

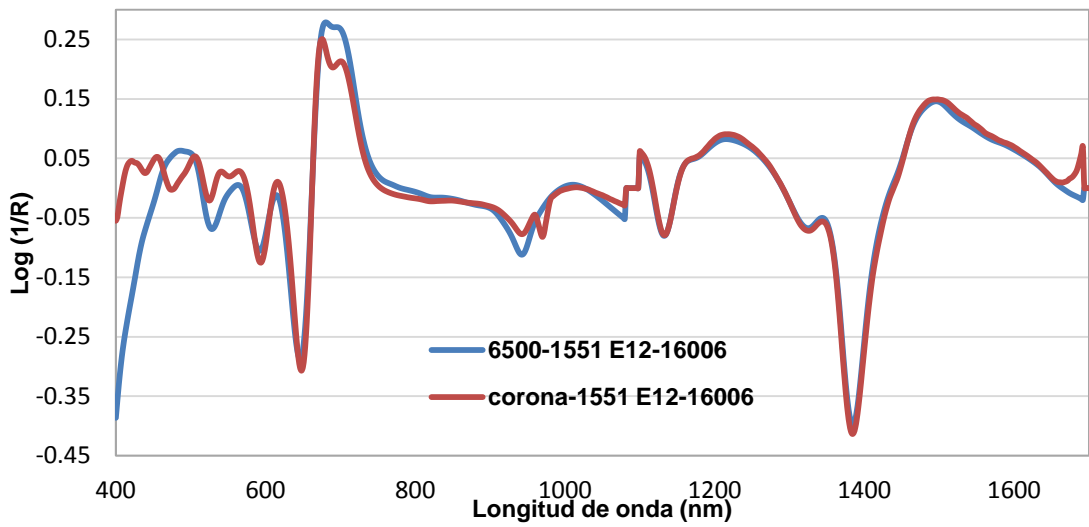


Figura I. 8 Espectro muestra 16006 en primera derivada para 6500 y Corona (400-1700nm).

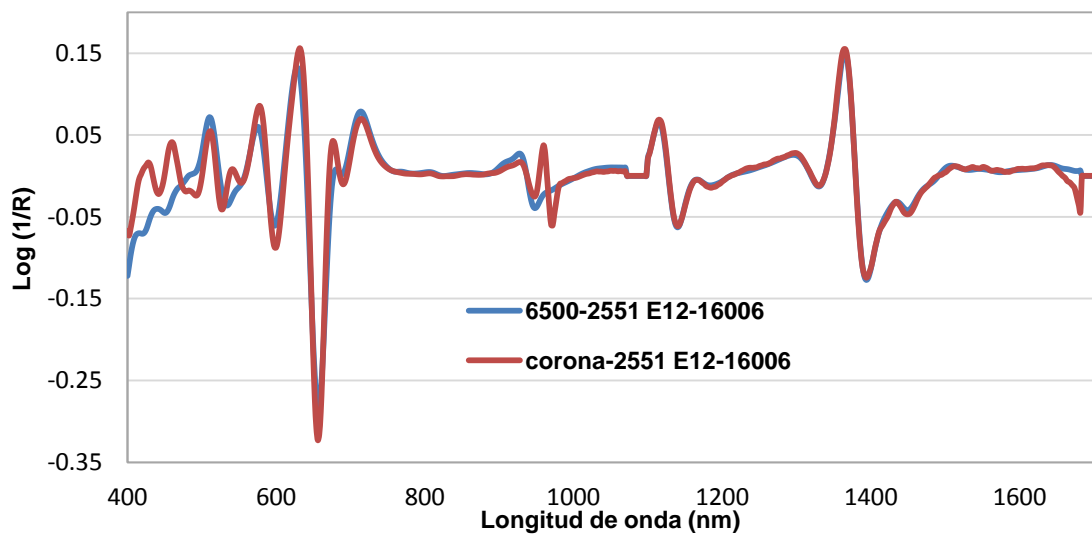


Figura I. 9: Espectro muestra 16006 en segunda derivada para 6500 y Corona (400-1700nm).

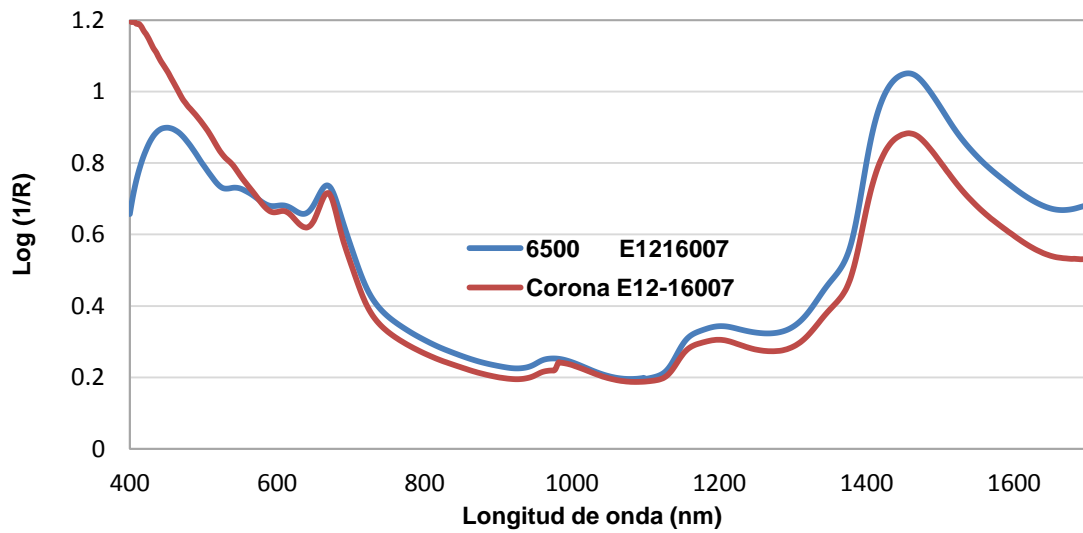


Figura I. 10: Espectro muestra 16007 sin derivar para 6500 y Corona (400-1700nm).

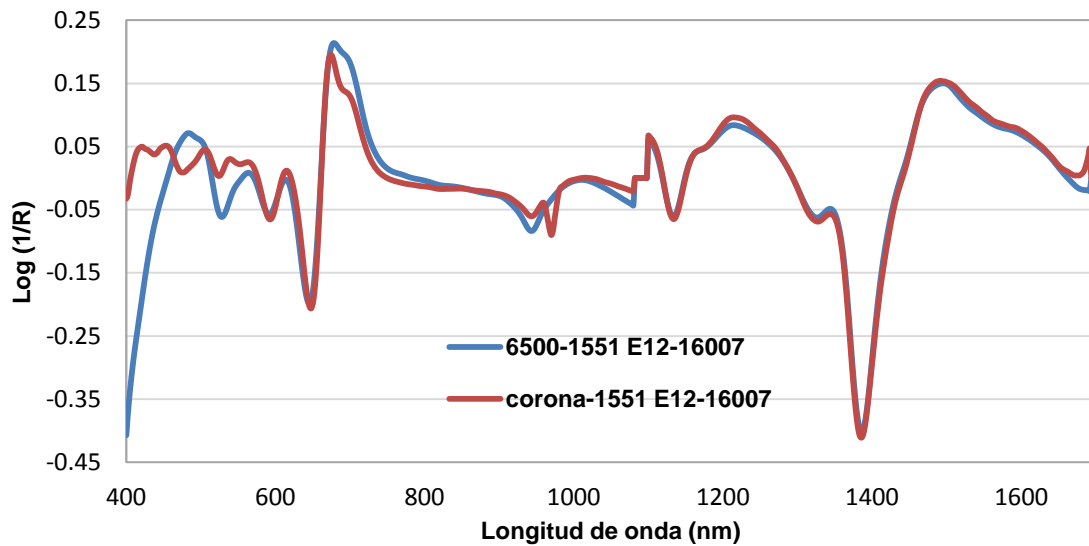


Figura I. 11: Espectro muestra 16007 en primera derivada para 6500 y Corona (400-1700nm).

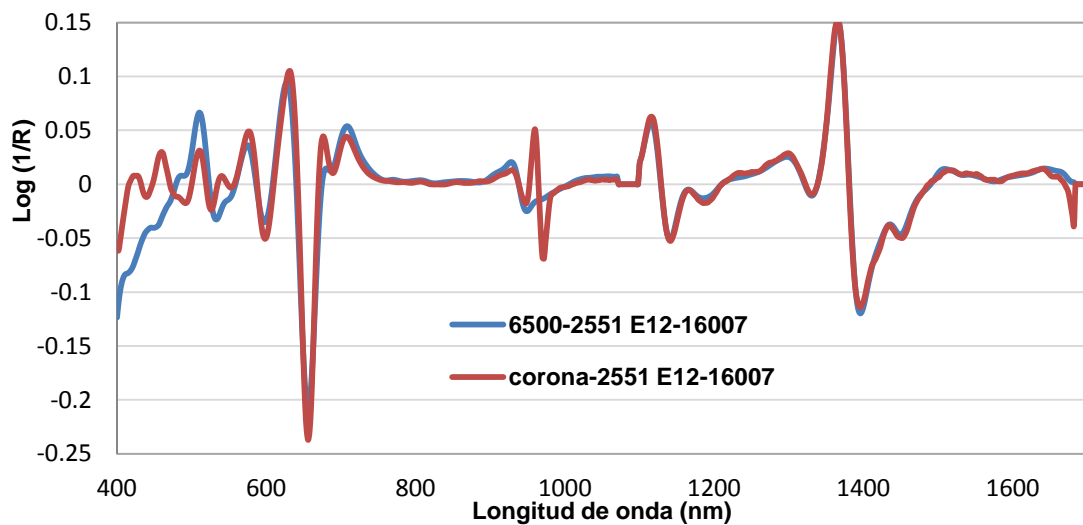


Figura I. 12: Espectro muestra 16007 en segunda derivada para 6500 y Corona (400-1700nm).

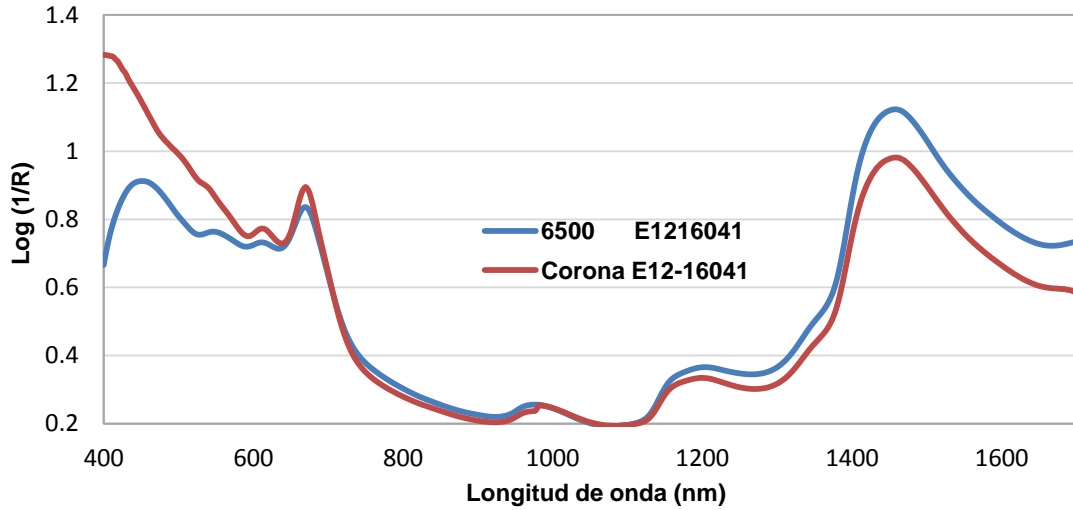


Figura I. 13: Espectro muestra 16041 sin derivar para 6500 y Corona (400-1700nm).

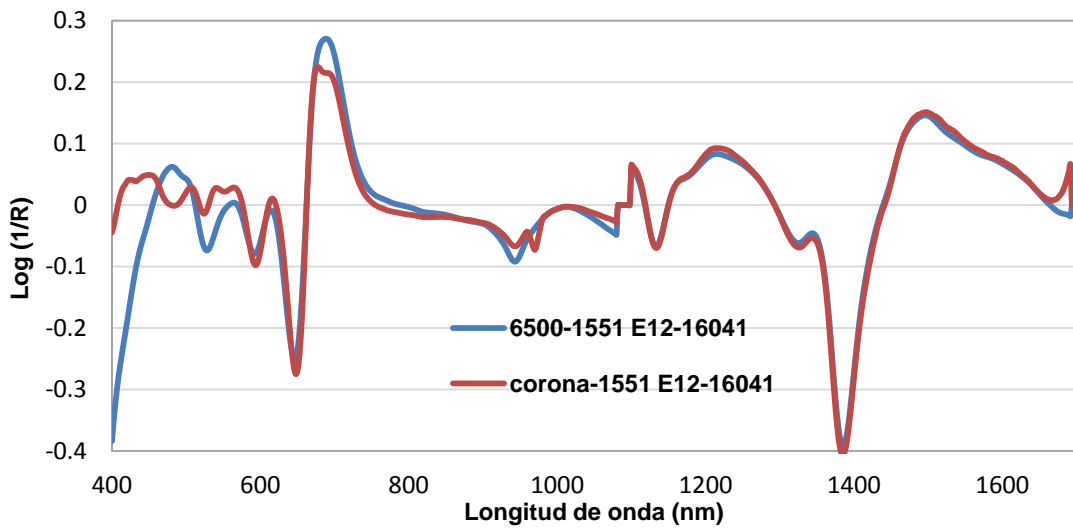


Figura I. 14: Espectro muestra 16041 en primera derivada para 6500 y Corona (400-1700nm).

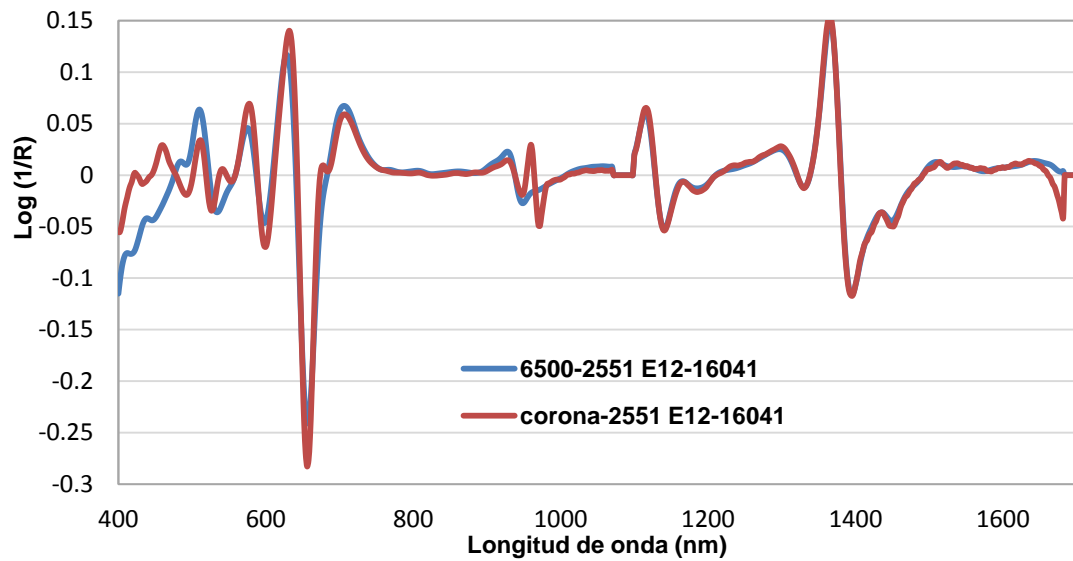


Figura I. 15: Espectro muestra 16041 en segunda derivada para 6500 y Corona (400-1700nm)

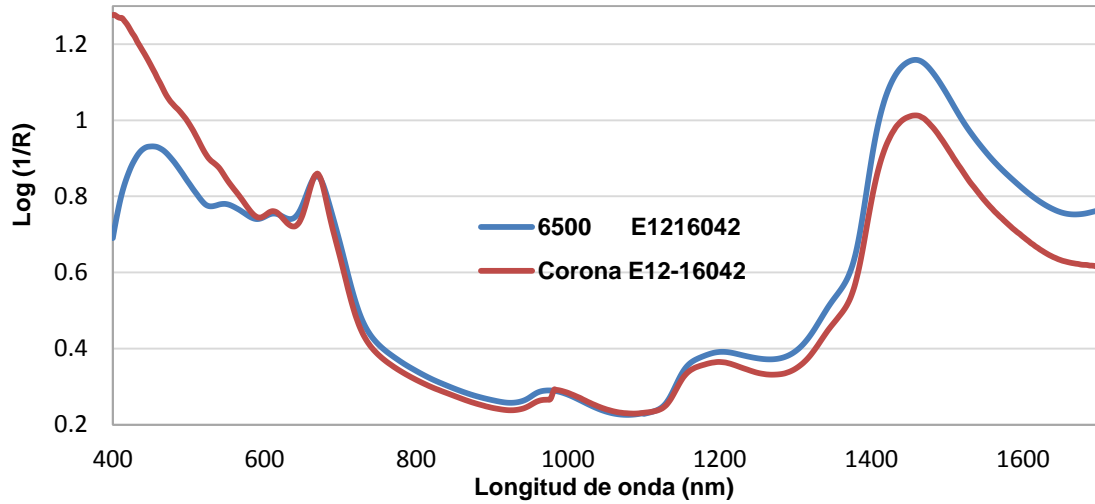


Figura I. 16: Espectro muestra 16042 sin derivar para 6500 y Corona (400-1700nm).

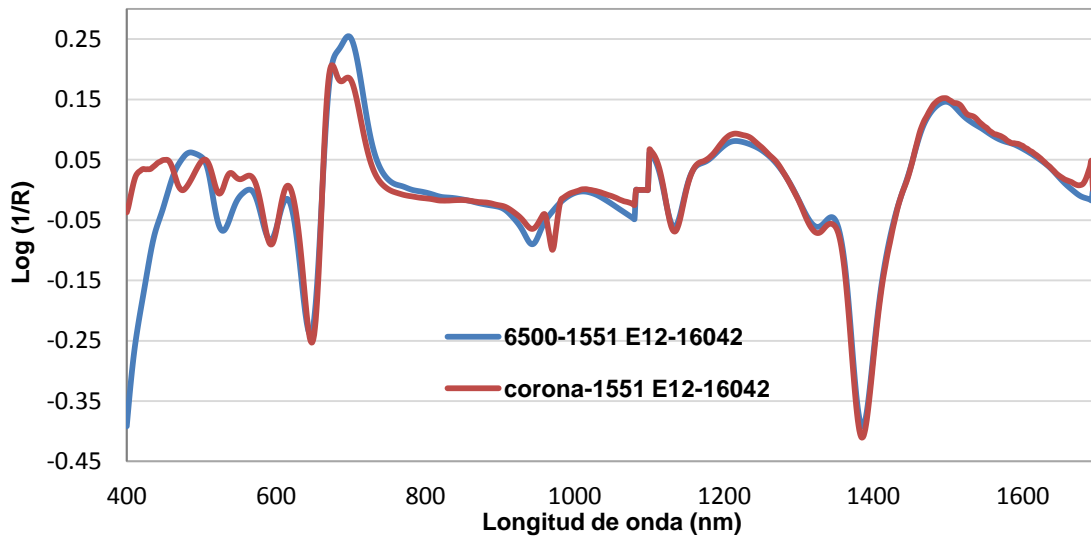


Figura I. 17 Espectro muestra 16042 en primera derivada para 6500 y Corona (400-1700nm).

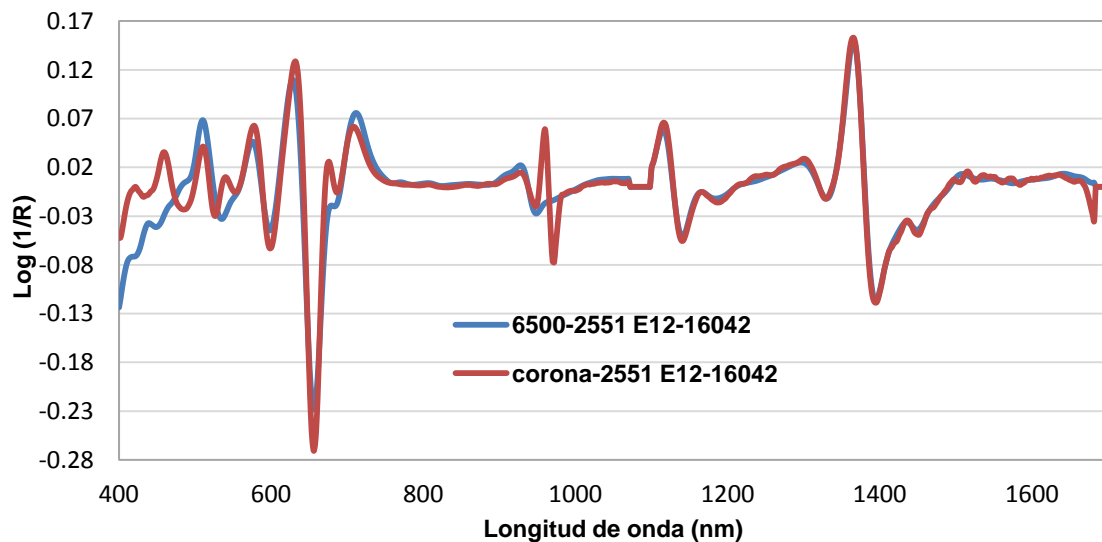


Figura I. 18: Espectro muestra 16042 en segunda derivada para 6500 y Corona (400-1700nm).

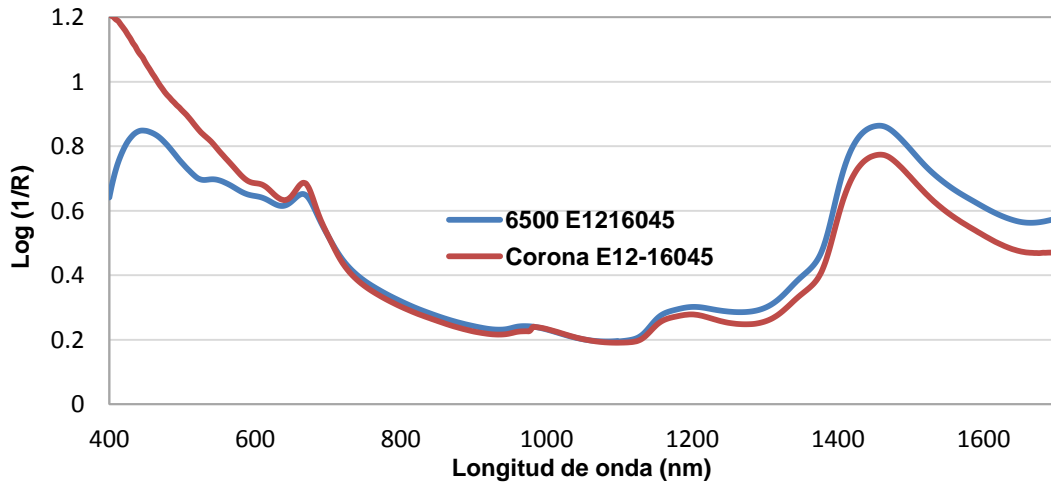


Figura I. 19: Espectro muestra 16045 sin derivar para 6500 y Corona (400-1700nm).

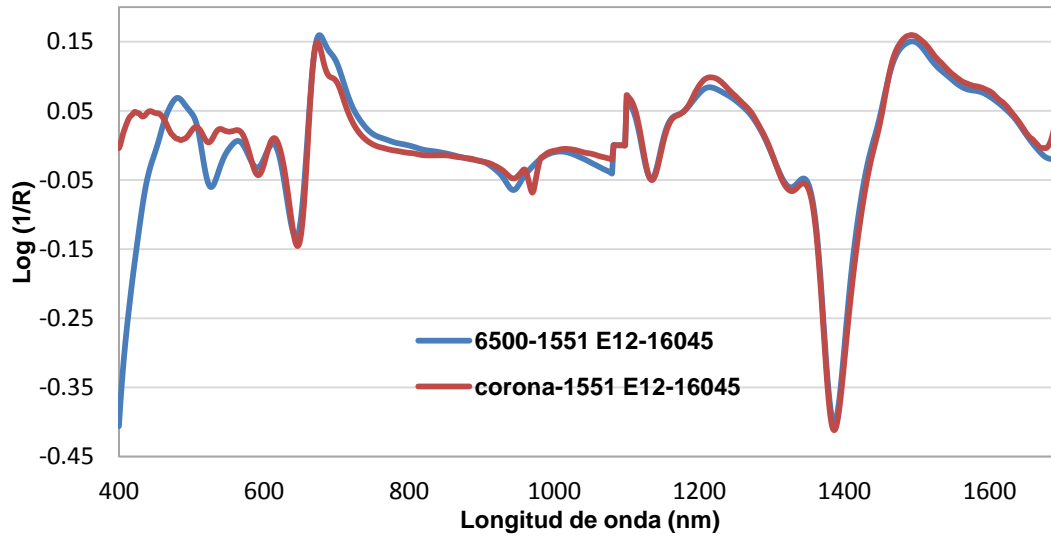


Figura I. 20: Espectro muestra 16045 en primera derivada para 6500 y Corona (400-1700nm).

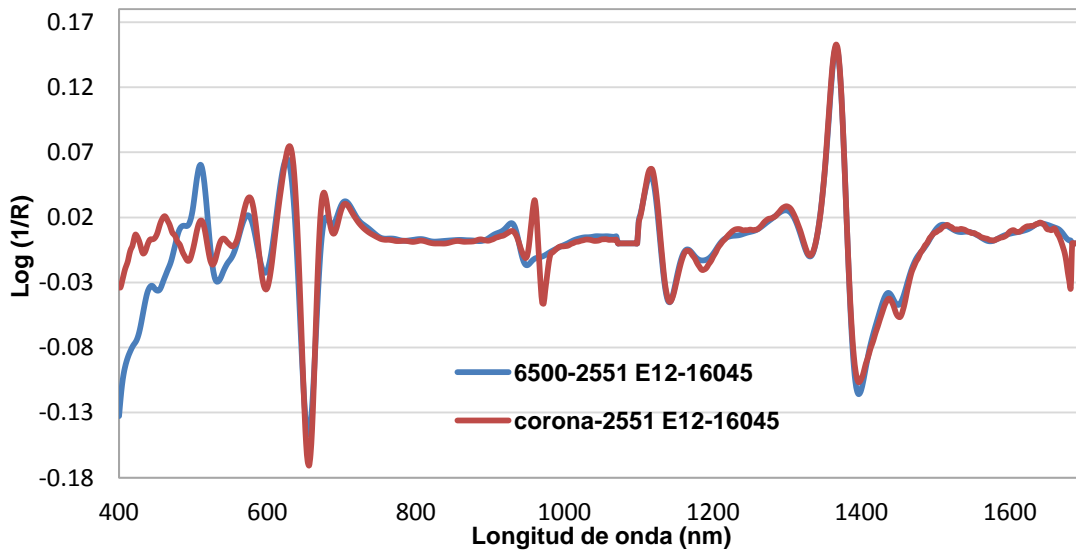


Figura I. 21: Espectro muestra 16045 en segunda derivada para 6500 y Corona (400-1700nm).

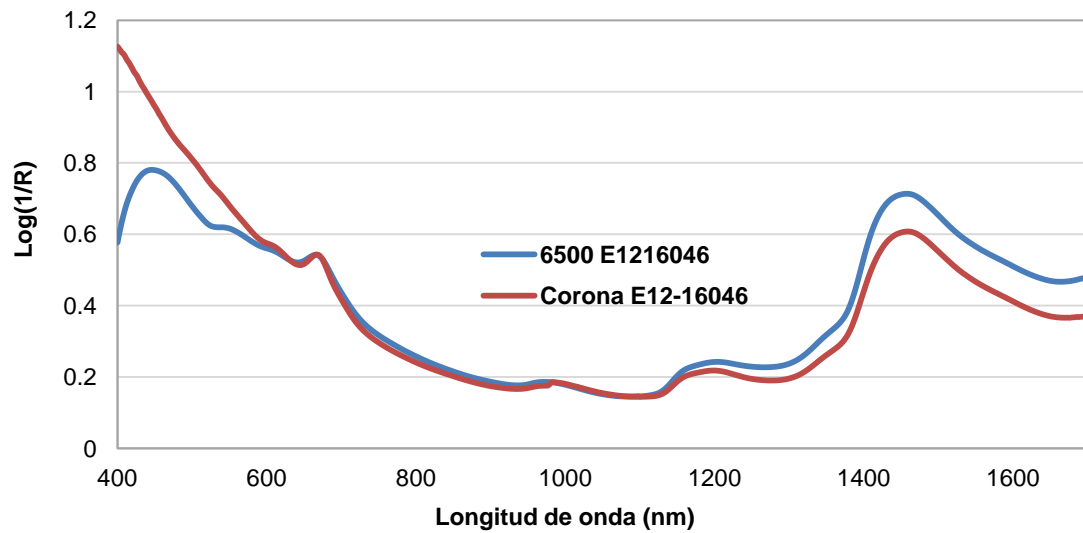


Figura I. 22: Espectro muestra 16046 sin derivar para 6500 y Corona (400-1700nm).

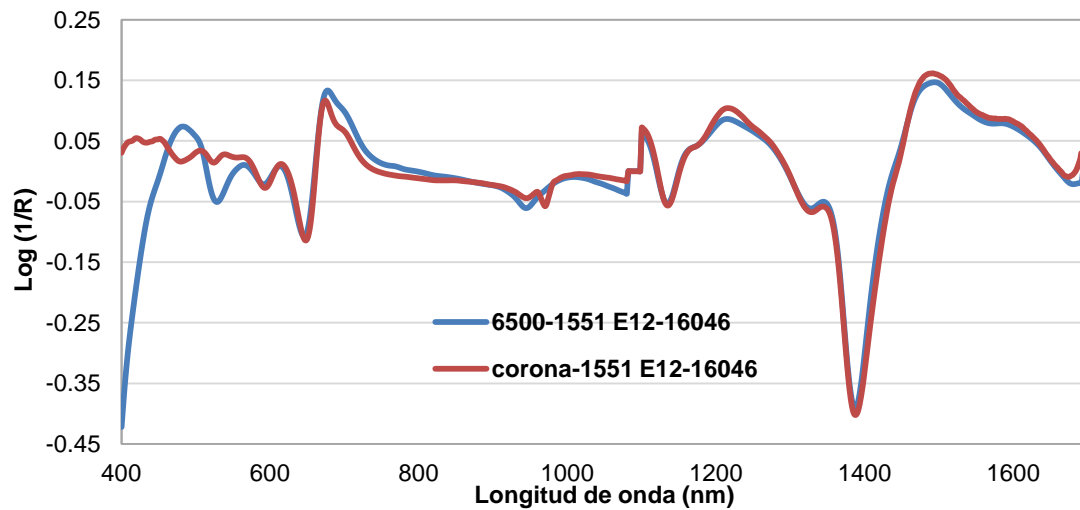


Figura I. 23: Espectro muestra 16046 primera derivada para 6500 y Corona (400-1700nm).

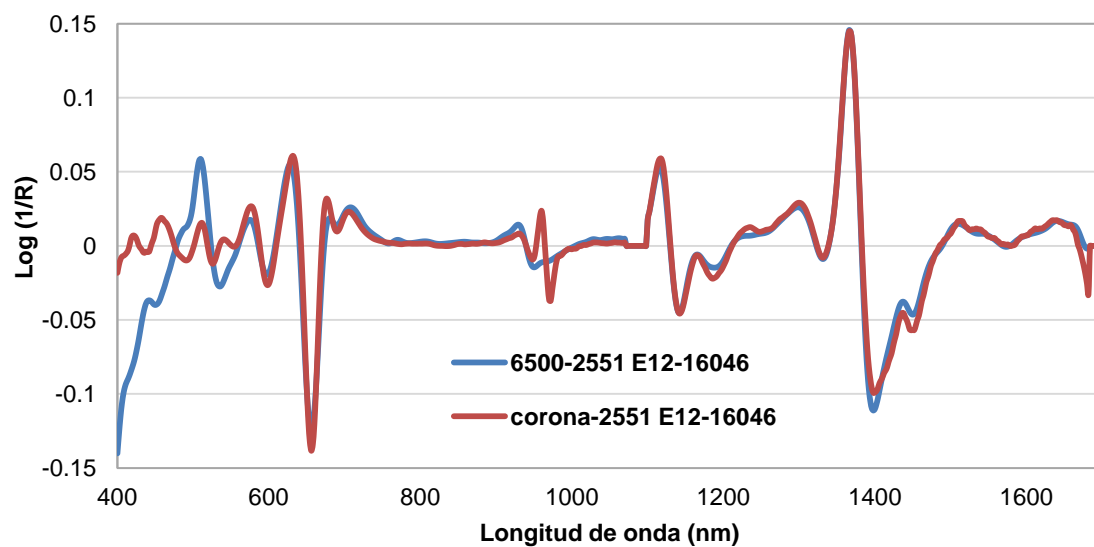


Figura I. 24: Espectro muestra 16046 en segunda derivada para 6500 y Corona (400-1700nm).



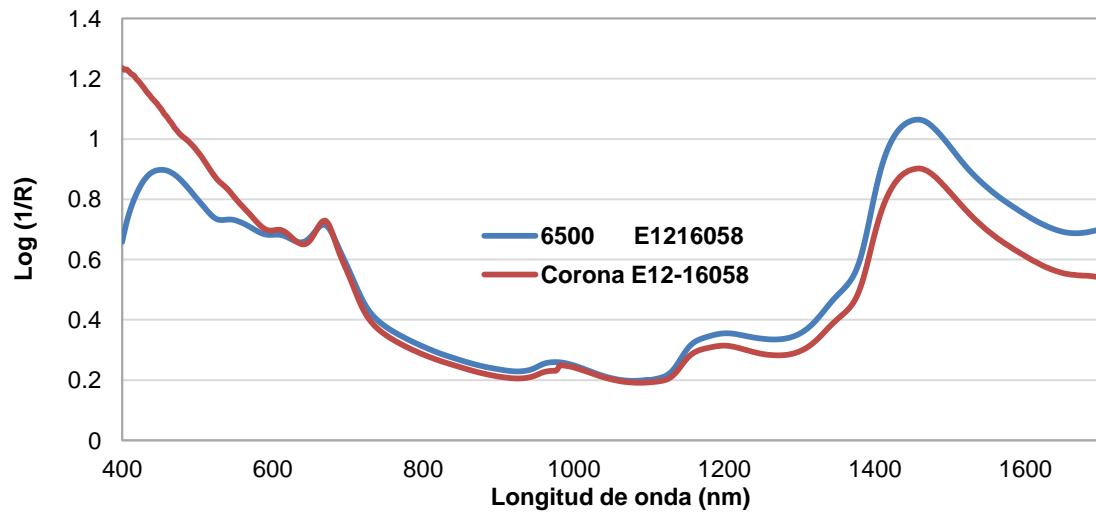


Figura I. 25: Espectro muestra 16058 sin derivar para 6500 y Corona (400-1700nm).

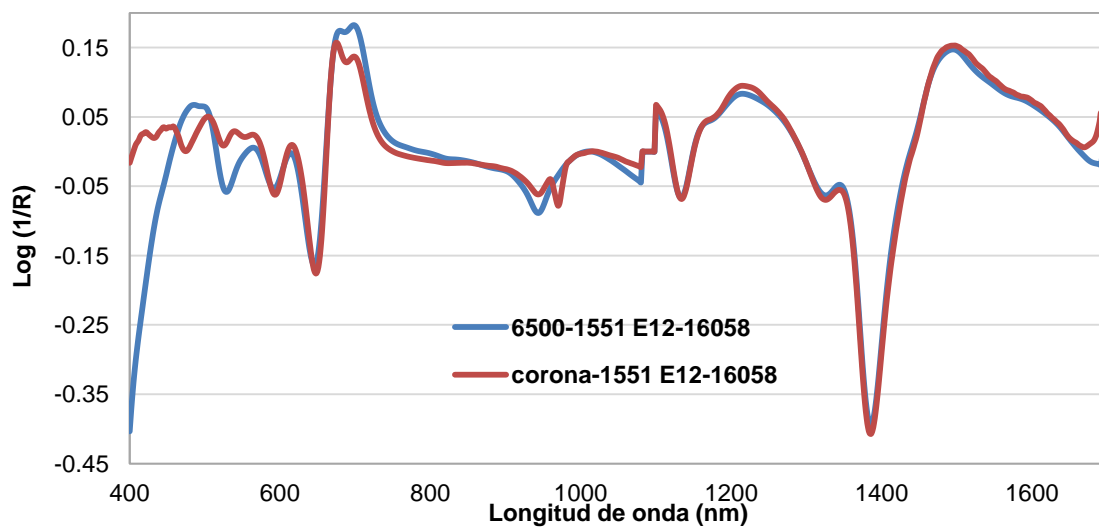


Figura I. 26: Espectro muestra 16058 en primera derivada para 6500 y Corona (400-1700nm).

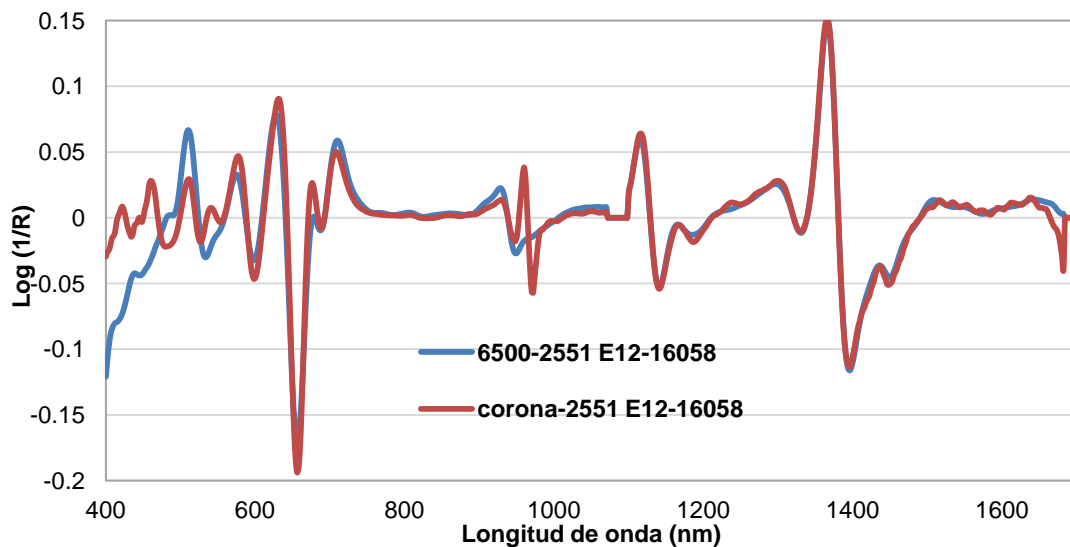


Figura I. 27: Espectro muestra 16058 en segunda derivada para 6500 y Corona (400-1700nm).

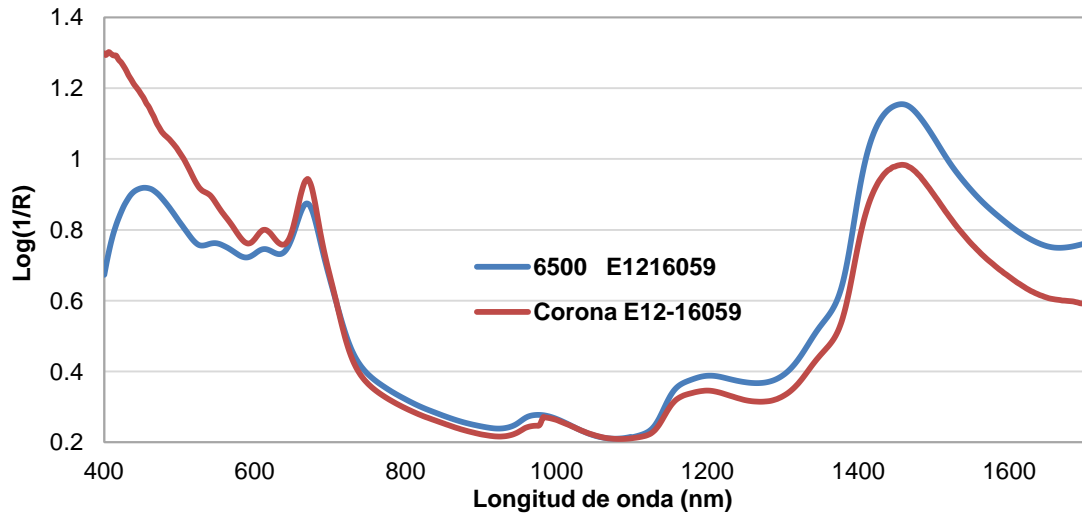


Figura I. 28: Espectro muestra 16059 sin derivar para 6500 y Corona (400-1700nm).

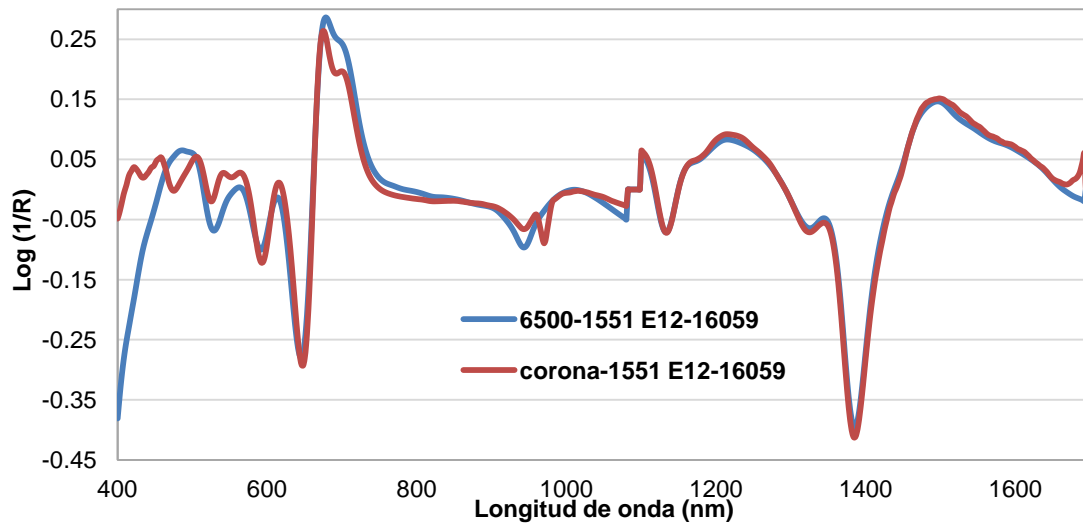


Figura I. 29: Espectro muestra 16059 en primera derivada para 6500 y Corona (400-1700nm).

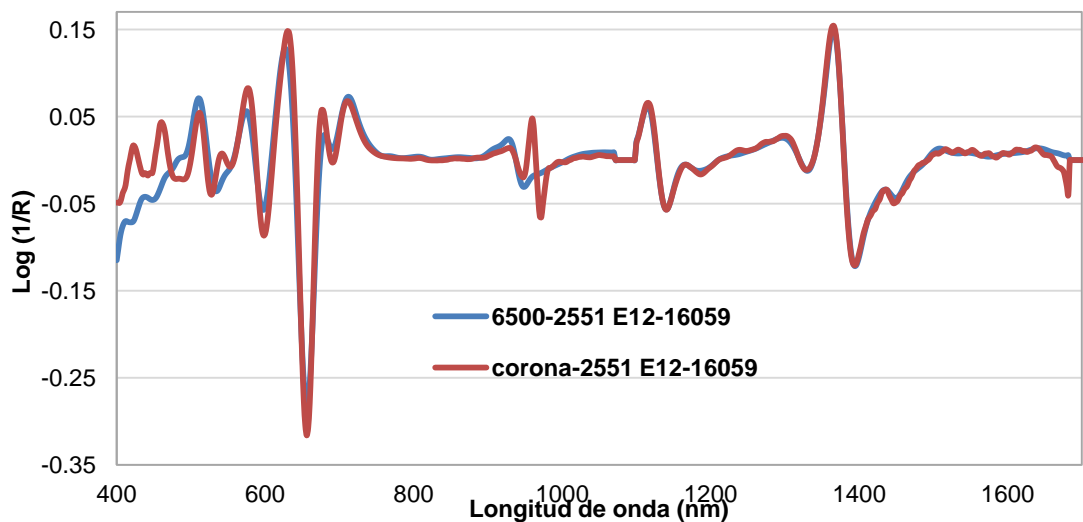
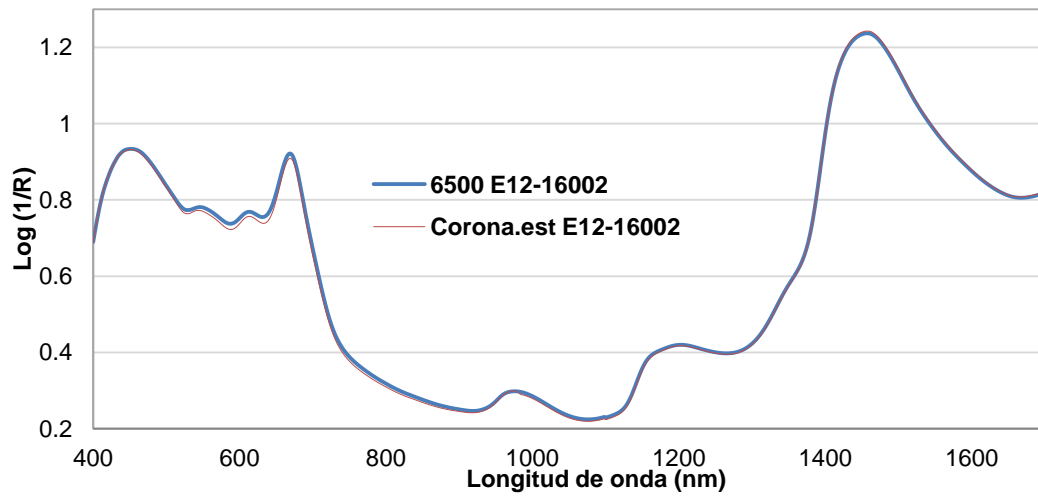
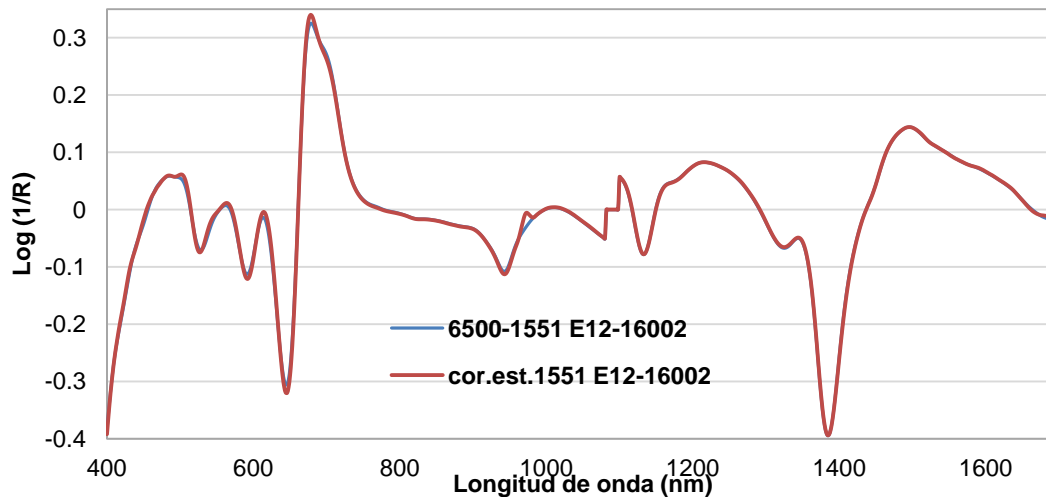
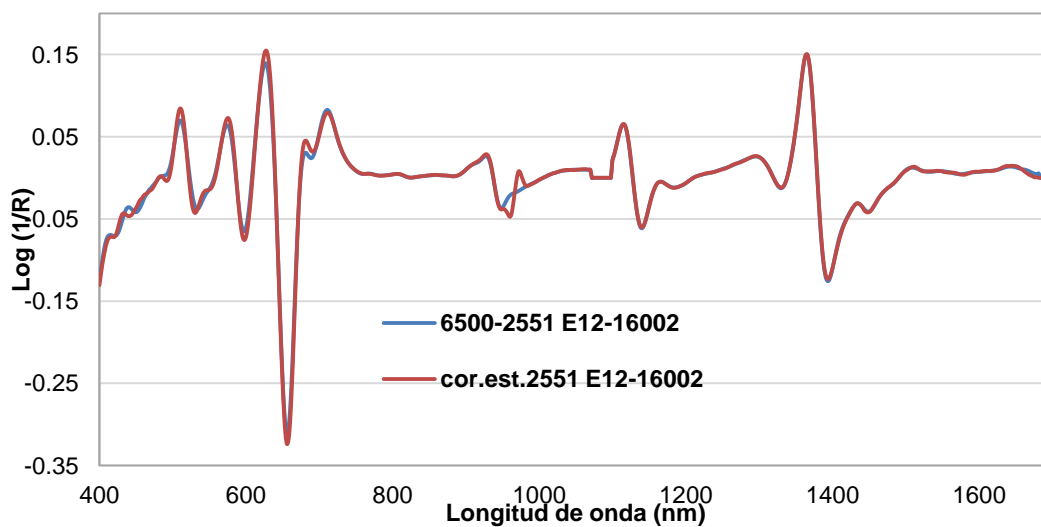


Figura I. 30: Espectro muestra 16059 en segunda derivada para 6500 y Corona (400-1700nm)

**ANEXO II: ESPECTROS MUESTRAS entre 6500 y CORONA ESTANDARIZADO****Figura II. 1: Espectro muestra 16002 sin derivar en 6500 y Corona estandarizado (400-1700nm).****Figura II. 2: Espectro muestra 16002 en 1ª derivada en 6500 y Corona estandarizado (400-1700nm).****Figura II. 3: Espectro muestra 16002 en 2ª derivada en 6500 y Corona estandarizado (400-1700nm).**

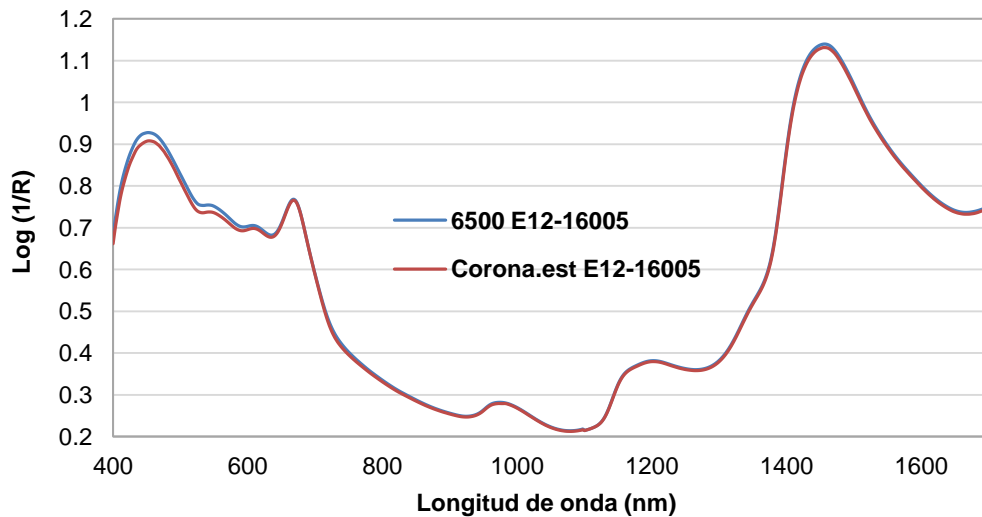


Figura II. 4: Espectro muestra 16005 sin derivar en 6500 y Corona estandarizado (400-1700nm).

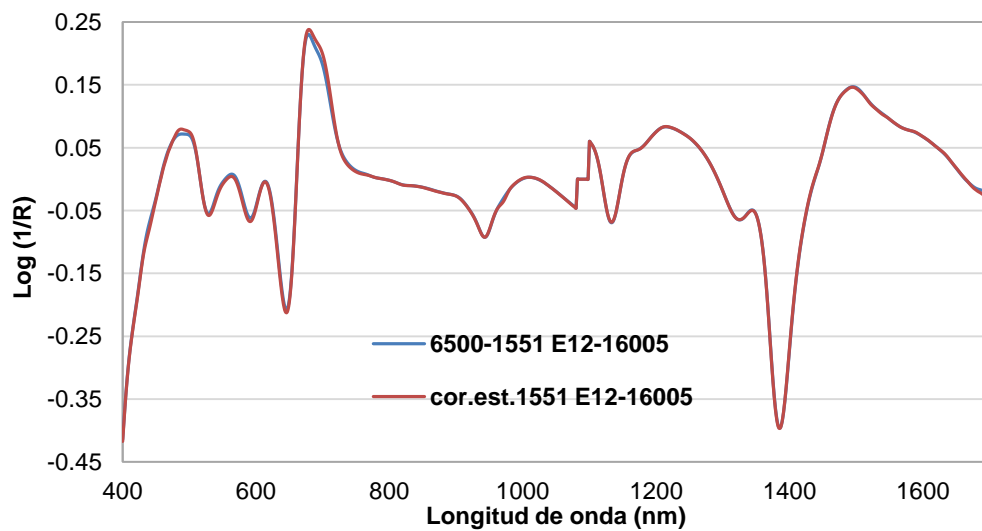


Figura II. 5: Espectro muestra 16005 en 1ª derivada en 6500 y Corona estandarizado (400-1700nm).

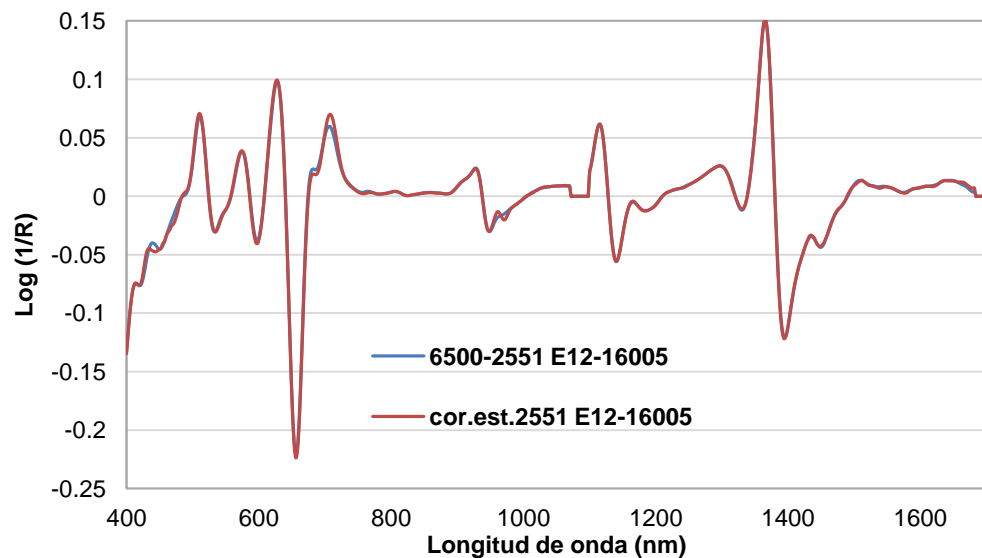


Figura II. 6: Espectro muestra 16005 en 2ª derivada en 6500 y Corona estandarizado (400-1700nm).

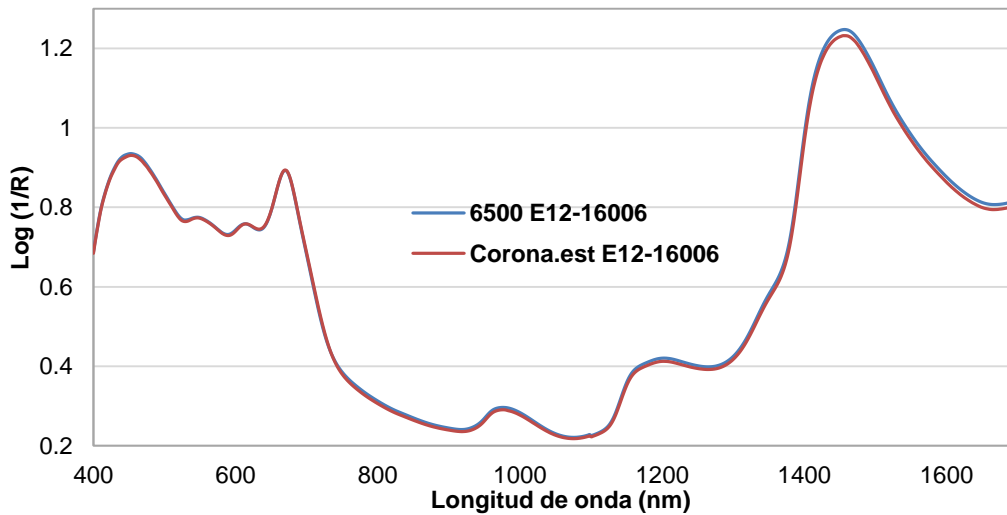


Figura II. 7: Espectro muestra 16006 sin derivar en 6500 y Corona estandarizado (400-1700nm).

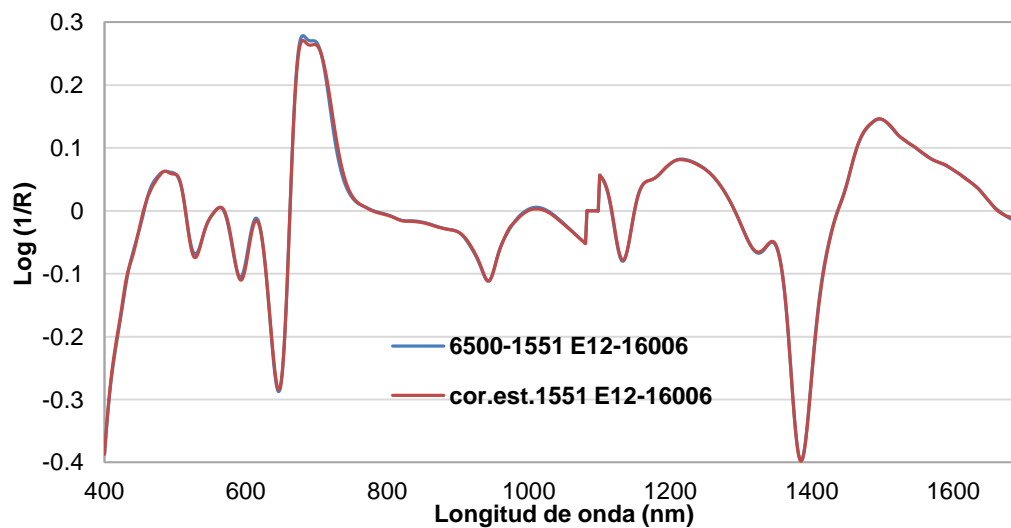


Figura II. 8: Espectro muestra 16006 en 1ª derivada en 6500 y Corona estandarizado (400-1700nm).

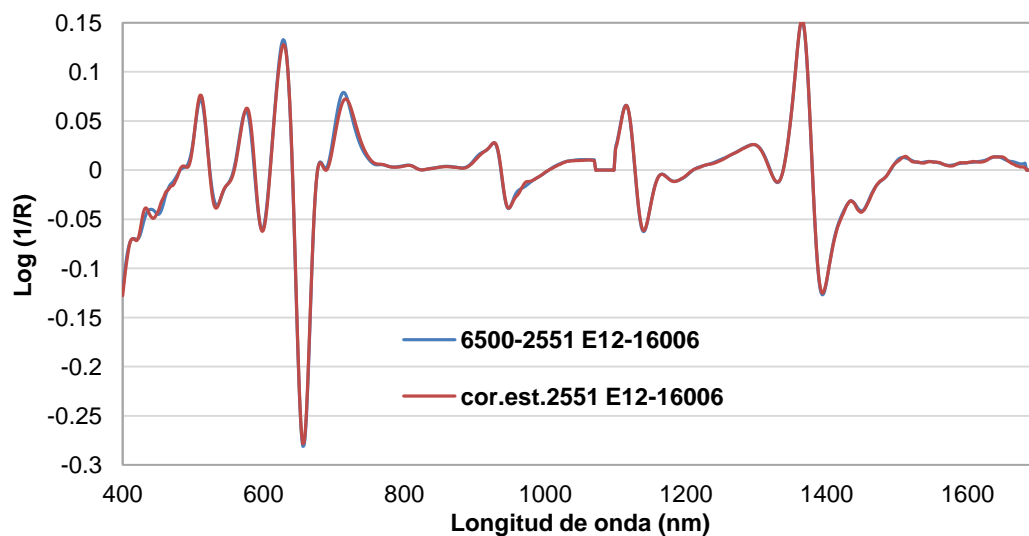


Figura II. 9: Espectro muestra 16006 en 2ª derivada en 6500 y Corona estandarizado (400-1700nm).

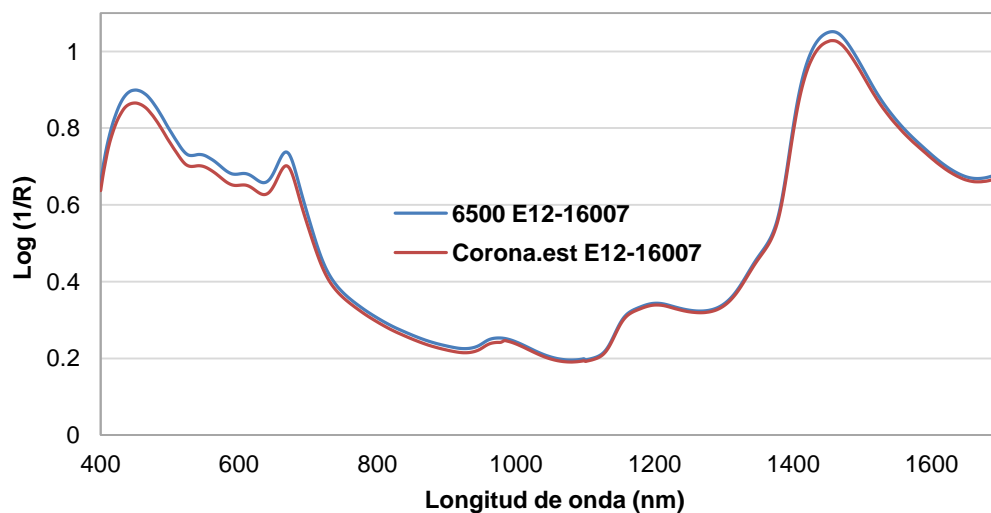


Figura II. 10: Espectro muestra 16007 sin derivar en 6500 y Corona estandarizado (400-1700nm).

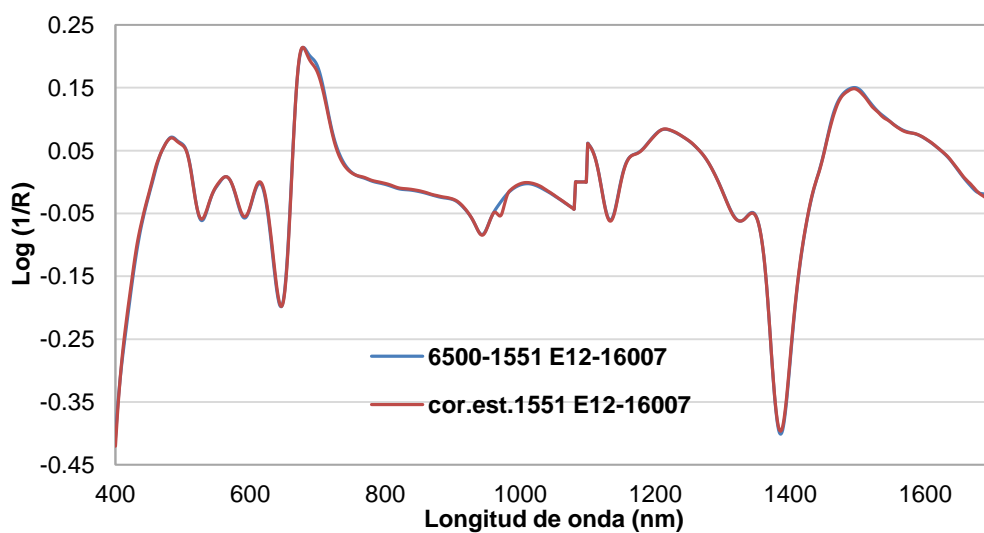


Figura II. 11: Espectro muestra 16007 en 1ª derivada en 6500 y Corona estandarizado (400-1700nm).

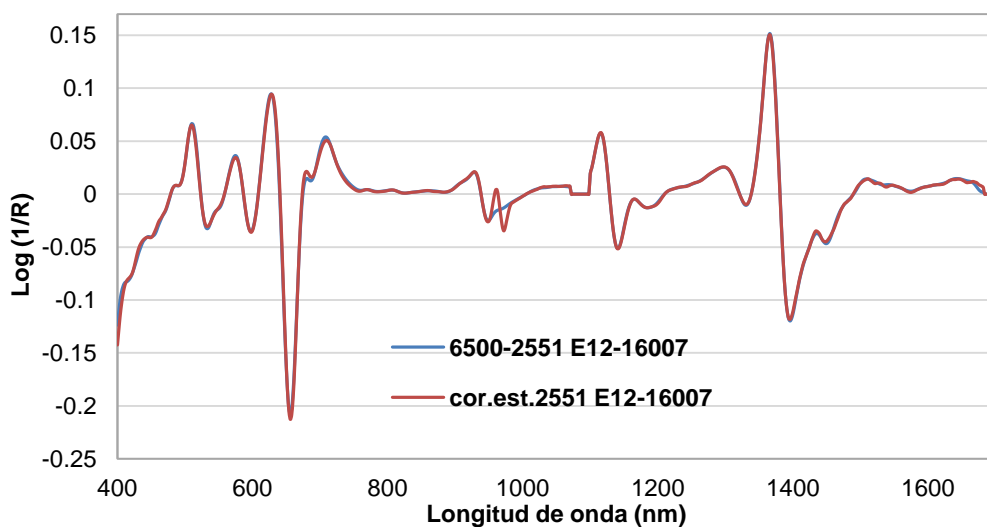


Figura II. 12: Espectro muestra 16007 en 2ª derivada en 6500 y Corona estandarizado (400-1700nm).

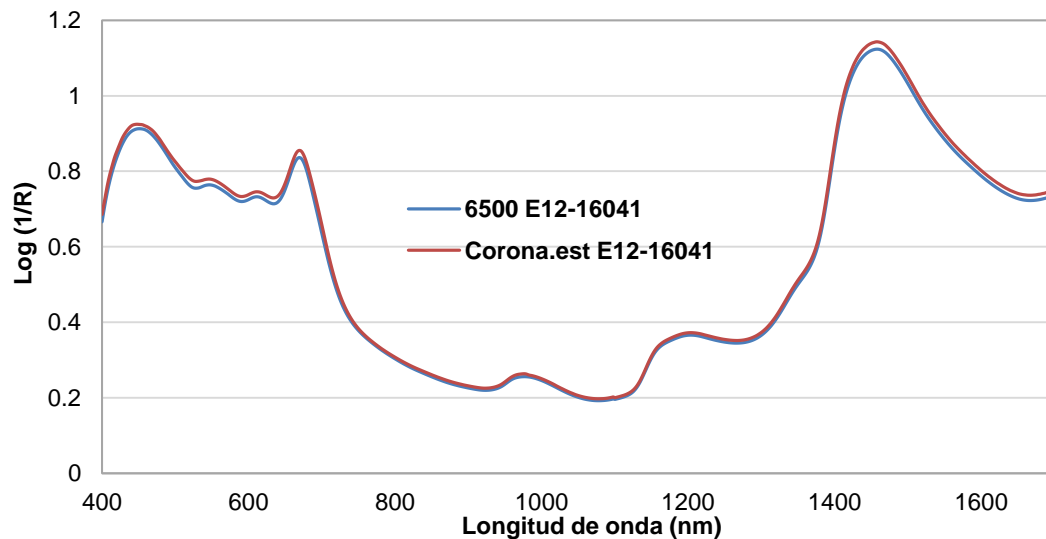


Figura II. 13: Espectro muestra 16041 sin derivar en 6500 y Corona estandarizado (400-1700nm).

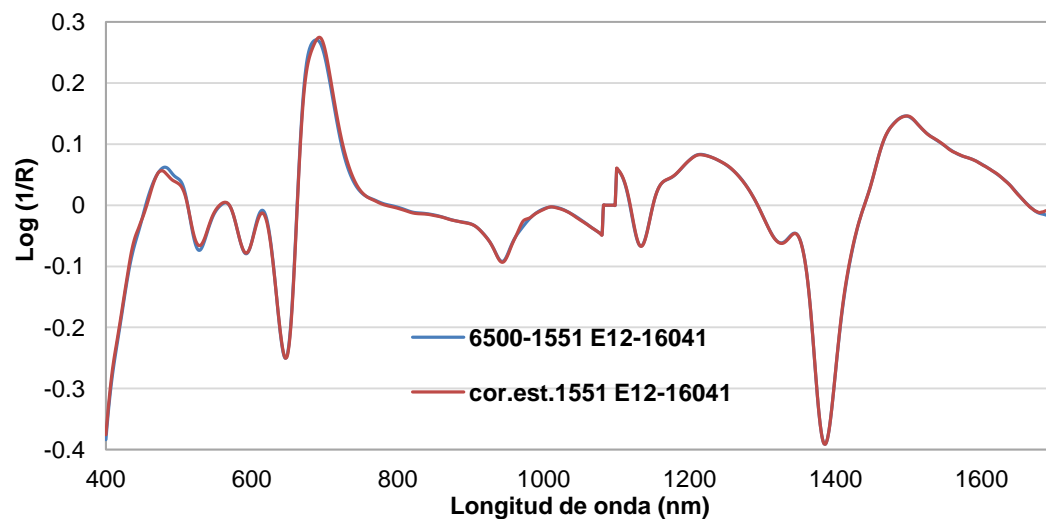


Figura II. 14: Espectro muestra 16041 en 1ª derivada en 6500 y Corona estandarizado (400-1700nm).

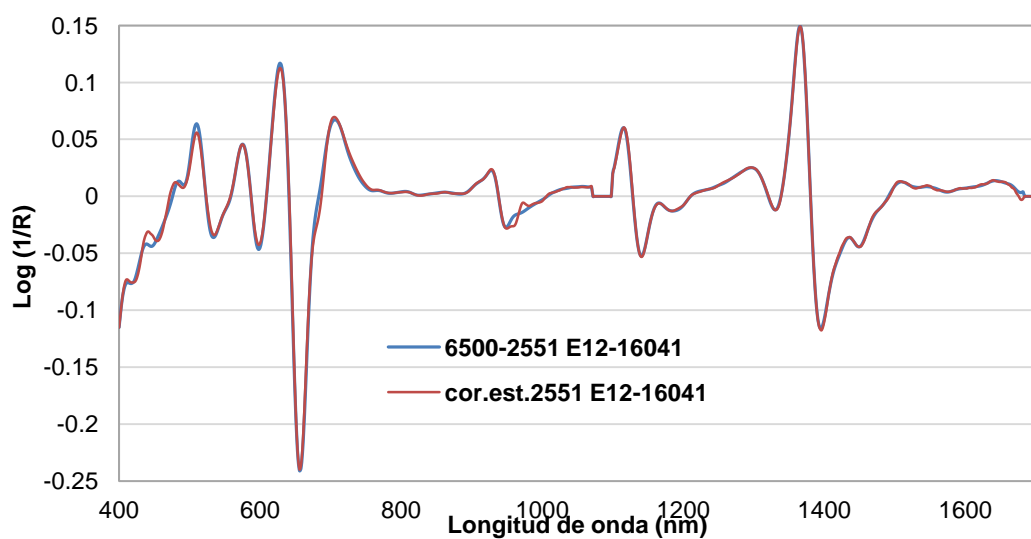


Figura II. 15: Espectro muestra 16041 en 2ª derivada en 6500 y Corona estandarizado (400-1700nm).

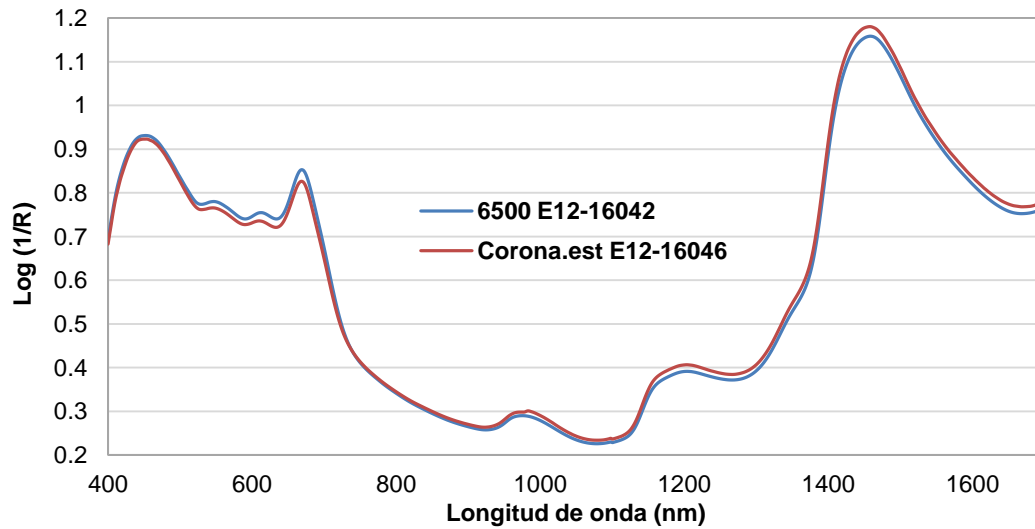


Figura II. 16: Espectro muestra 16042 sin derivar en 6500 y Corona estandarizado (400-1700nm).

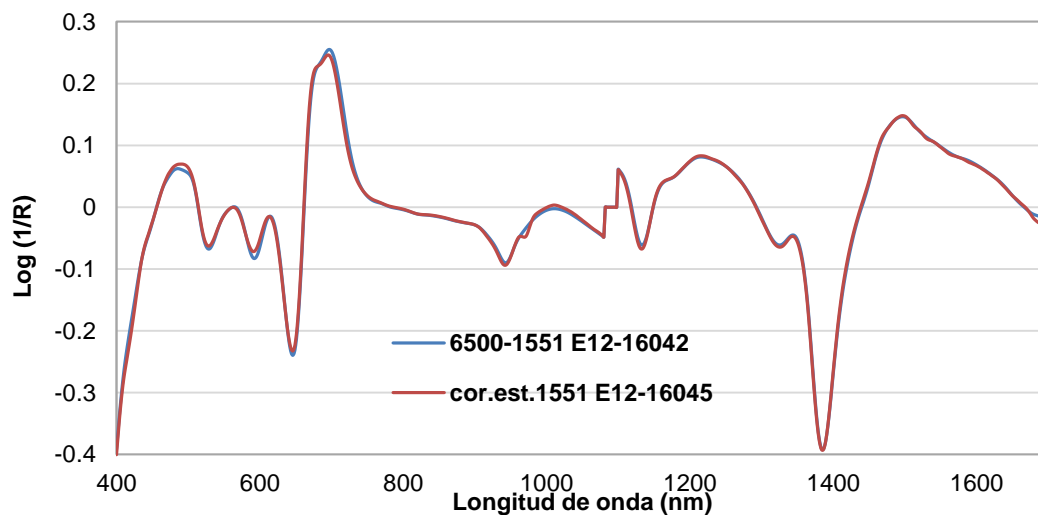


Figura II. 17: Espectro muestra 16042 en 1ª derivada en 6500 y Corona estandarizado (400-1700nm).

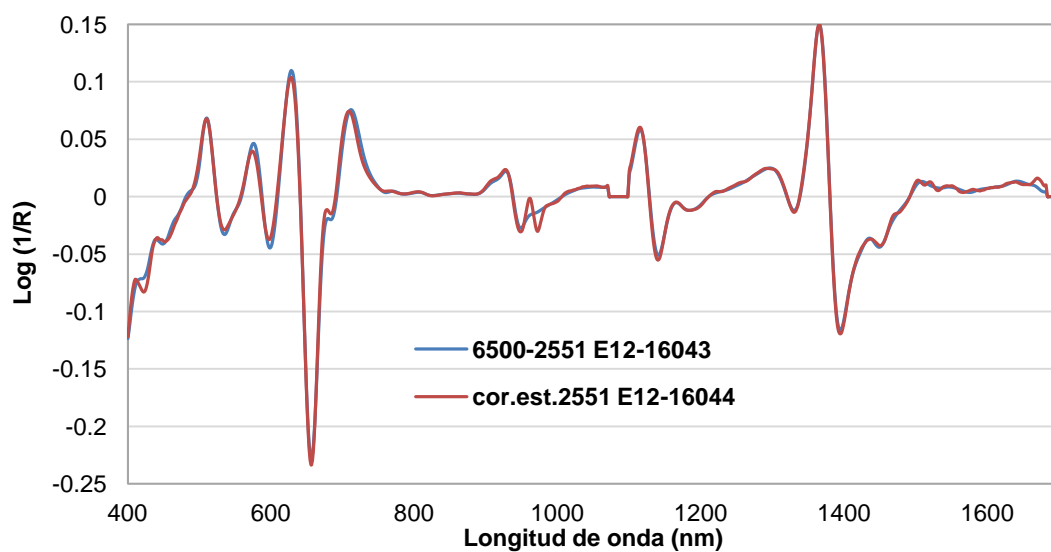


Figura II. 18: Espectro muestra 16042 en 2ª derivada en 6500 y Corona estandarizado (400-1700nm).



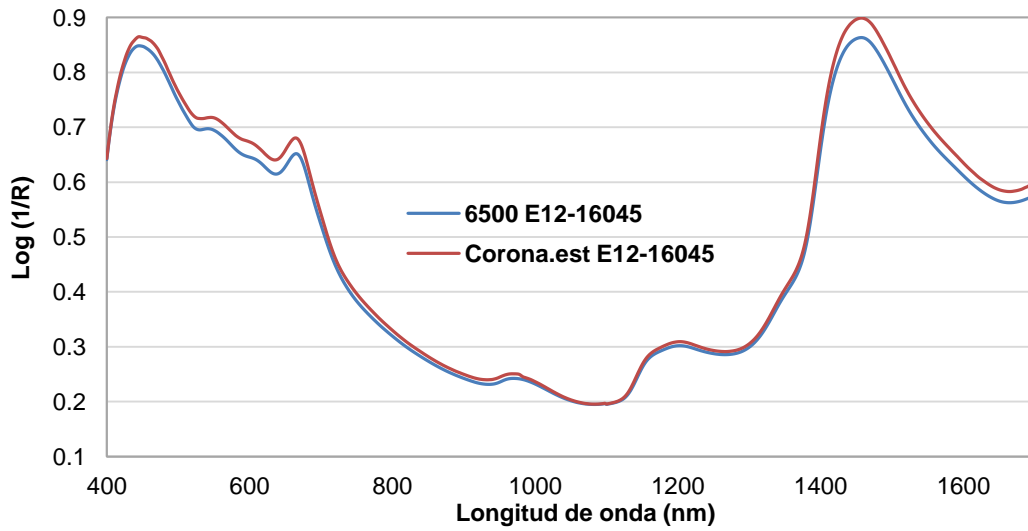


Figura II. 19: Espectro muestra 16045 sin derivar en 6500 y Corona estandarizado (400-1700nm).

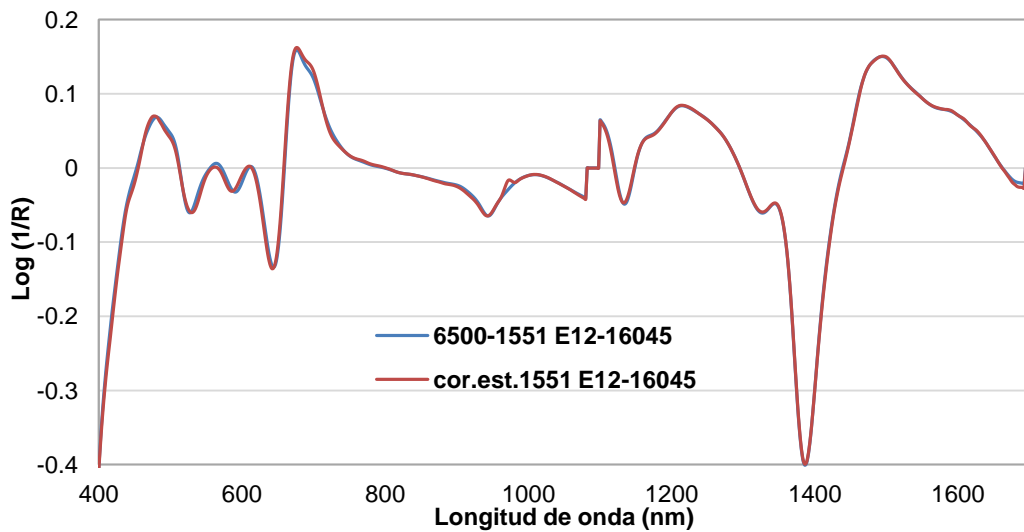


Figura II. 20: Espectro muestra 16045 en 1ª derivada en 6500 y Corona estandarizado (400-1700nm).

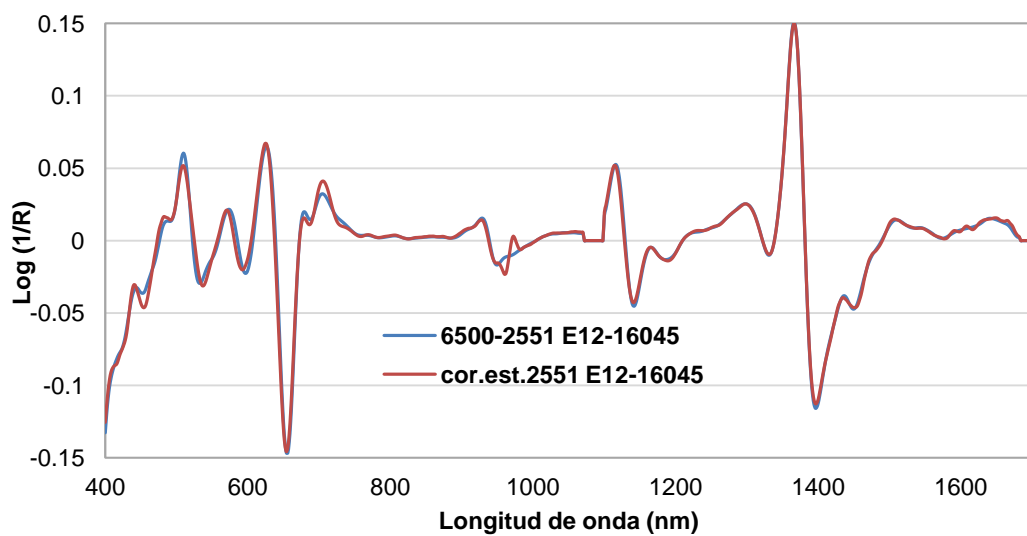


Figura II. 21: Espectro muestra 16045 en 2ª derivada en 6500 y Corona estandarizado (400-1700nm).

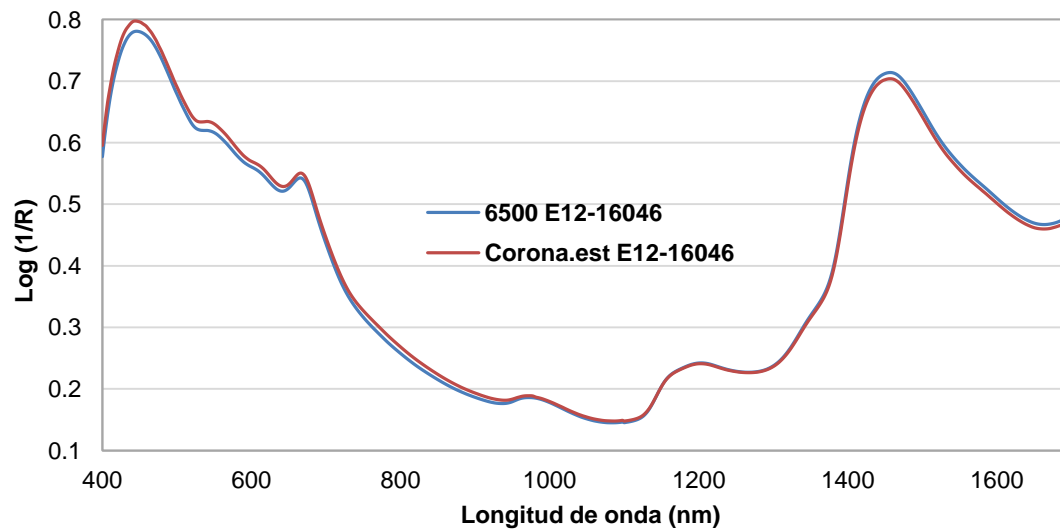


Figura II. 22: Espectro muestra 16046 sin derivar en 6500 y Corona estandarizado (400-1700nm).

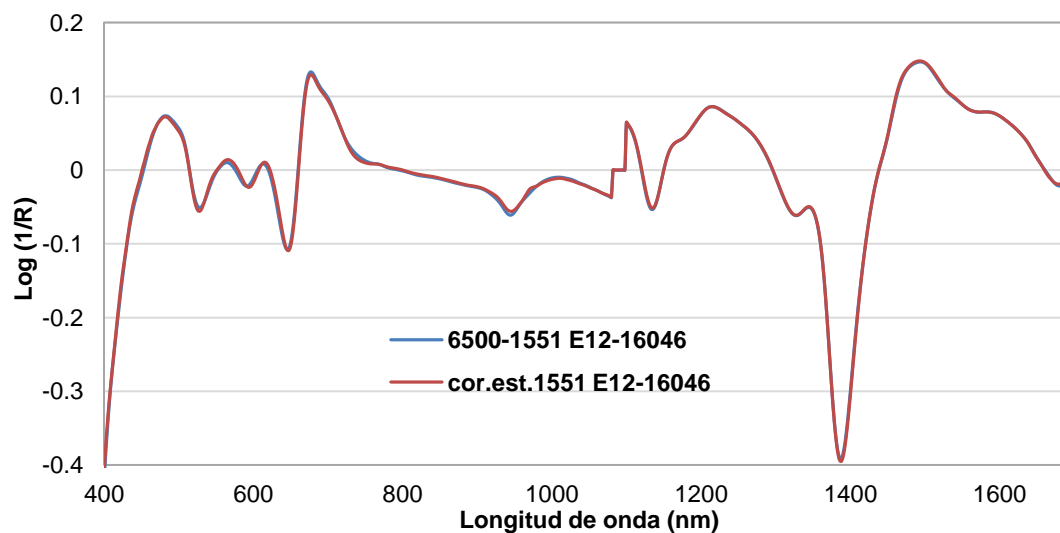


Figura II. 23: Espectro muestra 16046 en 1ª derivada en 6500 y Corona estandarizado (400-1700nm).

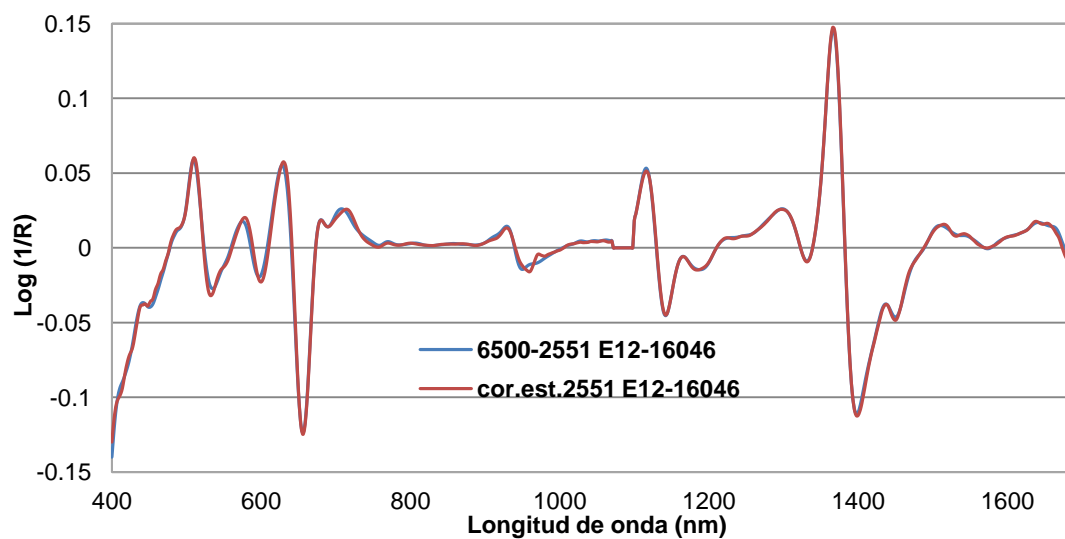


Figura II. 24: Espectro muestra 16046 en 2ª derivada en 6500 y Corona estandarizado (400-1700nm).

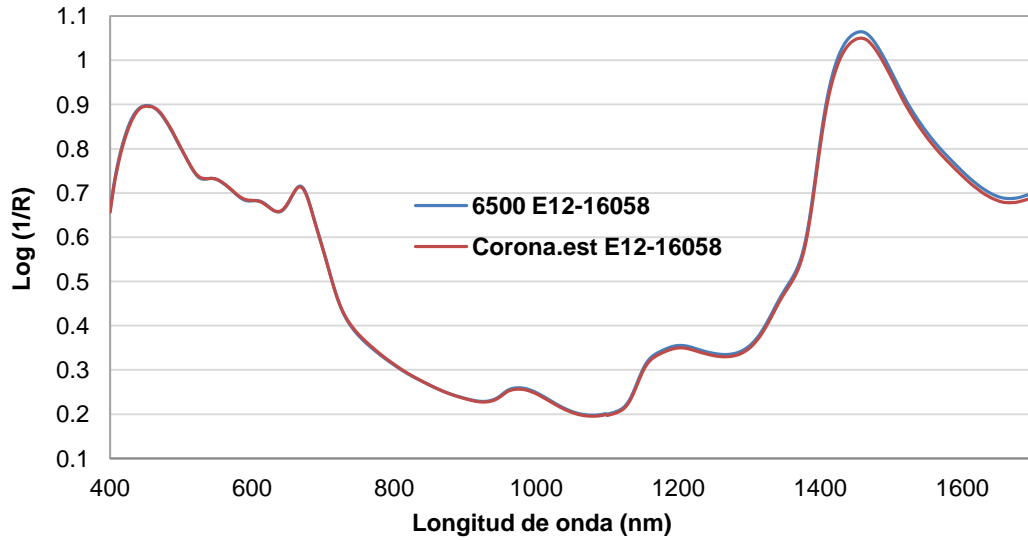


Figura II. 25: Espectro muestra 16058 sin derivar en 6500 y Corona estandarizado (400-1700nm).

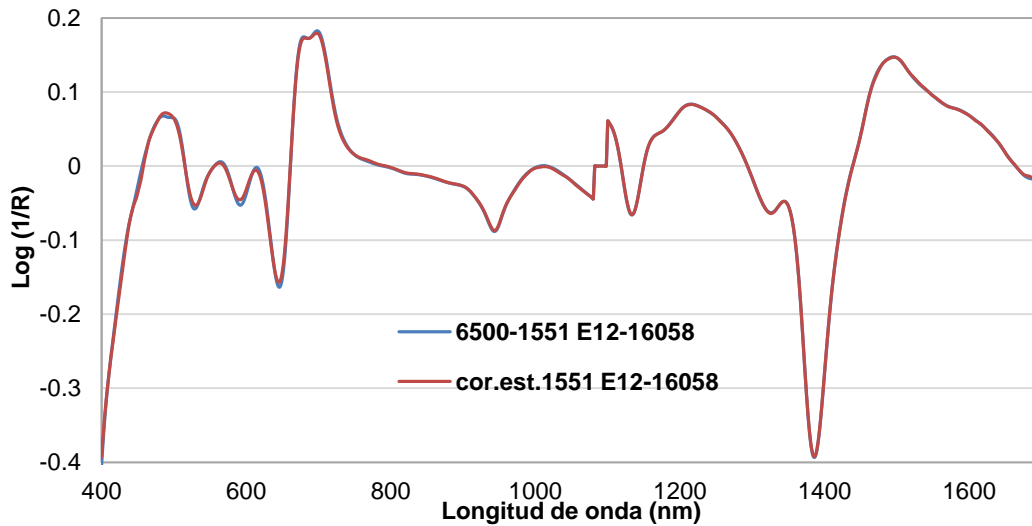


Figura II. 26: Espectro muestra 16058 en 1ª derivada en 6500 y Corona estandarizado (400-1700nm).

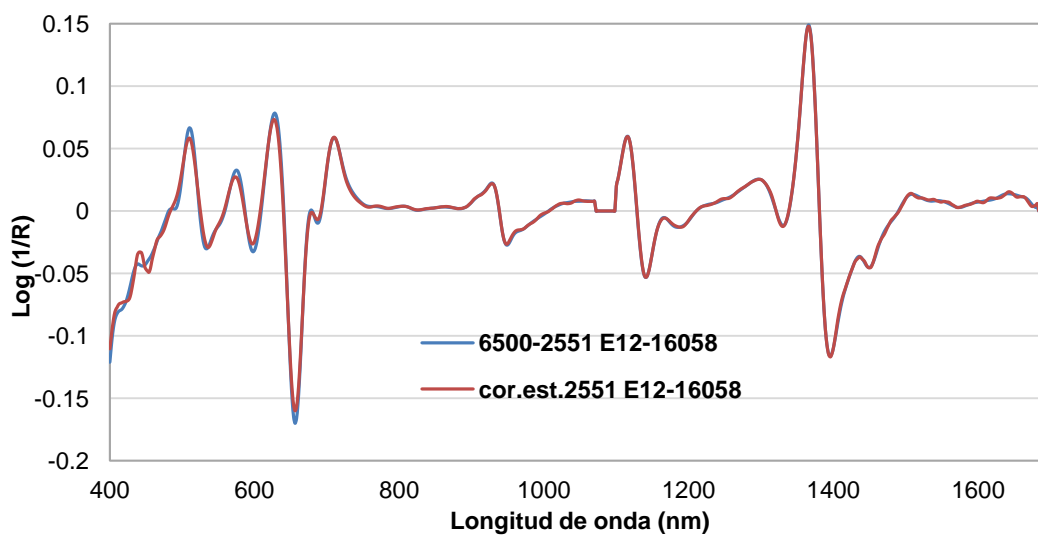


Figura II. 27: Espectro muestra 16058 en 2ª derivada en 6500 y Corona estandarizado (400-1700nm).

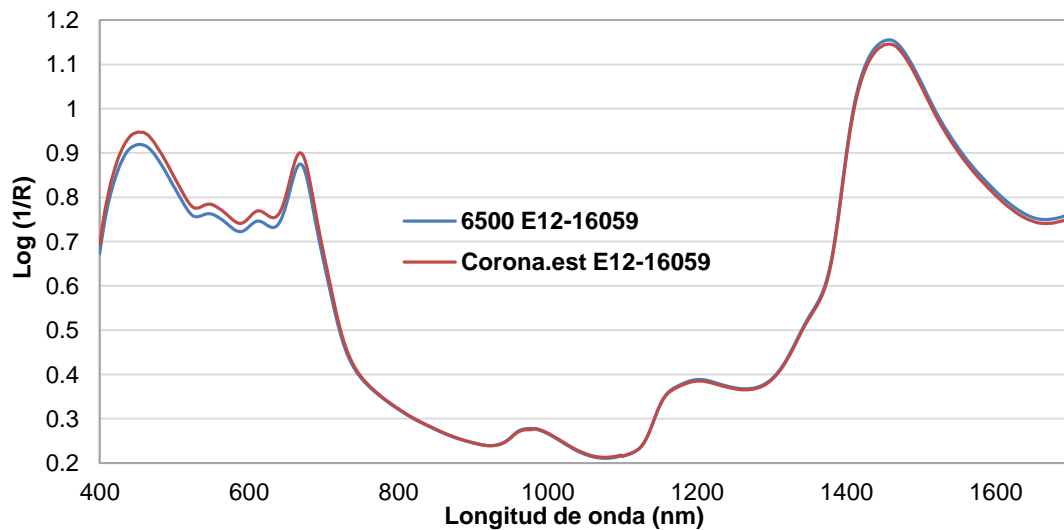


Figura II. 28: Espectro muestra 16059 sin derivar en 6500 y Corona estandarizado (400-1700nm).

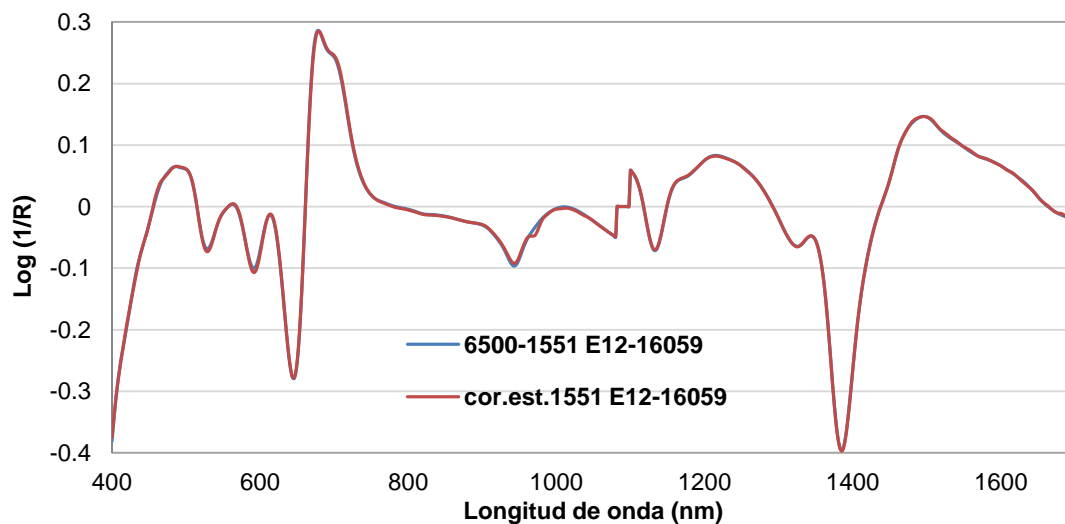


Figura II. 29: Espectro muestra 16059 en 1ª derivada en 6500 y Corona estandarizado (400-1700nm)

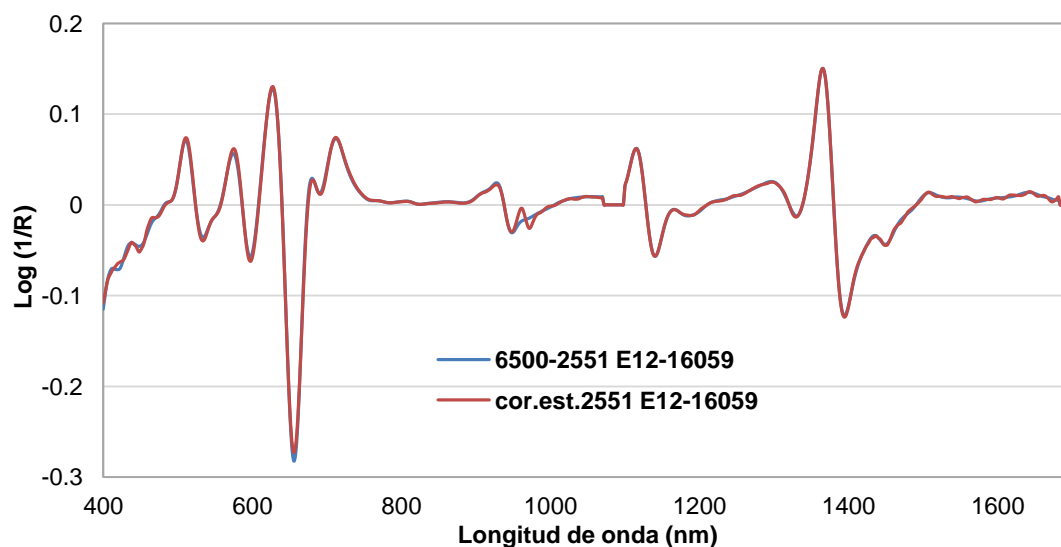


Figura II. 30: Espectro muestra 16059 en 2ª derivada en 6500 y Corona estandarizado (400-1700nm).

