

Universidad Pública de Navarra

Nafarroako Unibertsitate Publikoa

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS AGRÓNOMOS**

***NEKAZARITZAKO INGENIARIEN
GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKOA***

**DETERMINACIONES CUANTITATIVAS
DE LA COMPOSICIÓN DE YOGURES
POR TECNOLOGÍA NIRS**

presentado por

MERITXELL GAGO JANSÀ *k*

aurkeztua

**MÁSTER EN TECNOLOGÍA Y CALIDAD DE LAS
INDUSTRIAS AGROALIMENTARIAS**

***NEKAZAL ELIKAGAI INDUSTRIEN TEKNOLOGIA ETA
KALITATEKO MASTERRA***

Septiembre, 2011 / *2011-ko, Iraila*

Resumen

El presente Trabajo Fin de Máster versa sobre la tecnología NIRS y su utilidad en la determinación de los principales constituyentes químicos del yogur; es decir, proteínas, grasas, hidratos de carbono, minerales y vitaminas.

Este trabajo consta de dos partes bien diferenciadas:

- La primera parte es teórica y se expone un acercamiento a la espectroscopia NIR con las aplicaciones que ha tenido en la industria alimentaria, en concreto en los derivados lácteos y sobre todo en el yogur.
- La segunda parte consiste en el ensayo de investigación llevado a cabo sobre 141 muestras de distintos yogures. A partir de sus espectros de reflectancia y, tomando como referencia los valores nutricionales que aparecen en el etiquetado de los yogures, se hace un análisis estadístico mediante regresión lineal con el objeto de definir un modelo de calibración. Con estos modelos se predecirá el contenido en un determinado componente químico a través del espectro de reflectancia de la muestra. Por ello deben ser modelos robustos y precisos. Los modelos obtenidos en este estudio para los diferentes componentes químicos han sido satisfactorios; aunque el hecho de partir de diferentes marcas comerciales de yogur crea posibles discrepancias entre lo que aparece en el etiquetado y el valor real de los componentes químicos ya que seguramente se utilizan para la medida técnicas y métodos distintos. Por este motivo, se repite el estudio sólo con las muestras de una marca comercial. Los modelos que se obtienen son mejores que los resultantes del experimento con todas las marcas.

Mediante este estudio se demuestra la validez de la tecnología NIRS como método de análisis rápido y eficaz del contenido nutricional de los yogures.

Índice

CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN GENERAL	4
1.1 INTRODUCCIÓN.....	4
1.2 ANTECEDENTES.....	5
1.3 OBJETO DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER.....	6
CAPÍTULO 2 ESPECTROSCOPIA NIR	7
2.1 INTRODUCCIÓN.....	7
2.2 FUNDAMENTOS.....	9
2.3 INSTRUMENTACIÓN.....	14
2.4 QUIMIOMETRÍA Y TRATAMIENTO DE LOS DATOS ESPECTRALES.....	16
2.5 APLICACIONES DEL NIR EN LA INDUSTRIA AGROALIMENTARIA.....	18
2.5.1 Leche y derivados lácteos.....	18
2.5.2 Yogures.....	22
CAPÍTULO 3 MATERIAL Y MÉTODOS	23
3.1 MUESTRAS DE YOGUR.....	23
3.2 ANÁLISIS NIR Y PROCESADO DE LOS ESPECTROS DE REFLECTANCIA.....	24
3.3 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	26
CAPÍTULO 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
4.1 INTRODUCCIÓN.....	28
4.2 PROTEÍNAS.....	29
4.3 HIDRATOS DE CARBONO.....	31
4.3.1 Azúcares.....	34
4.4 GRASAS.....	36
4.4.1 Modelo con todos los yogures.....	37
4.4.2 Modelo sin yogures griegos.....	40
4.4.3 Grasas saturadas (GGS).....	42
4.5 MINERALES.....	44
4.5.1 Sodio.....	44
4.5.2 Calcio y Fósforo.....	46

4.6	VITAMINAS	46
4.6.1	Vitamina B12	47
4.7	MODELOS CON UNA MARCA COMERCIAL.....	49
4.7.1	Proteínas	50
4.7.2	Hidratos de carbono	52
4.7.3	Grasas.....	54
CAPÍTULO 5	CONCLUSIONES Y LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN	56
5.1	CONCLUSIONES	56
5.2	LINEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN	56
CAPÍTULO 6	LISTA DE ABREVIATURAS E ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	58
6.1	LISTA DE ABREVIATURAS	58
6.2	ÍNDICE DE TABLAS	59
6.3	ÍNDICE DE FIGURAS	60
CAPÍTULO 7	BIBLIOGRAFÍA	63

Capítulo 1

Introducción general

1.1 Introducción

El yogur es un alimento de origen biológico, que se obtiene de la fermentación láctica ácida de la leche, debida al *Lactobacillus bulgaricus* y el *Streptococcus thermophilus*. El yogur es un alimento de alto valor nutricional que se digiere y asimila más fácilmente que la leche, hecho que le ha conferido actualmente una gran popularidad. Su amplia comercialización a nivel mundial somete a este producto a las normativas vigentes en los diferentes países y comunidades económicas. Un requisito de frecuente aplicación es la necesidad de incorporar al envasado del yogur la información nutricional, así como la composición química.

La medición de los distintos componentes del yogur (ya sean grasas, proteínas, carbohidratos o vitaminas) se realiza habitualmente mediante métodos químicos, lo que conlleva una considerable cantidad de trabajo manual, tiempo y además se trata de métodos destructivos. En la Tabla 1.1 se muestran algunos métodos tradicionales de análisis aplicados a la industria láctea. Es por ello que se hace importante encontrar métodos más rápidos que los tradicionales para analizar la calidad del yogur.

El análisis por espectroscopia en el infrarrojo cercano (NIRS) tiene muchas características que lo hacen atractivo: es rápido, fácil de usar y de naturaleza no destructiva. Su característica fundamental es que es capaz de reflejar en el espectro las transiciones vibracionales de las moléculas de los constituyentes químicos presentes en la muestra a estudio, tales como O-H, N-H y C-H. La radiación NIR cubre el rango del espectro electromagnético con longitud de onda entre 780 y 2500 nm. En la espectroscopia NIR el producto es irradiado con ondas del infrarrojo cercano, midiéndose la radiación reflejada o transmitida. Mientras la radiación atraviesa la muestra, su espectro cambia mediante procesos de dispersión y absorción dependientes de la longitud de onda. Esta modificación del espectro depende de la composición química del producto, así como de sus propiedades de dispersión de la luz que se encuentran relacionadas con la microestructura. Técnicas estadísticas multivariantes, como la regresión parcial por mínimos cuadrados, se aplican entonces para extraer la información requerida del espectro de convolución habitual.

Componente	Método
<i>Contenido en agua</i>	Tolueno Horno Karl Fisher Vacío
<i>Grasa</i>	Gerber Extracción de Soxhlet Gravimétrico Röse-Gottlieb Extracción de Schmid-Bondzynski-Ratzlaff Mojonnier Babcock
<i>Proteínas</i>	Kjeldahl “Dye binding”
<i>Lactosa</i>	Fotométrico Reductométrico Polarimétrico Titrimétrico Enzimático
<i>Ácido Láctico y Lactatos</i>	Fotométrico Enzimático
<i>Ceniza</i>	Caldera
<i>Sal</i>	Potenciométrico Titrimétrico Gravimétrico
<i>pH</i>	Electrométrico

Tabla 1.1 Métodos tradicionales de análisis empleados habitualmente en la industria láctea [Burns and Ciurczak, 2001].

1.2 Antecedentes

La aplicación de la espectroscopia NIR en la realización de medidas no destructivas se ha investigado en numerosos productos alimentarios (entre ellos derivados lácteos). Sin embargo, la bibliografía disponible sobre su aplicación al yogur es limitada.

En la actualidad, la penetración en la industria del NIRS como tecnología de análisis de la composición química de la leche es significativa. Esta aplicación se ve complementada con trabajos de investigación centrados en ampliar el rango de

aplicación de esta tecnología al ámbito de la salud de las propias vacas. Un método de detección sencillo y rápido de aplicar ayudaría enormemente en el diagnóstico precoz de enfermedades y, en definitiva, redundaría en una mejor calidad de la leche y sus derivados.

El NIRS se emplea también en el estudio y monitorización del proceso de maduración del queso. La composición química de este producto evoluciona durante su maduración, de forma que una cuantificación adecuada de ciertos compuestos permite detectar el punto óptimo del proceso de curado.

Otros derivados lácteos como la mantequilla, la leche en polvo o la cuajada incorporan la espectroscopia NIR en sus procesos productivos. El objetivo común de esta técnica es en todos los casos el de garantizar una correcta evolución o resultado del proceso de obtención de cada producto. El NIRS se impone a otras alternativas como técnica preferida por su sencillez, rapidez de utilización y su carácter no destructivo, características que lo hacen idóneo para su incorporación en procesos industriales.

En cuanto a la aplicación de la espectroscopia NIR a la producción y valoración de yogures se encuentra que ésta es bastante limitada. Sí se ha descrito su aplicación al seguimiento del proceso de fermentación del yogur, aunque con una incidencia reducida. Igualmente, se ha recurrido a esta técnica para el estudio de propiedades del yogur asociadas con su percepción sensorial como son el nivel de azúcar o la acidez. Por el contrario, la información disponible en la bibliografía sobre el uso de la espectroscopia NIR para el análisis del valor nutricional o la composición química del yogur es reducida.

Algunos ejemplos de aplicación e investigación de la espectroscopia NIR se citan en el apartado dedicado a las aplicaciones de esta técnica a los derivados lácteos.

1.3 Objeto del Trabajo Fin de Máster

El objetivo de este estudio es determinar la factibilidad de uso de la espectroscopia NIR combinada con un método estadístico de regresión lineal como herramienta de detección del contenido de los diferentes componentes químicos del yogur.

Los componentes químicos a estudio son: proteínas, grasas, carbohidratos, minerales y vitaminas.

Capítulo 2

Espectroscopia NIR

2.1 Introducción

La radiación NIR (Near-InfraRed) es la radiación del espectro electromagnético comprendida en el intervalo de 780 a 2500 nm, y está situada entre la radiación MIR (Middle InfraRed) y la UV-Vis (Figura 2.1).

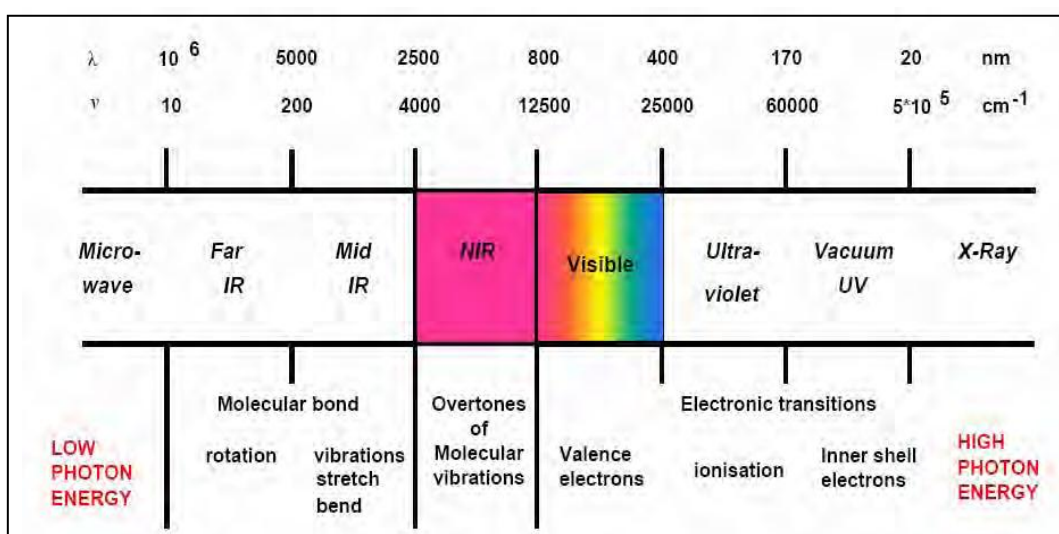


Figura 2.1 Espectro electromagnético [Murray, 2004]

El descubrimiento de la radiación en la región del infrarrojo cercano se debe a Sir William Herschel, quien en el año 1800 demostró que existía radiación por debajo del espectro visible (Figura 2.2). A pesar del temprano descubrimiento, no fue hasta 1881 cuando Abney y Festing registraron el espectro de líquidos orgánicos en la región de 700 a 1200 nm. Sin embargo, durante las posteriores décadas el interés de los espectroscopistas estuvo centrado en la región del infrarrojo medio, convencidos del poco interés analítico de la región del infrarrojo cercano.

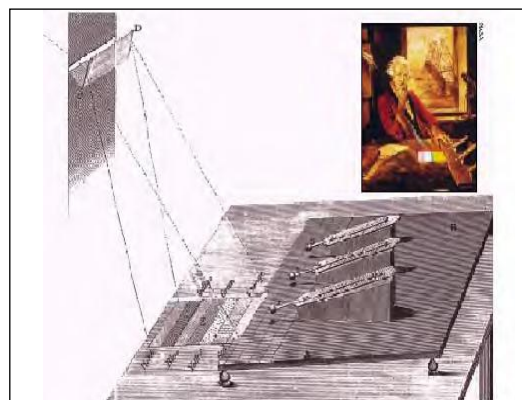


Figura 2.2 Experimento de Herschel

No fue hasta la década de los 50, con la aparición de los primeros espectrofotómetros NIR, cuando se desarrollaron las primeras aplicaciones de esta región del espectro electromagnético. W. Kaye en 1954 asignó bandas espectrales de los correspondientes grupos funcionales en la región comprendida entre 700 y 3500 nm, y mostró alguna de las posibles aplicaciones analíticas de la técnica como la determinación de agua y alcoholes, y el análisis de aminas e hidrocarburos. Publicaciones posteriores describen determinaciones cuantitativas utilizando la región NIR.

En los años 60, el grupo de investigación dirigido por Karl Norris utilizó la espectroscopia NIR para el estudio de muestras complejas de origen natural, principalmente en el ámbito agroalimentario. Estos estudios abrieron un nuevo campo de aplicaciones, incrementando considerablemente el interés por esta técnica.

Después de esta etapa inicial, y con avances en el desarrollo de nueva instrumentación, con electrónica más estable y ópticas mejoradas, a partir de finales de los 70 se hizo posible el registro de espectros de manera rápida y reproducible (instrumentos de barrido, interferómetros) [Henry, 1999]. El desarrollo de la informática también ayudó al posterior desarrollo y aplicación de la técnica: a diferencia de otras técnicas espectroscópicas, en el infrarrojo cercano no se producen picos aislados característicos para cada compuesto, sino que hay superposición de bandas correspondientes a diferentes grupos funcionales. Para extraer la información contenida en el espectro son necesarias técnicas quimiométricas de análisis multivariable. La posibilidad de utilizar ordenadores con mayor capacidad de cálculo y memoria permitió obtener y almacenar gran cantidad de información espectral, que podía ser tratada por técnicas quimiométricas, y así poder extraer la información analítica de interés [Mark, 1989]. El auge del NIRS como técnica de análisis se ha dado en los años 80 y 90 gracias a los avances tecnológicos.

Actualmente, las aplicaciones de la espectroscopia NIR abarcan el análisis de productos agroalimentarios, farmacéuticos, de fibras textiles, industria química y petroquímica, e incluso aplicaciones médicas, entre otros diversos ámbitos.

Los motivos que hacen esta técnica atractiva son diversos: permite el registro de sólidos, líquidos y gases; no requiere del tratamiento previo de la muestra; el registro espectral es rápido; es una técnica no destructiva; permite el análisis multicomponente; el análisis de rutina es rápido; es una técnica económica y además, permite el análisis en línea de producción.

Como el gran desarrollo del NIRS se ha producido en los últimos 25 años, se podría esperar que, hoy por hoy, fuese una técnica madura próxima a una fase de estancamiento. Sin embargo, el desarrollo continuo de nuevas técnicas quimiométricas, la miniaturización de los componentes instrumentales, el desarrollo de la espectroscopia NIR de imagen, y la continua aplicación a nuevos campos, hacen que esta técnica esté en plena fase de expansión [Davies, 1998], siendo la dominadora de las técnicas espectroscópicas en el análisis a tiempo real y el análisis de proceso [Workman et al, 2003].

2.2 Fundamentos

La región infrarroja del espectro electromagnético está comprendida entre 780 y 10^6 nm (Figura 2.1), y está dividida en tres subregiones: FIR (Far InfraRed) infrarrojo lejano, MIR (Middle InfraRed) infrarrojo medio y NIR (Near InfraRed) infrarrojo cercano. La absorción en cada una de estas tres regiones es debida a interacciones de diferente naturaleza entre luz y materia (Tabla 2.1).

Región	Intervalo de absorción (nm)	Origen de la absorción
FIR	$4 \cdot 10^4 - 10^6$	Rotaciones moleculares
MIR	2500 - 40.000	Vibraciones moleculares fundamentales
NIR	780 - 2500	Sobretonos y bandas de combinación de vibraciones moleculares

Tabla 2.1 Regiones del espectro electromagnético entre 780 y 10^6 nm.

Para que una molécula absorba radiación IR, la energía de la radiación incidente ha de coincidir con la diferencia de energía entre dos estados energéticos y debe producirse un cambio en el momento dipolar de la molécula debido a movimientos vibratorios. Los movimientos vibratorios que puede presentar una molécula son de dos tipos (Figura 2.3), los de estiramiento: vibración en la que se produce un cambio en la distancia interatómica a lo largo del eje de enlace entre dos átomos; y los de flexión: se produce un cambio en el ángulo de enlace.

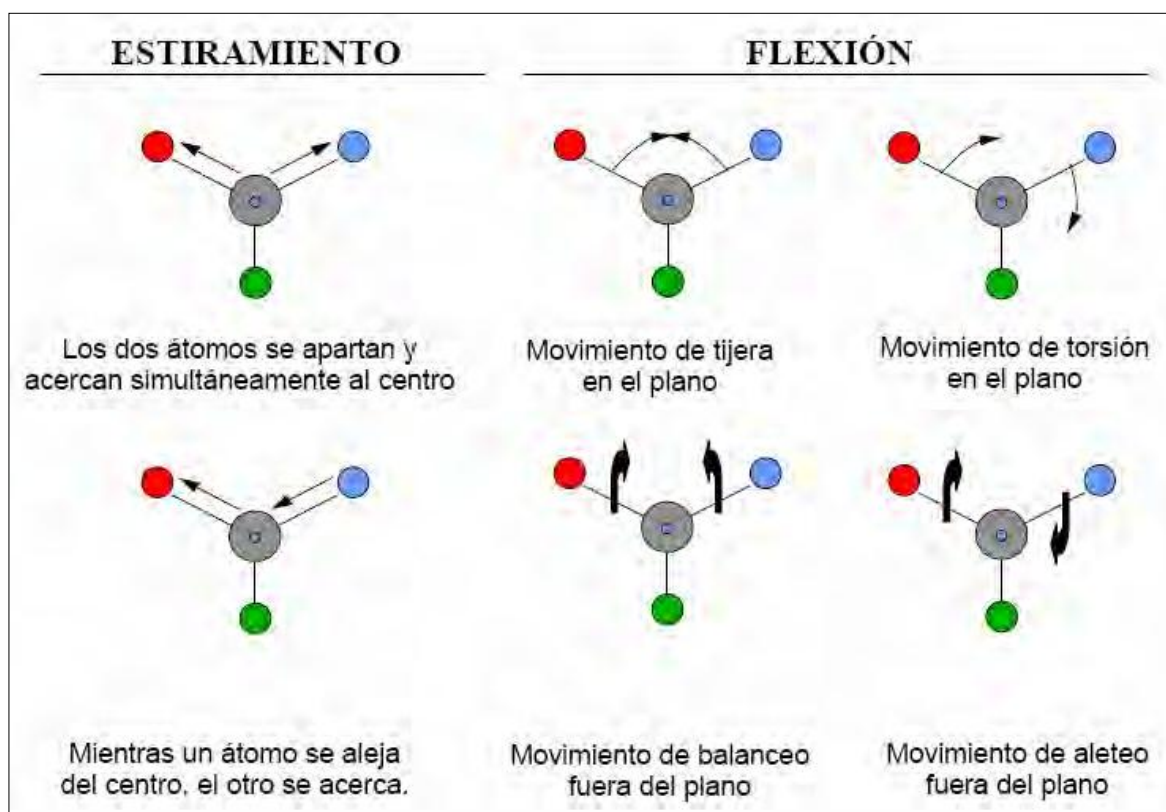


Figura 2.3 Vibraciones moleculares entre dos átomos respecto de un átomo central.

Los átomos en una molécula nunca se encuentran inmóviles, ni tan siquiera a temperaturas cercanas al cero absoluto. El movimiento de dos átomos en un enlace se puede aproximar a un oscilador armónico simple (Figura 2.4), donde el movimiento de los átomos está confinado en un pozo de potencial, la energía potencial cambia continuamente, acercándose al mínimo cuando los átomos se encuentran en la posición de equilibrio, y haciéndose máxima cuando la distancia es máxima o mínima.

La energía potencial del enlace definido por un oscilador armónico simple viene dada por la ecuación:

$$E = \frac{1}{2} kx^2$$

Siendo k la constante de fuerza del enlace y x la distancia interatómica.

La frecuencia de vibración de un sistema formado por dos masas unidas por un muelle perfectamente elástico viene dada por:

$$v = \sqrt{\frac{1}{2\pi} \left(\frac{k(m_1 + m_2)}{m_1 m_2} \right)}$$

Siendo v la frecuencia, k la constante de fuerza y m_1 y m_2 las masas de cada uno de las masas o átomos.

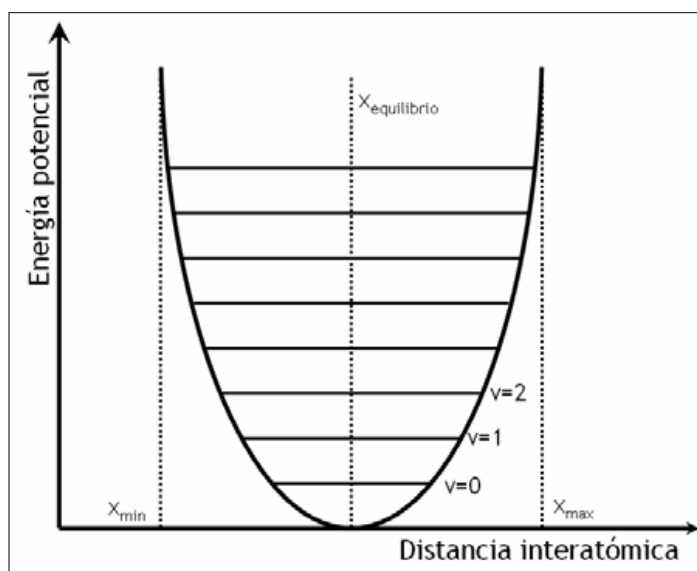


Figura 2.4 Energía potencial para el oscilador armónico.

Como otras energías moleculares, la energía vibracional está cuantizada. Para un oscilador armónico los niveles de energía vienen dados por:

$$E_{vib} = \left(v + \frac{1}{2} \right) h\nu$$

Donde v es el número cuántico vibracional que sólo puede adquirir valores enteros ($v = 0, 1, 2, \dots$). Según la teoría cuántica, las únicas transiciones posibles son entre niveles energéticos consecutivos, $\Delta v = \pm 1$. Así, cada enlace tendría una energía de absorción característica correspondiente a la transición Δv_{0-1} .

Este modelo vibracional es incompleto para moléculas reales, donde se ha de tener en cuenta la energía de repulsión culómbica de dos átomos cuando se aproximan, que provoca un mayor aumento de la energía potencial; y en el otro extremo, la disminución de la energía potencial cuando la distancia interatómica se acerca a aquella en la que tiene lugar la rotura del enlace. El comportamiento de las moléculas reales se acerca más al de un oscilador anarmónico (Figura 2.5).

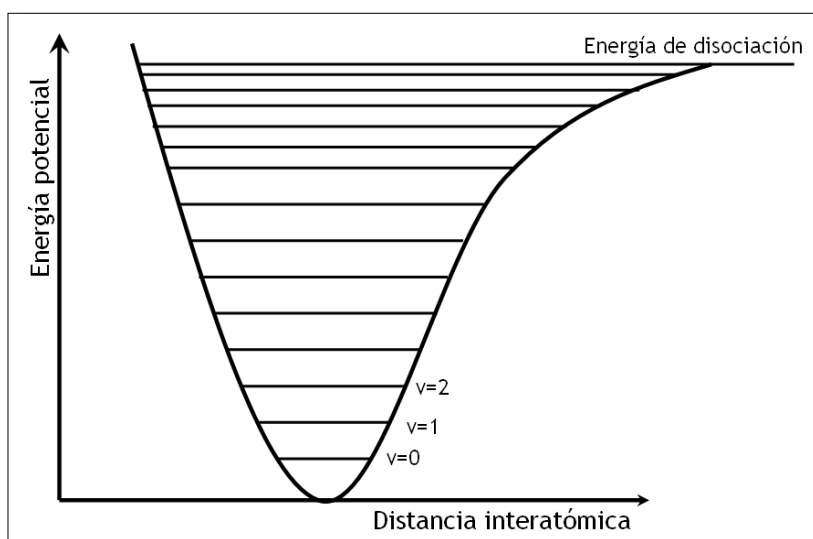


Figura 2.5 Energía potencial para el oscilador anarmónico.

La expresión de la energía vibracional corregida con términos que incluyen la anarmonicidad se expresa como:

$$E_{vib} = \left(v + \frac{1}{2}\right) hv - \left(v + \frac{1}{2}\right)^2 hvy - \left(v + \frac{1}{2}\right)^3 hvyy' \dots$$

Donde y, y', \dots son conocidas como constantes de anarmonicidad. Para el oscilador anarmónico las transiciones entre niveles de energía consecutivos se define como:

$$v = v_{fund} \left[1 - y \left(v + \frac{1}{2} \right) \right]$$

En el oscilador anarmónico la frecuencia de vibración disminuye al aumentar v , consecuencia de que los niveles no están igualmente espaciados, y pueden ser observadas transiciones $\Delta v = \pm 2, \pm 3, \dots$ las cuales son conocidas como sobretonos (primer y segundo sobretono respectivamente), de menor probabilidad, y que generalmente aparecen en la región del infrarrojo próximo.

La absorción en el infrarrojo cercano corresponde a sobretonos y bandas de combinación de las vibraciones fundamentales observadas en el infrarrojo medio. Los sobretonos, que corresponden a transiciones con $\Delta v \geq 2$, son aproximadamente múltiples de la frecuencia vibracional fundamental. De forma similar, las bandas de combinación son aproximadamente la suma de diferentes energías de vibración, ya sean fundamentales o sobretonos.

Es posible que las bandas de combinación correspondan a más de dos vibraciones diferentes. Sin embargo, estas vibraciones deben corresponder al mismo grupo funcional y deben tener la misma simetría. De esta manera, bandas de combinación correspondientes a dos grupos funcionales diferentes, como C-H y O-H, no son posibles [Miller, 2001].

Los sobretonos y las bandas de combinación tienen menor probabilidad que las transiciones fundamentales, lo que provoca que la absorción en la región NIR sea de menor intensidad que en la MIR. La intensidad de absorción en la región NIR depende de la anarmonicidad del enlace, cuanto más anarmónico sea éste, mayor probabilidad para sobretonos y bandas de combinación. Por este motivo, los enlaces C-H, N-H, y O-H, muy anarmónicos debido a la diferencia de peso atómico entre los dos átomos, son muy absorbentes en la región NIR [Miller, 2001]. Las bandas de grupos C=O, C-C, C-F y C-Cl, en general son de menor intensidad o no aparecen en la región NIR.

La Figura 2.6 muestra los principales enlaces absorbentes en NIR, y su correspondiente región espectral.

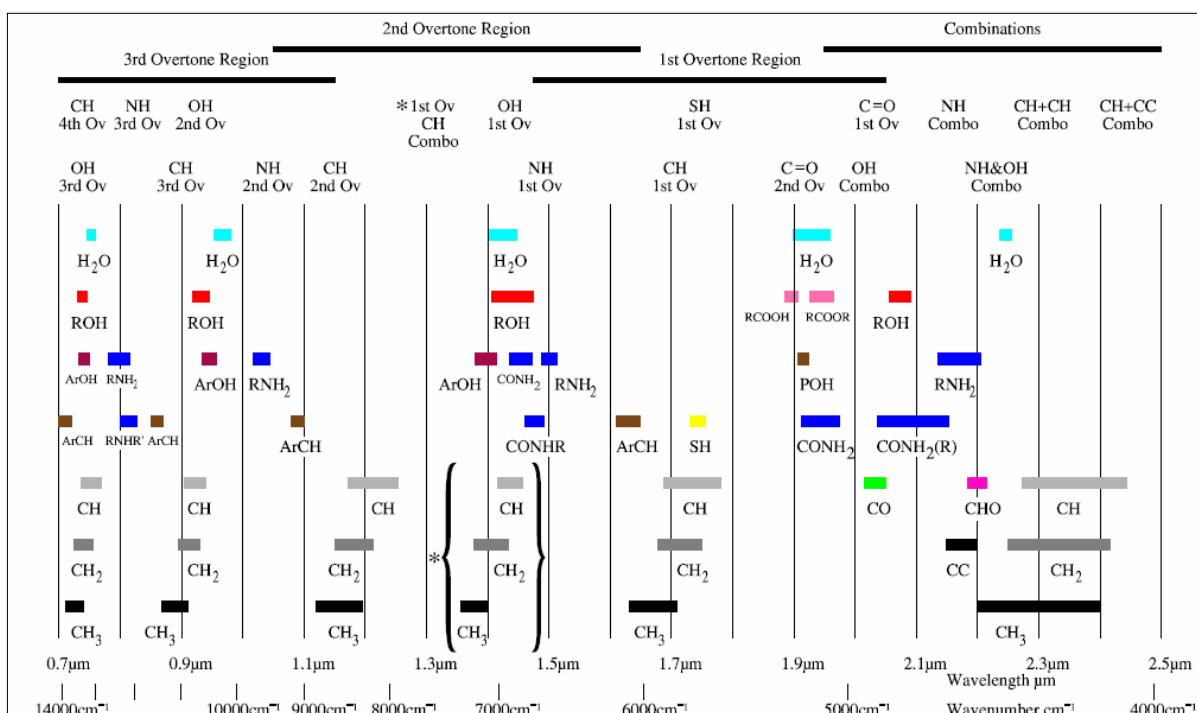


Figura 2.6 Bandas de absorción en la región NIR [Murray, 2004].

Los compuestos orgánicos poseen muchos modos vibracionales que provocan que el espectro NIR sea complejo.

Otra característica de la zona del infrarrojo cercano es que las interacciones entre moléculas, como puentes de hidrógeno, afectan al espectro NIR modificando la posición de las bandas. Además, características físicas de la muestra como temperatura, tamaño de partícula o tipo de estructura cristalina también afectan en la región del infrarrojo cercano.

2.3 Instrumentación

El esquema básico de un instrumento NIRS no difiere de cualquier otro espectrofotómetro. Sin embargo, debido a la baja intensidad de las bandas NIR, el nivel de exigencia en términos de ruido y estabilidad instrumental es mayor que en otros espectrofotómetros. Sus componentes básicos son: fuente de radiación, sistema de selección de longitudes de onda, compartimiento de muestra y detector.

Fuente de radiación

La lámpara halógena de tungsteno continúa siendo la fuente de radiación más utilizada en espectroscopia NIR por su buen funcionamiento, robustez, coste y, porque proporciona un espectro continuo en la región 320 – 2500 nm. Otras fuentes de radiación son los LED (Light Emitting Diodes), atractivos por su eficacia, pequeño tamaño y temperatura de operación, pero que sólo pueden emitir hasta los 1600 nm.

Selector de longitudes de onda

A excepción de los instrumentos basados en LEDs como fuente de radiación, es necesario un sistema que descomponga el haz de luz policromática en longitudes de onda discretas, proporcionando un ancho de banda estrecho y una elevada intensidad en todo el intervalo de longitudes de onda. Los dispositivos de selección de longitudes de onda se pueden clasificar en tres tipos: filtros, redes de difracción e interferómetros.

Los instrumentos de filtros seleccionan las longitudes de onda interponiendo entre la fuente y la muestra materiales que permiten el paso de determinadas longitudes de onda [Burns and Ciurczak, 2001]. Los más sencillos son los filtros de absorción que transmiten longitudes de onda de forma selectiva según el material con el que estén producidos, y los de interferencia, donde las longitudes de onda

transmitidas dependen del índice de refracción del material y del ángulo de incidencia de la radiación. Este último tipo de filtros tienen un ancho de banda de 10 ± 2 nm y transmiten aprox. un 40% de la radiación [Stark and Luchter, 2004].

Los sistemas modernos están basados en filtros optoacústicos AOTF (Acousto-Optic Tunable Filter), donde el índice de refracción del material (TeO_2) cambia cuando éste es atravesado por una onda acústica, generando luz monocromática polarizada. La frecuencia acústica controla la longitud de onda que atraviesa el filtro.

Las redes de difracción son dispositivos que descomponen la luz policromática en longitudes de onda monocromáticas. Cuando el haz de luz incide sobre la red de difracción, éste se separa en longitudes de onda discretas. La selección de la longitud de onda se basa en el ángulo de giro de la red de difracción, que permite que solo una longitud de onda atraviese la ranura de salida y llegue a la muestra.

Otros selectores de longitudes son los interferómetros, siendo el interferómetro de Michelson el más utilizado. Este sistema divide en dos el haz de luz, uno de los haces se refleja en un espejo fijo y el otro en un espejo móvil, y posteriormente, ambos haces se recombinan en el mismo punto. Variando la posición del cristal móvil se pueden crear interferencias constructivas o destructivas, obteniendo el interferograma. El espectro se obtiene del interferograma mediante transformada de Fourier.

□ *Compartimiento de muestra*

El compartimiento de muestra es la parte del espectrofotómetro que más depende de la aplicación. La espectroscopia NIR tiene una gran versatilidad y adaptabilidad para el análisis de muestras de diversa naturaleza, ya sean sólidas, líquidas o gaseosas, debido a la existencia de múltiples módulos de medida adaptados a cada tipo de muestra. Así, se pueden realizar medidas at, on e in-line para múltiples tipos de muestra, variando el camino óptico y el sistema de medida según la necesidad, ya sea con compartimentos adaptados o mediante sondas de fibra óptica, con instrumentación portátil o fija, etc.

A pesar de la gran variedad de compartimentos de muestras, existen tres sistemas de medida (Figura 2.7): transmitancia, reflectancia y transflectancia (sistema de medida donde el haz de luz atraviesa la muestra, se refleja en un reflector en contacto con la misma, y vuelve a atravesar la muestra hasta llegar de nuevo al detector).

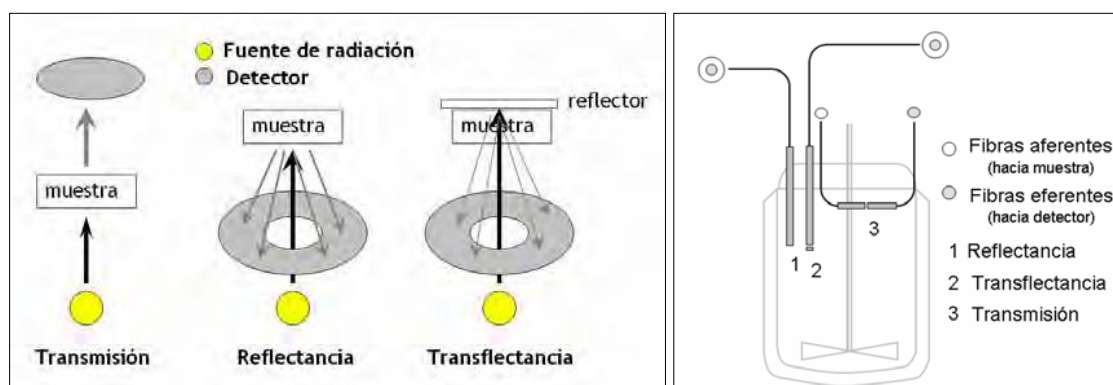


Figura 2.7 Sistemas de registro en NIR. Izq.: disposición clásica. Der.: sondas de fibra óptica.

El modo transmitancia suele emplearse para muestras gaseosas, líquidas o semilíquidas, mientras que el modo reflectancia suele ser comúnmente empleado para sólidos. La transflectancia, caso intermedio, suele ser empleado para muestras líquidas o semilíquidas.

□ Detectores

Los detectores empleados en espectroscopia NIR son construidos con materiales semiconductores como InGaAs, InAs, InSb, PbS o Si. El material más utilizado en la región 1100 – 2500 nm es el PbS, mientras que en la región más próxima al visible (780 – 1100 nm) se emplea generalmente el silicio. Los detectores de InGaAs son buenas alternativas a los detectores de PbS ya que ofrecen mayor respuesta, pero con el inconveniente de que la temperatura de trabajo óptima es de -40°C [Stark and Luchter, 2004].

2.4 Quimiometría y tratamiento de los datos espectrales

Los datos de una muestra que se obtienen mediante un espectrómetro NIR contienen información espectral relacionada con la composición de la muestra. Las diferentes entidades químicas tienen absorción a unas determinadas longitudes de onda lo que se puede emplear para definir la composición química de diferentes sustancias. Sin embargo, los picos de absorción de las diferentes moléculas químicas se solapan en muchas partes de la región espectral. La señal de absorción es a menudo débil si se compara con otros fenómenos que intervienen en la interacción entre luz y partícula como son todos los efectos de dispersión. Por estas razones, es necesario procesar matemáticamente los datos espectrales a fin de extraer información valiosa de las propiedades químicas de las muestras.

La quimiometría es la disciplina química que usa métodos matemáticos y estadísticos para diseñar o seleccionar procedimientos y experimentos óptimos y proveer la máxima información química analizando los datos químicos [Massart et al., 1988]. La quimiometría es una disciplina muy amplia por lo que se intentará hacer un corto resumen de cuáles son los principales métodos utilizados para extraer información del NIR.

La parte más importante en el desarrollo de un método NIR es construir el modelo predictivo, generalmente llamado calibración. La calibración es simplemente un modelo de regresión que permitirá la predicción de la composición química basada en los datos espectrales. El proceso de desarrollo del modelo predictivo conlleva varios pasos: (I) adquisición de los datos espectrales; (II) uso de métodos de referencia apropiados para determinar la concentración del analito en cierto número de muestras; (III) pre-procesado de los datos para reducir el efecto de dispersión del tamaño de las partículas y mejorar la relación espectro-analito; (IV) desarrollo de la relación matemática entre la absorción en el NIR y la concentración de analitos; (V) validar los modelos usando otro grupo de muestras no utilizadas en el grupo de calibración [Cen y He, 2007].

Entre los métodos más comunes de pre-procesado se incluyen: la normalización, corrección del efecto multiplicativo de la dispersión (MSC), ajuste de la línea base, derivación y variable normal estándar (SNV). Las técnicas de pre-procesado más recientemente desarrolladas son: corrección ortogonal de la señal (OSC), corrección directa de la señal (DOSC) y corrección ortogonal de la longitud de onda (OWAVEC) [Leardi, 2008]. Muchos enfoques se han propuesto para el desarrollo de la calibración. En los años 60 y 70, con el uso de aparatos no dispersivos (instrumentos con filtros), el método de elección era la regresión lineal múltiple (MLR). En los años 80, con la introducción de los monocromadores (sistema dispersivo), fue posible utilizar propuestas más sofisticadas como la regresión en componentes principales (PCR) y la regresión parcial por mínimos cuadrados (PLS). Con el incremento en el tamaño de las bases de datos de calibración hubo la necesidad de hallar nuevos métodos de calibración capaces de manejar relaciones no lineales como la calibración local y la red neural artificial [Berzaghi et al., 2001].

En los métodos quimiométricos, los análisis cualitativos son también una herramienta importante en los estudios con NIR. Es una técnica que se puede usar para clasificar muestras dentro de una categoría concreta. El modelo de clasificación se desarrolla con un grupo de muestras de prueba con categorías conocidas. El rendimiento del modelo se evalúa mediante el uso de un grupo de validación con muestras desconocidas. Los métodos de reconocimiento de los modelos son

numerosos, como el análisis discriminante lineal (LDA), análisis en componentes principales (PCA), etc. [Cen y He, 2007].

Puesto que el objetivo final de un modelo de calibración es predecir con precisión muestras desconocidas [Geladi, 2002], es de crítica importancia que el grupo de datos de calibración represente las posibles fuentes de variación que se encontrarán en las muestras desconocidas. Por esta razón, es muy importante seleccionar muestras que provean la máxima información para el desarrollo del grupo de datos de calibración. El trabajo de Shenk y Westerhaus (1991) ha revolucionado el proceso de selección de muestras usando las distancias de Mahalanobis que posibilita la identificación de las muestras más relevantes para la calibración.

La validación interna supone la validación de una calibración usando el mismo grupo de muestras que se ha usado para el desarrollo de la calibración. Los dos métodos de validación normalmente utilizados son la validación independiente o externa y la validación cruzada. La validación externa requiere un grupo representativo y grande de muestras para analizar con el fin de poder dar estimaciones relevantes y fiables de la habilidad predictiva del modelo. La validación cruzada es un método de validación muy fiable; busca validar el modelo de calibración en un grupo de datos independientes pero no usa la muestra sólo para la prueba.

2.5 Aplicaciones del NIR en la industria agroalimentaria

El empleo de la espectrometría NIR para la determinación no destructiva de parámetros internos de calidad en alimentos está ampliamente extendido. Con Karl Norris, en los años 60, como pionero de esta técnica para su uso en alimentos; numerosos han sido los artículos publicados en multitud de productos agroalimentarios. A continuación se hace una revisión bibliográfica del uso del NIR en la leche y derivados lácteos. En otro apartado se procede a lo mismo para los yogures, que es el núcleo principal de este trabajo.

2.5.1 Leche y derivados lácteos

Los principales componentes de la leche se pueden analizar off-line en pocos minutos usando un instrumento de espectroscopia infrarroja como el Milko-scan (Foss Analytical A/S). A pesar de que estos instrumentos han prácticamente reemplazado cualquier determinación química húmeda del muestreo de rutina, hay un creciente interés en la evaluación de la calidad de la leche on-line puesto que

sería un dispositivo rápido para controlar el producto durante la etapa de ordeño [Saranwong and Kavano, 2008].

Tsenkova et al. publicaron muchos artículos sobre la aplicación de espectroscopia NIR para evaluar y monitorizar algunas propiedades de la calidad de la leche: contenido en proteína, grasa y lactosa [Tsenkova et al., 2000], determinación del Recuento de Células Somáticas (RCS) [Tsenkova et al., 2001a y 2001b], diagnóstico de enfermedad e identificación de patógenos [Tsenkova et al., 2006]. Estos parámetros (especialmente grasa, proteína y RCS) tienen importancia económica ya que en muchos países, el comercio de la leche se basa en estos factores. RCS es un reconocido indicador de la salud de la vaca, ya que refleja el nivel de infección y la resultante inflamación de la glándula mamaria de las vacas lecheras, asociado con mastitis. La salud de la vaca es una herramienta útil para detectar precozmente posibles problemas y así evitar enormes pérdidas económicas. Puesto que la composición de la leche refleja el metabolismo del animal, aplicaciones como la determinación de cuerpos cetónicos [De Roos et al., 2007] mediante espectroscopia FT-NIR serían capaces de identificar problemas nutricionales, convirtiéndose así en una herramienta importante para el manejo. Saranwong and Kavano (2008) aplicaron también la espectroscopia NIR para evaluar la contaminación de la leche a través de la determinación del recuento de bacterias aeróbicas.

En muchos países un alto porcentaje de la leche producida se transforma en queso. Por ello es importante conocer la capacidad de la leche para coagular y tener conocimiento de todas las fases del proceso, desde el principio hasta el final. Klandar et al., (2007) compararon diferentes métodos analíticos para evaluar esta propiedad y demostraron que el NIR parece ser tan adecuado como cualquier método on-line no destructivo para evaluar la coagulación de la leche con cuajo. Estos resultados confirman lo que Laporte et al. (1998) reportaron hace más de diez años cuando monitorizaron el cuajo de coagulación de leche de vaca con una sonda óptica cercana al infrarrojo. Ellos comprobaron que la tecnología NIR provee una estimación mejor de la coagulación que el coagulómetro (sonda termal). Giangiacomo et al., (1998) utilizó NIR y técnicas fluorimétricas y colorimétricas para monitorizar la fase primaria de coagulación de la reconstituida leche desnatada en polvo con solución de cuajo de ternero y detectar la relación entre el agua y los otros componentes durante los cambios de fases. Los autores encontraron resultados interesantes comparando los valores de absorbancia del NIR respecto al tiempo ya que obtuvieron una tendencia en la coagulación.

Hoy en día, en la industria quesera, en la que se necesita un alto porcentaje de automatización, los índices de facturación de queso (coagulación y sinéresis,

predicción de la humedad de la cuajada, libre de grasa y rendimiento de la cuajada) se podrían predecir on-line. Esto es lo que se llevó a cabo por Fagan et al. (2008) demostrando el excelente potencial de un sensor óptico de retrodispersión on-line para monitorizar la sinéresis de la cuajada. Čurda and Kukačková (2004) utilizaron la técnica NIR para evaluar la materia seca, grasa, proteína cruda, pH y propiedades reológicas (como penetración) de los quesos. Obtuvieron unos buenos coeficientes de correlación en la calibración para todas las cantidades medidas ($R^2 > 0.98$). La penetración y el pH también se podían estimar pero con menos precisión. Karoui et al. (2006) corroboró que el NIR se puede utilizar para la medición de grasa, nitrógeno total y nitrógeno no proteico con diferentes niveles de precisión en quesos Emmental, pero no pudo hacer lo mismo para los parámetros NaCl y pH.

La maduración de los quesos es un método de preservación habitual para este tipo de alimentos. Cada producto puede tener diferentes niveles de maduración y eso conlleva cambios en la textura, el color y el aroma en el producto final. La proteólisis y la lipólisis son los principales y más complejos procesos bioquímicos que ocurren durante la maduración del queso, las caseínas se convierten en componentes nitrogenados solubles en agua, como péptidos y aminoácidos. González-Martín et al. (2009) aplicaron la espectroscopia NIR para determinar estos péptidos en diferentes tipos de quesos (de vaca, oveja y cabra) con distintos tiempos de maduración. Los resultados obtenidos con el método NIR eran comparables a los del método cromatográfico (RPHPLC), por lo que demostraron que es posible identificar rápidamente y cuantificar los péptidos de un queso producido con leche de cualquier especie animal.

Respecto a los quesos frescos, la “frescura” se asocia con poca acidez, proteólisis limitada y sin sabor amargo. Cattaneo et al. (2005) utilizó FT-NIR para evaluar la vida útil en que la “frescura” se mantiene. Un análisis discriminante, en este caso, fue capaz de separar correctamente las muestras “frescas” (<6 días) de las otras almacenadas más de 6 días. Se obtuvo menor precisión para las muestras almacenadas más de 6 días. Cattaneo et al. (2008) sugirió más investigaciones a fin de diferenciar el tipo de queso durante todo el periodo de vida útil.

En muchos países de la Unión Europea, algunos productos lácteos se producen siguiendo una receta o técnica muy precisa que refleja las tradiciones gastronómicas e históricas de ese área geográfica. Estos alimentos artesanos son, por tanto, diferentes de otros productos similares y se deben etiquetar de acuerdo a las condiciones específicas que caracterizan su origen y las tecnologías de elaboración usadas. Son productos con Denominación de Origen (D.O.) o Indicación Geográfica Protegida (I.G.P.) que frecuentemente se asocian con costes de producción altos y consecuentemente pueden tener un alto precio. Esto hace que estos productos sean

propensos a la adulteración con alternativas más baratas, por razones económicas [Manley et al., 2008].

Parece indispensable en estos casos descubrir una técnica analítica capaz de discriminar entre un alimento convencional y otro obtenido en un área geográfica específica. Karoui et al. (2005) evaluó el potencial de combinar espectroscopias de fluorescencia y de infrarrojo para determinar el origen geográfico de quesos Emmental. Se observó una buena clasificación de los quesos con 89% para la calibración y 86.8% para la validación. Estos resultados mostraron que las técnicas espectroscópicas pueden proveer huellas dactilares útiles y permitir la identificación de quesos Emmental de acuerdo a su origen geográfico y a las condiciones de producción.

Los mismos autores intentaron también predecir algunos atributos sensoriales del queso Emmental Europeo [Karoui et al. 2006a]. La intensidad de aroma y el sabor son unas de las propiedades más importantes para los consumidores y numerosos estudios se han llevado a cabo para encontrar correlación entre las cualidades sensoriales y medidas instrumentales objetivas. Cattaneo et al. (2008) comparó evaluaciones sensoriales con absorción NIR para caracterizar Bitto (un queso con D.O. italiano). El objetivo de esta prueba era estudiar la relación entre las evaluaciones sensoriales y los datos NIR para verificar qué atributos se pueden asociar a bandas de absorción específicas en toda la región NIR. Los resultados preliminares de este estudio probaron que el FT-NIR puede ser una herramienta útil para la predicción de características sensoriales del queso. Karoui et al. (2006a) evaluó cuatro atributos de apariencia-textura (adhesividad, friabilidad, elasticidad y firmeza) y seis atributos olfativos-gustativos (aroma, olor, amargura, salinidad, acidez y dulzura) y demostró la factibilidad de la espectroscopia NIR para predecir algunos de estos atributos sensoriales (adhesividad, firmeza y dulzura) en quesos Emmental, originarios de diferentes regiones europeas, presentando un coeficiente de predicción con una R^2 superior a 0.70. Correlaciones menores se obtuvieron para los otros parámetros, probablemente porque el número de muestras era limitado y la variabilidad de los datos era bastante baja.

Recientemente la espectroscopia NIR se ha usado también para desarrollar modelos de calibración para la leche de cabra (Dračková et al., 2008) obteniéndose un buen ajuste de modelo ($R^2 > 0.87$) para los principales rasgos de calidad (proteínas, grasa, lactosa, sólidos totales). Modelos menos precisos se obtuvieron para el punto de congelación y la acidez.

Además, Castillo et al. (2000) usó la espectroscopia NIR para monitorizar todo el proceso de formación de cuajada en la leche de cabra. Este estudio tenía el objetivo

de desarrollar un dispositivo capaz de sugerir al quesero el tiempo óptimo de corte de la cuajada, el cual tiene efectos muy importantes en la calidad final del queso de cabra.

Actualmente, en la práctica, las aplicaciones del NIR en la industria láctea son:

- Analizar el contenido de agua de la leche en polvo. Se determina directamente después del proceso de pulverización seca. Con esta información, el concentrado en la torre de secado se puede regular.
- Estimar el contenido de agua de la mantequilla. Se analiza al final de la máquina donde se hace la mantequilla. Se puede hacer en el control de separación por prensado, que influye en el contenido de agua del producto.
- Monitorizar la formación de coágulos durante el proceso de elaboración del queso. Se usan fibras ópticas.
- Analizar el contenido de materia seca de la cuajada.

2.5.2 Yogures

La espectrometría NIR combinada con nariz electrónica (electronic nose en inglés) se ha utilizado para monitorizar on-line las fermentaciones del yogur y del filmjök (especie de yogur sueco con leche agria) bajo condiciones industriales con excelentes resultados [Navrátil et al., 2004].

La espectroscopia VIS/NIR y análisis de principales componentes se emplearon para diferenciar variedades de yogur [He et al., 2006] y analizar su calidad [Shao et al., 2007]. En este último trabajo de Shao et al. se miden los principales componentes del yogur como son el contenido de azúcar y la acidez. Estos parámetros son los que poseen mayor influencia en la aceptación sensorial del yogur por parte de los consumidores. Los resultados obtenidos fueron bastante esperanzadores con unos coeficientes de correlación de 0.92 y 0.91 para el contenido de azúcar y la acidez respectivamente.

Capítulo 3

Material y Métodos

3.1 Muestras de yogur

Se analizaron por espectrometría NIR 141 yogures diferentes, correspondientes a 13 marcas comerciales (Tabla 3.1). Dado que el principal objetivo del estudio fue evaluar la capacidad de la espectrometría NIR para la evaluación rápida del contenido en los diferentes componentes de los yogures, se anotó el contenido declarado en el etiquetado del producto.

La metodología aplicada consistió en realizar dos medidas de cada muestra de yogur, a fin de utilizar los resultados promediados. Todas las medidas se llevaron a cabo a temperatura ambiente, aplicando el NIR directamente sobre el yogur contenido dentro de su propio envase comercial. La única modificación realizada sobre la muestra fue la de homogeneización por agitación mecánica.

De los resultados promedio registrados para cada muestra de yogur, una parte fue destinada a la creación de un modelo matemático de calibración (75% de las muestras) y las medidas restantes se utilizaron para la validación de dicho modelo.

Nº	Marca	Tipo	Desnatado	Sabor	Edulcorado	Azucarado	Nº	Marca	Tipo	Desnatado	Sabor	Edulcorado	Azucarado
1	Alieza	con fruta	si	macedonia	no	no	72	El Corte Inglés	sabor	no	macedonia	no	no
2	Alieza	griego	no	natural	no	si	73	Eroski	con fruta	si	fresa	no	no
3	Alieza	griego	no	natural	no	no	74	Eroski	normal	no	natural	no	si
4	Alieza	normal	no	natural	no	no	75	Eroski	normal	si	natural	si	no
5	Alieza	normal	no	natural	no	si	76	Eroski	Griego	no	fresa	no	no
6	Bon Area / Guissona	normal	si	natural	no	no	77	Eroski	griego	no	natural	no	no
7	Bon Area / Guissona	normal	no	natural	no	no	78	Eroski	petit fruits	no	fresa	no	no
8	Carrefour	Bifidus	si	ciruela	no	si	79	Eroski	sabor	si	fresa	no	no
9	Carrefour	Bifidus	no	fresa	no	si	80	Eroski	Bifidus	no	con cereales y kiwi	no	no
10	Carrefour	Bifidus	si	frutas del bosque	no	si	81	Eroski	Bifidus	no	con ciruelas	no	no
11	Carrefour	Bifidus	no	muesli + cereales	no	si	82	Eroski	Bifidus	si	con kiwi	si	no
12	Carrefour	Bifidus	no	natural	no	no	83	Eroski	Bifidus	si	natural	no	no
13	Carrefour	griego	no	fresa	no	si	84	Eroski	Bifidus	no	natural	no	no
14	Carrefour	griego	no	natural	no	no	85	Eroski	cremoso	si	natural	si	no
15	Carrefour	griego	no	natural	no	si	86	Eroski	La Creme	no	natural	no	si
16	Carrefour	normal	no	natural	no	no	87	Eroski	normal	si	natural	no	no
17	Carrefour	normal	no	natural	no	si	88	Eroski	sabor	no	fresa	no	no
18	Carrefour	sabor	si	limón	si	no	89	Eroski	Selectia	no	natural	no	no
19	Carrefour	sabor	no	limón	no	si	90	Eroski	normal	no	natural	no	no
20	Danone	activa	no	mango/papaya	no	no	91	Hacendado	Bifidus	no	con cereales y fibras	no	no
21	Danone	activa	no	fibras/cereales	no	no	92	Hacendado	Bifidus	si	ciruela	si	no
22	Danone	activa	no	muesli	no	no	93	Hacendado	Bifidus	si	con muesli	si	no
23	Danone	activa	no	cereales y kiwi	no	no	94	Hacendado	Bifidus	si	natural	no	no
24	Danone	activa	no	natural con soja	no	no	95	Hacendado	Bifidus	no	natural	no	no
25	Danone	Activa	no	natural	no	si	96	Hacendado	Bifidus	no	soja	no	si
26	Danone	densia	no	natural	si	si	97	Hacendado	con fruta	si	fresa	si	no
27	Danone	densia	no	natural	no	no	98	Hacendado	con fruta	si	manzana	si	no
28	Danone	Griego	no	natural	no	no	99	Hacendado	con fruta	si	melocotón	si	no
29	Danone	normal	no	natural	no	si	100	Hacendado	con fruta	si	pera	si	no
30	Danone	normal	no	natural	no	no	101	Hacendado	con fruta	si	piña	si	no
31	Danone	original	no	natural	no	si	102	Hacendado	crystal	no	fresa	no	no
32	Danone	original	no	natura	no	no	103	Hacendado	crystal	no	natural	no	si
33	Danone	sabor	no	frutas del bosque	no	no	104	Hacendado	griego	no	con frutos secos cereales y miel	no	no
34	Danone	sabor	no	macedonia	no	no	105	Hacendado	griego	no	natural	no	no
35	Danone	sabor	no	fresa	no	no	106	Hacendado	griego	no	natural	no	si
36	Danone	sabor	no	coco	no	no	107	Hacendado	normal	si	natural	no	no
37	Danone	vitaleña	si	melocoton	no	no	108	Hacendado	normal	no	natural	no	si
38	Danone	vitaleña	si	natural	no	no	109	Hacendado	normal	no	natural	no	no
39	Danone	Danissimo	no	natural	no	si	110	Hacendado	normal	si	natural	si	no
40	Delisse	griego	no	natural	no	no	111	Hacendado	sabor	no	fresa	no	si
41	Delisse	sabor	no	albaricque	no	no	112	Hacendado	sabor	no	soja	no	si
42	Delisse	sabor	no	fresa	no	no	113	Kaiku	bifidus	si	natural	no	no
43	Delisse	sabor	no	melocoton	no	no	114	Kaiku	bifidus	no	natural	no	no
44	Delisse	sabor	no	cereza	no	no	115	Kaiku	bifidus	no	natural	no	si
45	Delisse	sabor	no	limón	no	no	116	Kaiku	con fruta	no	melocoton	no	no
46	Delisse	sabor	no	frambuesa	no	no	117	Kaiku	con fruta	no	albaricque	no	no
47	Delisse	con fruta	si	albaricque	no	no	118	Kaiku	Griego	no	natural	no	no
48	Delisse	con fruta	si	cereza	no	no	119	Kaiku	normal	no	natural	no	si
49	Delisse	con fruta	si	frambuesa	no	no	120	Kaiku	normal	si	natural	no	no
50	Delisse	con fruta	si	fresa	no	no	121	Kaiku	Calcium	no	con fresa	no	no
51	Delisse	con fruta	si	melocoton	no	no	122	Kaiku	Sin lactosa	no	natural	no	si
52	Delisse	con fruta	si	piña	no	no	123	La Fageda	normal	si	natural	no	no
53	Dia	Bifidus	no	natural	no	no	124	La Fageda	normal	no	natural	no	si
54	Dia	Bifidus	no	fresa	no	si	125	La Fageda	normal	no	natural	no	no
55	Dia	Bifidus	no	natural	no	si	126	Milsani	Bifidus	no	con cereales	no	no
56	Dia	Griego	no	natural	no	no	127	Milsani	con fruta	si	fresa	si	no
57	Dia	normal	no	natural	no	si	128	Milsani	cremoso	no	con fresa	no	si
58	Dia	normal	no	natural	no	no	129	Milsani	cremoso	no	natural	no	si
59	Dia	sabor	no	macedonia	no	si	130	Milsani	griego	no	con fresa	no	si
60	Dia	sabor	no	plátano	no	no	131	Milsani	griego	no	con melocotón	no	si
61	Dia	sabor	no	fresa	no	no	132	Milsani	griego	no	natural	no	si
62	Dia	petit dia	no	frutas del bosque	no	si	133	Milsani	griego	no	natural	no	no
63	Dia	petit	no	fresa	no	no	134	Milsani	normal	no	natural	no	no
64	Dia	petit	no	plátano	no	no	135	Nestle	Griego	no	natural	no	si
65	Dia	normal	si	natural	si	no	136	Nestle	Sveltesse	Si	fresa y fresa silvestre	no	no
66	El Corte Inglés	con fruta	si	fresa	si	no	137	Nestle	Sveltesse	Si	manzana/pera	no	no
67	El Corte Inglés	con fruta	si	melocotón	si	no	138	Nestle	Sveltesse	Si	cereza	no	no
68	El Corte Inglés	normal	no	natural	no	si	139	Nestle	Sveltesse	Si	mora y frambuesa	no	no
69	El Corte Inglés	normal	si	natural con vitaminas	no	no	140	Nestle	Sveltesse	Si	melocotón y nectarina	no	no
70	El Corte Inglés	normal	no	natural	no	no	141	Nestle	La Lechera	no	limón	no	no
71	El Corte Inglés	sabor	no	fresa	no	no							

Tabla 3.1 Descripción de las 141 muestras de yogur utilizadas para el estudio.

3.2 Análisis NIR y procesado de los espectros de reflectancia

Los espectros de reflectancia fueron medidos mediante un analizador NIR Luminar 5030 Miniature “Hand-held” (Figura 3.1a). Este equipo utiliza la tecnología AOTF (Filtro Acusto-Óptico Sintonizable). Tiene un detector InGaAs y el fundamento básico de su funcionamiento es el siguiente: un haz de luz se dirige hacia la muestra, choca con la misma y la luz reflejada es recogida por el detector que envía la información al ordenador tal y como se indica en la Figura 3.1b.

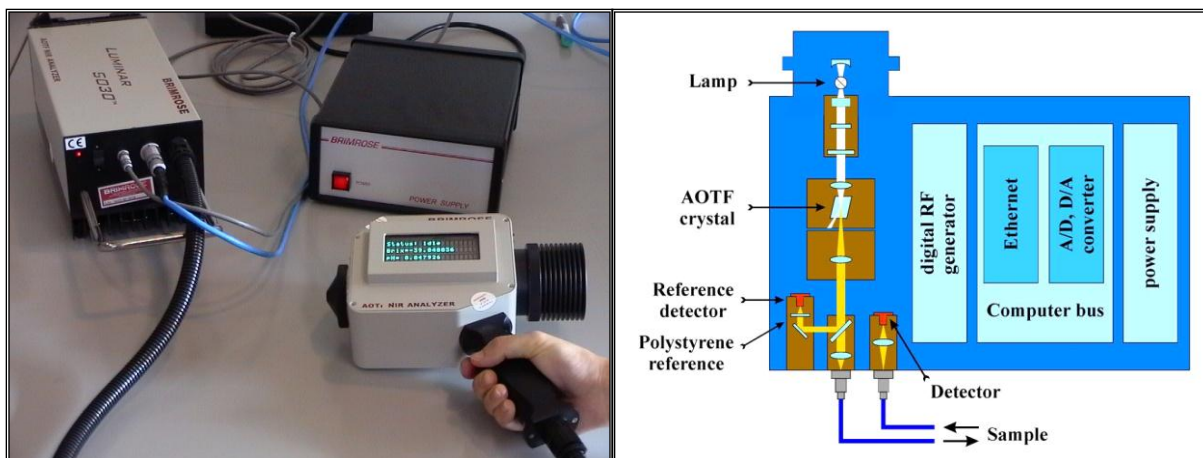


Figura 3.1. a) Espectrofotómetro AOTF-NIR Luminar 5030. b) Esquema de funcionamiento de espectrofotómetro Luminar 5030 (www.brimrose.com).

El rango de longitud de onda empleado para la medición fue de 1100 a 2300 nm, a intervalos de 2 nm. La velocidad de escaneo fue de 16.000 longitudes de onda por segundo. Para realizar una medición, el espectrofotómetro toma 50 espectros y proporciona el espectro medio; por lo tanto al tomar dos mediciones se obtuvieron 100 espectros de cada muestra. El área de muestreo es un círculo de 5 mm para el caso de medidas sólidas. Para el caso de los líquidos se introduce una sonda específica (Figura 3.2).



Figura 3.2 Sonda de líquidos del espectrofotómetro BRIMROSE.

Antes de medir, se debe realizar la calibración del aparato. Tal y como se explicó en el apartado previo, la muestra de yogur se analizó en su propio envase, una vez homogeneizada. El analizador se dispuso guiado mediante una columna y se sumergió completamente en la muestra. Se obtiene el valor de la reflectancia (%R) para cada longitud de onda medida. El espectro de reflectancia de cada muestra fue

calculado como la media de los espectros registrados en dos medidas consecutivas con homogeneización intermedia.

Después de la adquisición del espectro de cada muestra y antes de la siguiente toma, la sonda se limpiaba con agua destilada para eliminar todos los posibles restos de la muestra anterior.

3.3 Tratamiento estadístico de los datos

El procesado de los espectros de reflectancia se llevó a cabo mediante el software quimiométrico Unscrambler versión 8.0.5. Este código permitió interpretar el contenido de los diferentes componentes del yogur a partir de su espectro de reflectancia promedio.

El programa UNSCRAMBLER incluye un amplio rango de aplicaciones y procedimientos para el procesado y análisis de datos multivariantes obtenidos por espectroscopia así como un gran número de opciones y representaciones gráficas. Se va a tomar el valor de la composición de las muestras de yogur que figuran en su etiquetado como las variables de referencia y los valores de reflectancia obtenidos en el ensayo como los valores de predicción; de esta manera se plantean distintos modelos de regresión, uno por cada constituyente.

Tras la obtención de las curvas espectrales se podría realizar la segunda derivada de los datos, transformación cuyo objetivo es eliminar ruido, es decir, la parte del espectro que no da información y puede llevar a conclusiones erróneas. De esta manera se podría identificar con mayor claridad los picos de absorción de los diferentes parámetros estudiados. Los resultados obtenidos en el ensayo preliminar con la segunda derivada no fueron satisfactorios, así que no se utilizó para la realización de los modelos presentados a continuación.

Seguidamente se dividen las muestras en un ratio 3/1 siendo las primeras utilizadas para las calibraciones en los análisis, mientras que el tercio restante se corresponde con las muestras que hay que validar y/o predecir.

El primer análisis realizado es la Regresión Parcial por Mínimos Cuadrados (PLS). Durante el proceso de obtención de modelos, se eliminan los outliers y las variables con menor peso en la ecuación de calibración. La ecuación de regresión es el ejemplo de valor teórico más ampliamente reconocido entre todas las técnicas multivariantes y puede tener una forma tipo:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \dots + \beta_n X_n$$

En cada modelo realizado con el programa se identifican los siguientes parámetros:

- Slope: pendiente de la recta de regresión.
- Offset: el punto donde la recta de regresión corta al eje de ordenadas
- Correlación (r): coeficiente de correlación, grado de la relación lineal existente entre dos variables. Puede tomar valores entre -1 y +1. Valores positivos indican relación directa y valores negativos indican relación indirecta. El valor 0 indica que las variables son independientes, el valor |1| indica una dependencia total entre las dos variables.
- R²: coeficiente de determinación, se obtiene elevando al cuadrado el coeficiente de correlación.
- Elementos (N): número de datos utilizados.
- SEC: error estándar de calibración.
- SEP: error estándar de predicción.
- Bias: sesgo, diferencia entre la esperanza matemática de un estimador y el valor del parámetro que estima.

El modelo de calibración será más preciso cuando el valor de la pendiente de regresión se acerque a 1; el punto donde la recta corta al eje de ordenadas se acerque a 0; la correlación y R² se acerquen a |1| y SEC, SEP y Bias se anulen.

Durante la etapa de calibración, la técnica PLS utiliza tanto la información de la matriz de los datos espectroscópicos (matriz X) como la información de la matriz de concentraciones (matriz Y) obteniéndose unas variables auxiliares llamadas variables latentes, factores o componentes. En este Trabajo Fin de Máster, la técnica PLS proporciona una calibración útil para clasificar los distintos niveles de concentración existentes tal y como afirman William y Norris (2001). Por lo tanto, indica a grandes rasgos la existencia de distintos clústeres dentro de las muestras de calibración y la capacidad del NIRS para diferenciarlas.

Capítulo 4

Resultados y Discusión

4.1 Introducción

A continuación se muestra el espectro de reflectancia de las 141 muestras (Figura 4.1). La información que se va a usar para predecir la composición de los diferentes componentes viene contenida en estas curvas espectrales. Se hace difícil extraer la información relevante sólo identificando los numerosos picos solapados de la figura. El paso fundamental en la técnica espectroscópica es extraer datos cuantitativos de los espectros. En este estudio se utiliza el algoritmo PLS para alcanzar este propósito.

La abscisa de la Figura 4.1 representa las longitudes de onda, desde 1100 a 2300 nm, y la ordenada muestra la reflectancia espectral.

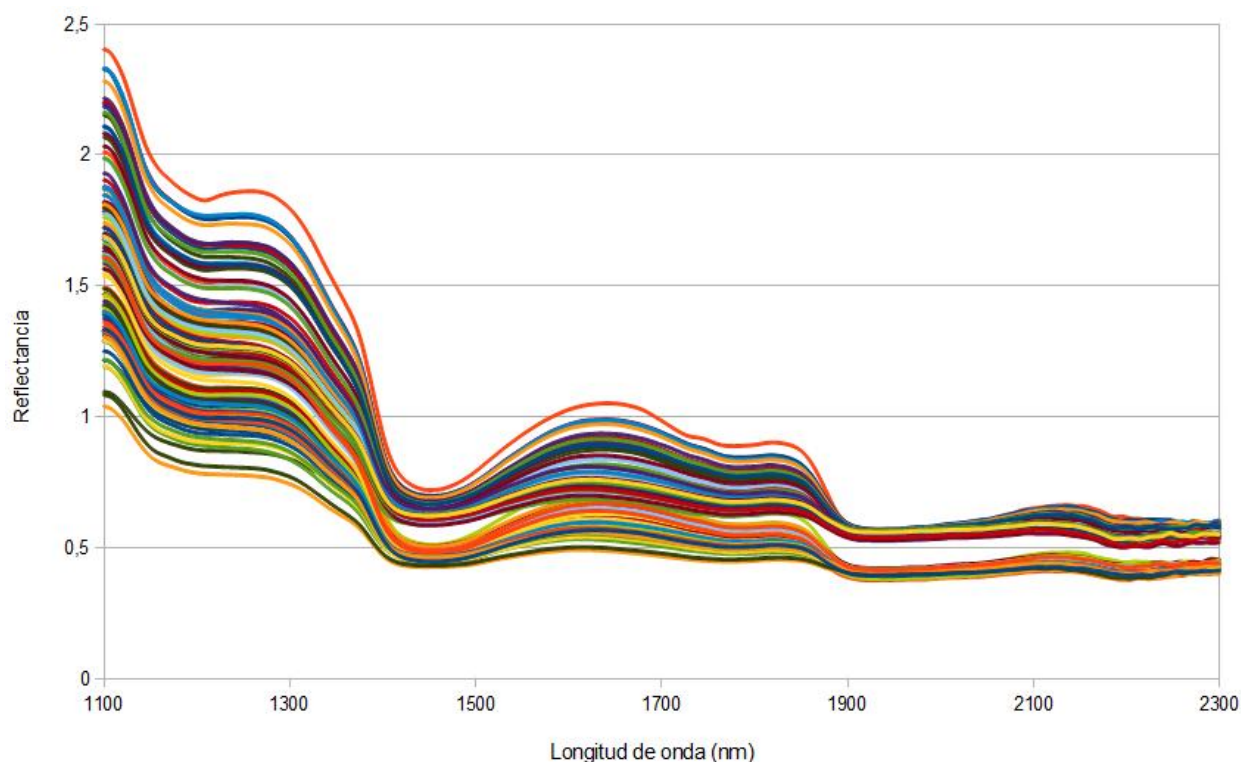


Figura 4.1 Espectros de reflectancia de las diferentes variedades de yogur.

En los siguientes apartados, se ofrece un modelo predictivo para cada uno de los componentes químicos del yogur que figuran en el etiquetado: proteínas, hidratos

de carbono, grasas, minerales y vitaminas. Seguidamente se planteará un modelo de los mismos utilizando una única marca comercial.

4.2 Proteínas

El valor proteico de las muestras de yogur oscila entre 1.9 y 6.3 con una desviación típica (δ) de 0.6 (Tabla 4.1).

	Rango	Media	Desviación típica
<i>Proteínas</i>	1.90 – 6.30	3.78	± 0.64

Tabla 4.1 Rango, valor medio y desviación típica del contenido en proteínas de la muestra de yogures analizada.

Del total de muestras de yogur (141), 106 servirán para hacer el modelo de calibración y las restantes 35 se utilizarán para la validación externa.

Para obtener un buen modelo de calibración, es decir un modelo robusto, es necesario eliminar algunos valores outliers y variables con poco peso en la ecuación de calibración. Así, para el modelo de calibración al final nos hemos quedado con un total de 84 muestras.

Calibración		Validación cruzada	
<i>Elements</i>	84	<i>Elements</i>	84
<i>Slope</i>	0.658	<i>Slope</i>	0.625
<i>Offset</i>	1.293	<i>Offset</i>	1.421
<i>Correlation</i>	0.811	<i>Correlation</i>	0.773
<i>RMSEC</i>	0.296	<i>RMSEP</i>	0.322
<i>SEC</i>	0.298	<i>SEP</i>	0.323
<i>Bias</i>	3.207×10^{-7}	<i>Bias</i>	0.003

Tabla 4.2 Parámetros de calibración y validación cruzada para el contenido en proteínas de la muestra de yogures analizada.

El coeficiente de correlación entre los datos espectrales y el contenido de proteínas en el yogur fue de 0.810, con un error estándar de calibración (SEC) de

0.297 y un error estándar de predicción (SEP) de 0.323 (ver Tabla 4.2) inferior en ambos casos a la propia desviación típica de la muestra estudiada. Las Figuras 4.2 y 4.3 muestran por separado los resultados de calibración y validación cruzada o “cross-validation”, respectivamente.

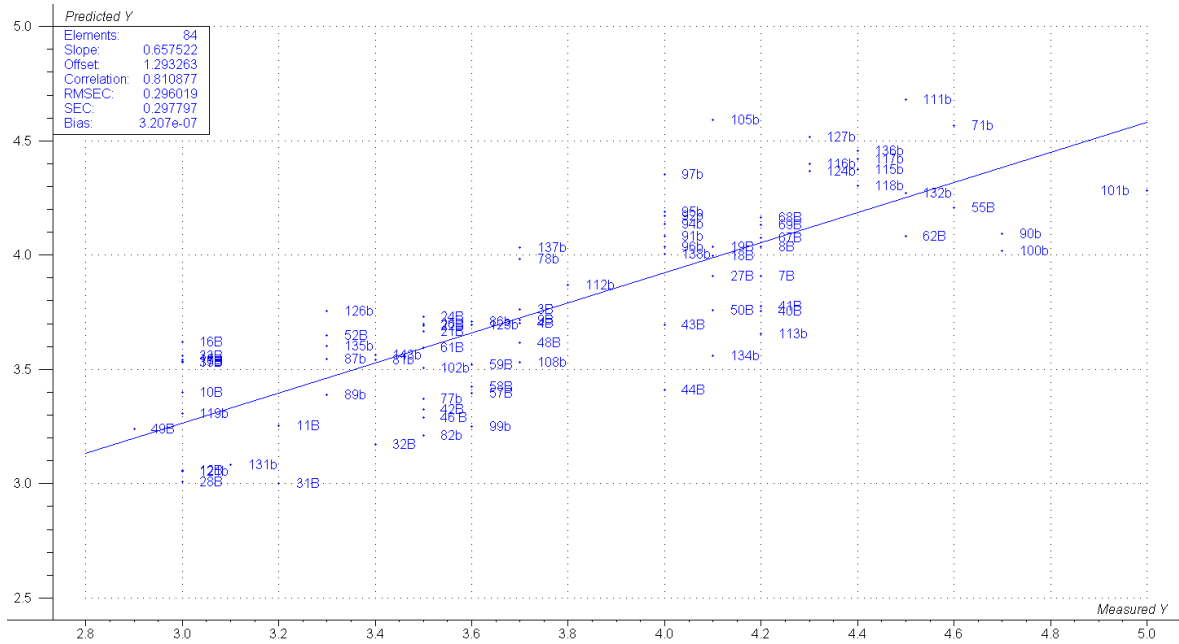


Figura 4.2 Modelo de calibración para las proteínas del yogur.

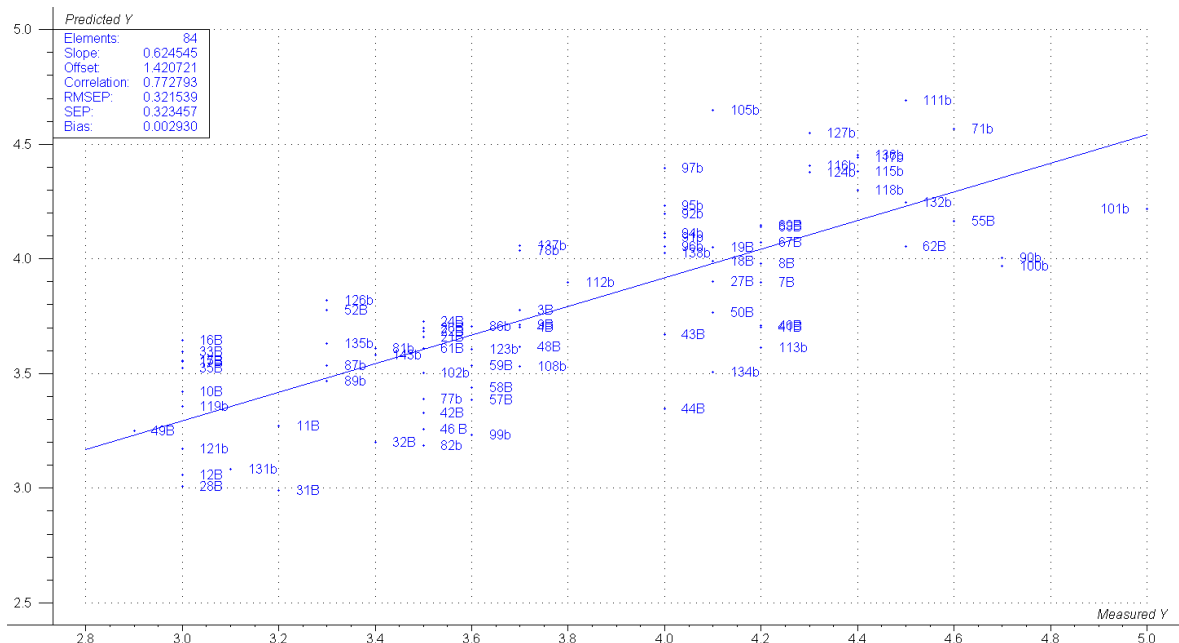


Figura 4.3 Modelo de validación cruzada para las proteínas del yogur.

Para la validación externa (Figura 4.4), se utiliza el grupo de 35 muestras antes citado. Se utiliza el modelo construido y validado internamente para predecir el contenido en proteínas de estas muestras. De las 35 muestras se emplean 32 para hacer el modelo de validación. Se quedaron fuera del modelo las muestras 2, 80 y 139, siendo las dos últimas los únicos yogures griegos presentes en el grupo de validación. El coeficiente de correlación de la regresión lineal múltiple entre los valores predichos y medidos es de 0.539 con un SEP de 0.522.

Estos resultados no difieren mucho de los presentados por Tsenkova et al. (1999) para la proteína de la leche.

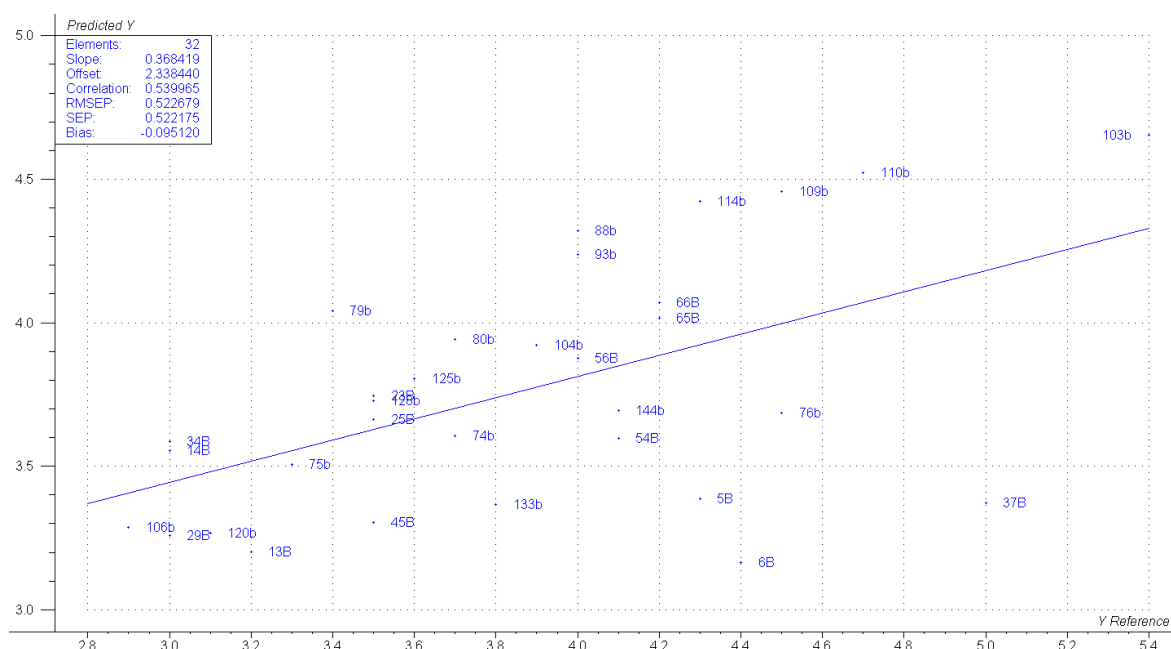


Figura 4.4 Modelo de validación externa para las proteínas del yogur.

4.3 Hidratos de carbono

En la Tabla 4.3 se detalla el rango de valores de los hidratos de carbono en las muestras de yogur junto con la desviación típica.

El grupo de calibración cuenta en total con 106 muestras y el de validación externa con 35. Para hacer el modelo de calibración se han usado 100 muestras de las 106, es decir, se han eliminado los valores outliers. En la Figura 4.5 se puede ver la representación de las rectas de regresión de calibración y validación interna. El color azul pertenece a la calibración y el rojo a la validación. Como se puede ver, las

dos rectas están solapadas lo que significa que el modelo de calibración es robusto y tiene un alto valor predictivo del contenido en carbohidratos. También se puede constatar esto observando la Tabla 4.4 que contiene los valores estadísticos: las correlaciones son altas, 0.959 y 0.913 para los modelos de calibración y validación respectivamente, las pendientes de las rectas se acercan a 1 y el SEC y el SEP son bajos y muy inferiores a la desviación típica de la muestra.

	Rango	Media	Desviación típica
<i>Hidratos de carbono</i>	2.80 – 19.7	9.55	± 4.48

Tabla 4.3 Rango, valor medio y desviación típica del contenido en hidratos de carbono de la muestra de yogures analizada.

Calibración		Validación cruzada	
<i>Elements</i>	100	<i>Elements</i>	100
<i>Slope</i>	0.921	<i>Slope</i>	0.921
<i>Offset</i>	0.738	<i>Offset</i>	0.743
<i>Correlation</i>	0.959	<i>Correlation</i>	0.913
<i>RMSEC</i>	1.265	<i>RMSEP</i>	1.888
<i>SEC</i>	1.271	<i>SEP</i>	1.898
<i>Bias</i>	2.108x10 ⁻⁶	<i>Bias</i>	0.003

Tabla 4.4 Parámetros de calibración y validación cruzada para el contenido en hidratos de carbono de la muestra de yogures analizada.

En la Figura 4.6 aparecen marcadas las longitudes de onda que más peso tienen en el modelo. Las longitudes de onda señaladas son las correspondientes a enlaces C-H.

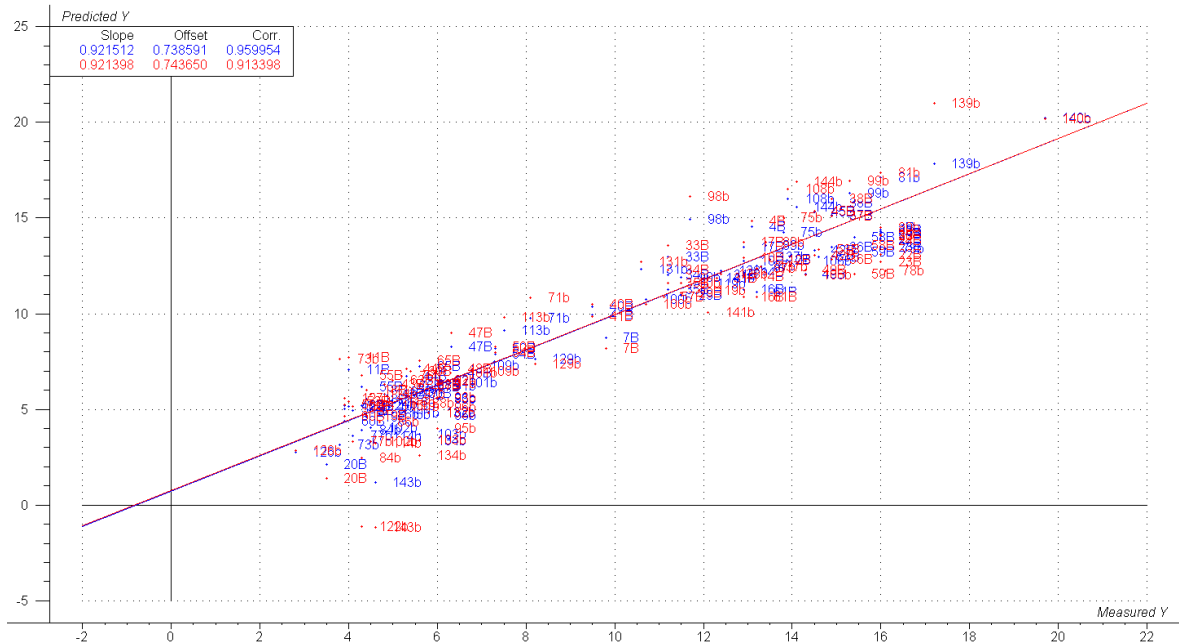


Figura 4.5 Rectas de regresión de la calibración y la validación cruzada de los hidratos de carbono.

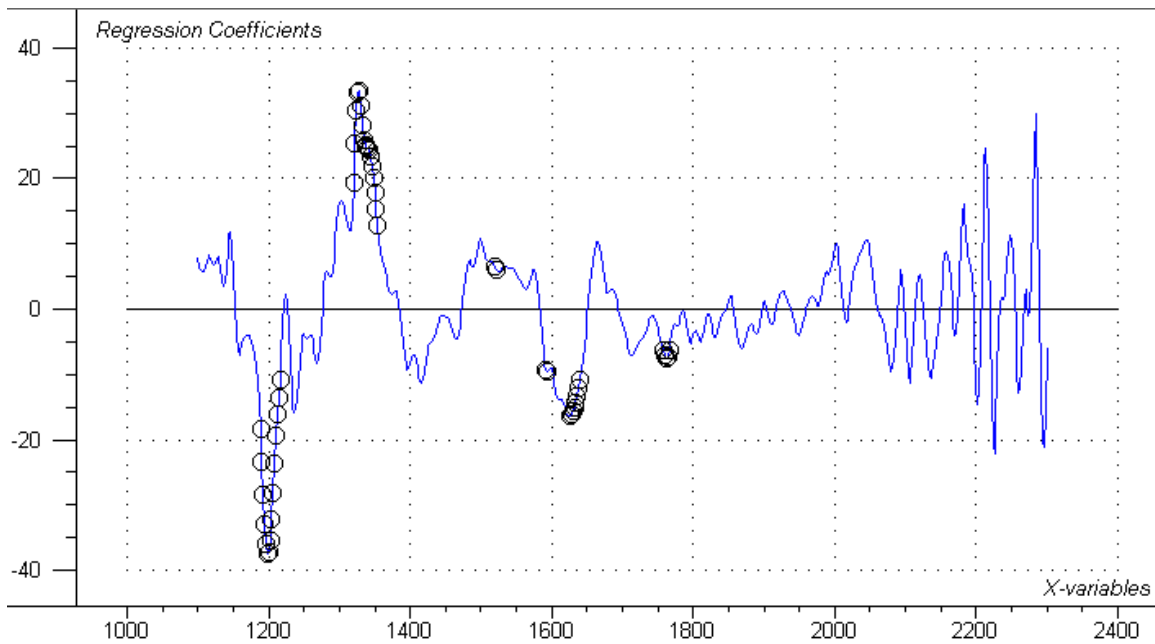


Figura 4.6 Longitudes de onda con más peso en la ecuación de calibración.

Respecto a la validación externa, que sirve para confirmar la robustez del modelo de calibración, se han usado 32 muestras de las 35 seleccionadas. Se ha obtenido una correlación de 0.917 (Figura 4.7). Este valor corrobora que la predicción del contenido en carbohidratos mediante la tecnología NIRS es buena.

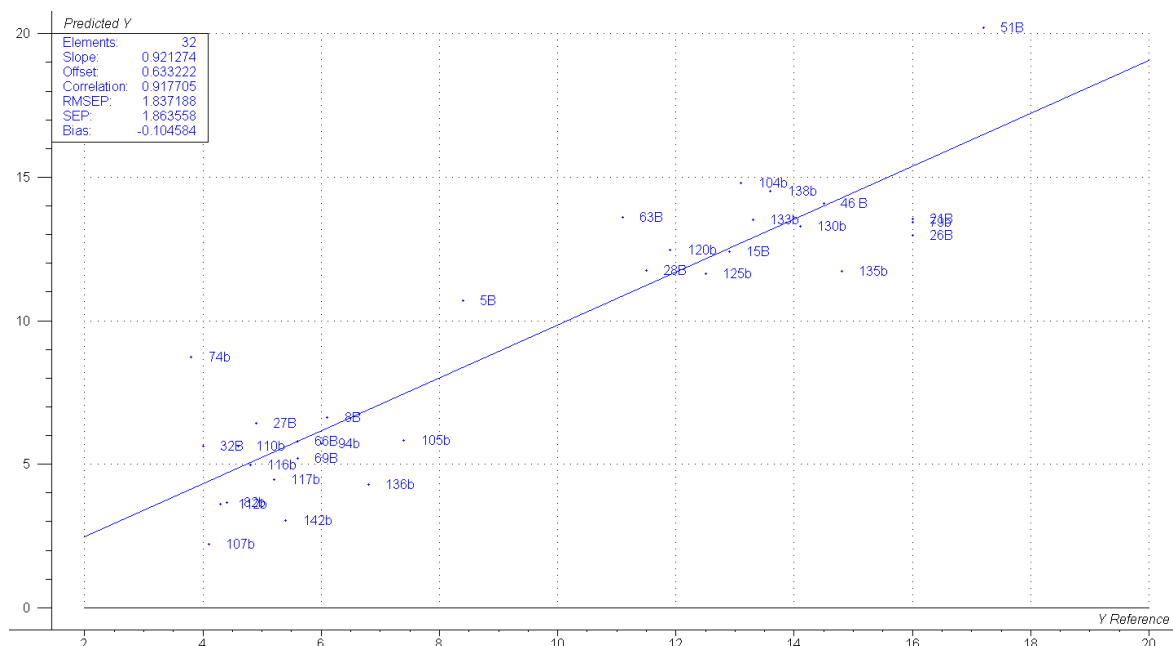


Figura 4.7 Recta de regresión del modelo de validación externa para los carbohidratos.

4.3.1 Azúcares

Se denomina técnicamente azúcares a los diferentes hidratos de carbono ya sean monosacáridos, disacáridos o polisacáridos, que generalmente tienen sabor dulce.

En el etiquetado de algunos yogures no se especifica el contenido en azúcares, por lo que el total de muestras para los modelos de calibración y validación es inferior, concretamente 79 y 27 respectivamente.

	Rango	Media	Desviación típica
Azúcares	1.70 – 15.6	8.33	± 4.36

Tabla 4.5 Rango, valor medio y desviación típica del contenido en azúcares de la muestra de yogures analizada.

Al tratarse de hidratos de carbono lo esperable es que los modelos de calibración y validación sean igual de buenos que los de éstos. En la Tabla 4.5 se detalla el rango de contenido en azúcares, su valor medio y desviación típica.

Para el modelo de calibración, de las 79 muestras seleccionadas se han eliminado 18 muestras pertenecientes a outliers o valores que no tenían peso en el modelo. A continuación se muestra la representación gráfica de las rectas de regresión para el modelo de calibración y la “cross-validation” (Figura 4.8) y los valores estadísticos de ambos (Tabla 4.6). Como se puede comprobar los datos resultantes también son muy buenos por lo que el modelo de calibración es preciso y robusto.

Calibración		Validación cruzada	
<i>Elements</i>	61	<i>Elements</i>	61
<i>Slope</i>	0.895	<i>Slope</i>	0.866
<i>Offset</i>	0.896	<i>Offset</i>	1.148
<i>Correlation</i>	0.946	<i>Correlation</i>	0.933
<i>RMSEC</i>	1.372	<i>RMSEP</i>	1.523
<i>SEC</i>	1.383	<i>SEP</i>	1.536
<i>Bias</i>	8.794×10^{-7}	<i>Bias</i>	0.005

Tabla 4.6 Parámetros de calibración y validación cruzada para el contenido en azúcares de la muestra de yogures analizada.

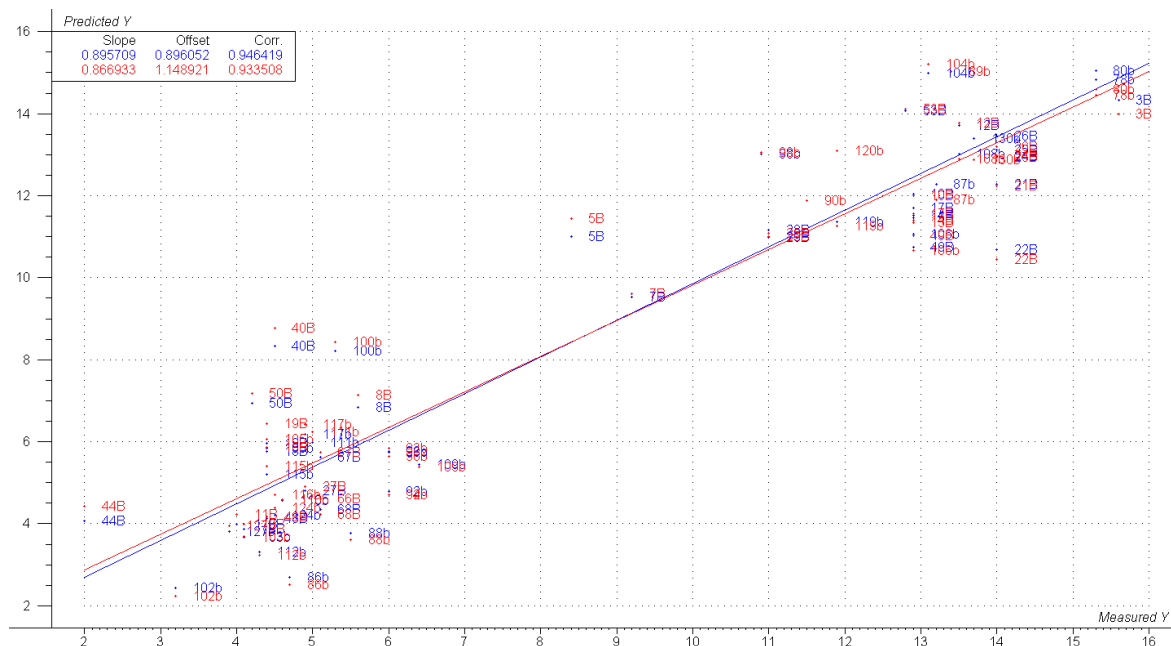


Figura 4.8 Rectas de regresión de las ecuaciones de calibración y validación de los azúcares.

Para la validación externa se han utilizado 24 de las 27 muestras seleccionadas para tal fin. Los resultados son buenos, con una correlación igual a 0.897 (Figura 4.9).

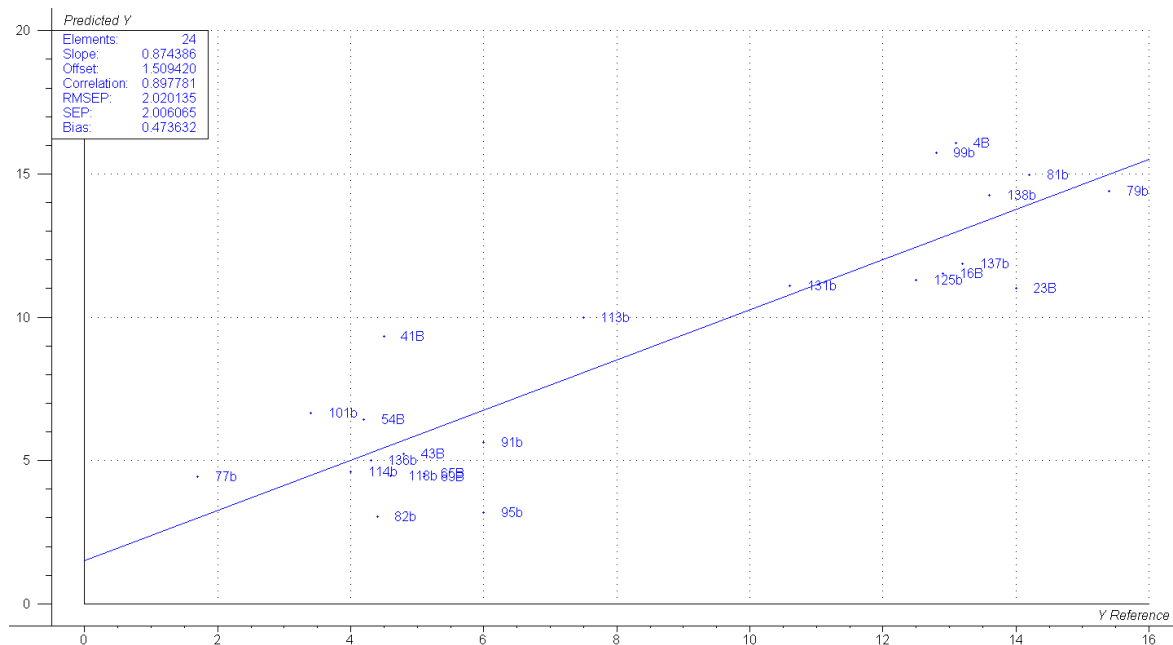


Figura 4.9 Modelo de validación externa para los azúcares.

Tanto en la Figura 4.8 como en la 4.9 podemos observar la presencia de dos grupos. Esto se debe a que en el total de las muestras contábamos con yogures azucarados y no azucarados.

4.4 Grasas

En la Tabla 4.7 se muestra el rango de valores del contenido en grasa, junto a su desviación típica.

	Rango	Media	Desviación típica
Grasas	0 – 10.0	2.73	± 2.86

Tabla 4.7 Rango, valor medio y desviación típica del contenido en grasas de la muestra de yogures analizada.

Dentro de la variedad de yogures que hay en este estudio, respecto a la grasa, se manifiestan dos grupos muy diferenciados: los yogures griegos y el resto. En la Tabla 4.8 se pueden observar las diferencias en el contenido en grasa de los dos grupos. Como podemos ver, al mostrar los estadísticos básicos por separado, los rangos y las desviaciones típicas son menores, haciéndose los lotes más homogéneos.

	Tipo de yogur	Rango	Media	Desviación típica
Grasas	Griego	6.50 – 10.0	8.98	± 1.16
	Resto	0 – 4.50	1.71	± 1.39

Tabla 4.8 Rango, valor medio y desviación típica del contenido en grasas para la muestra separada por tipo de yogur como griego y resto.

Debido a estas diferencias en el contenido de grasa se va a plantear primero un modelo con todo el conjunto de yogures y después otro modelo sin los yogures griegos. Como en el etiquetado de muchos yogures también aparece el contenido de grasas saturadas, se va a reservar un apartado para realizar un modelo predictivo para éstas.

4.4.1 Modelo con todos los yogures

En la Figura 4.10 se representan las rectas de regresión de las ecuaciones de calibración y validación cruzada para la grasa en todas las muestras de yogur. Las correlaciones son 0.965 y 0.958 respectivamente. El SEC es igual a 0.587 y el SEP 0.642. Todos los valores estadísticos se recogen en la Tabla 4.9. Son unos resultados realmente buenos; sin embargo muchos de los valores outliers que hemos eliminado para realizar el modelo (se contaba con un total de 106 muestras de las que nos hemos quedado con 87) se trataban de yogures griegos. Este tipo de yogures al poseer un alto contenido en grasa tiene una textura totalmente diferente al resto de yogures; son más viscosos. Esta característica unida a una saturación de la sonda de medida puede ser la causa que provoque el hecho de que salgan tantos valores outliers dentro de los yogures griegos.

Si se observa la Figura 4.10 se puede apreciar la gran diferencia en contenido en grasa entre los yogures griegos y el resto de yogures.

Calibración		Validación cruzada	
<i>Elements</i>	87	<i>Elements</i>	87
<i>Slope</i>	0.932	<i>Slope</i>	0.922
<i>Offset</i>	0.139	<i>Offset</i>	0.156
<i>Correlation</i>	0.965	<i>Correlation</i>	0.958
<i>RMSEC</i>	0.583	<i>RMSEP</i>	0.638
<i>SEC</i>	0.587	<i>SEP</i>	0.642
<i>Bias</i>	1.639×10^{-7}	<i>Bias</i>	-0.003

Tabla 4.9 Parámetros de calibración y validación cruzada para el contenido en grasas de la muestra de yogures analizada.

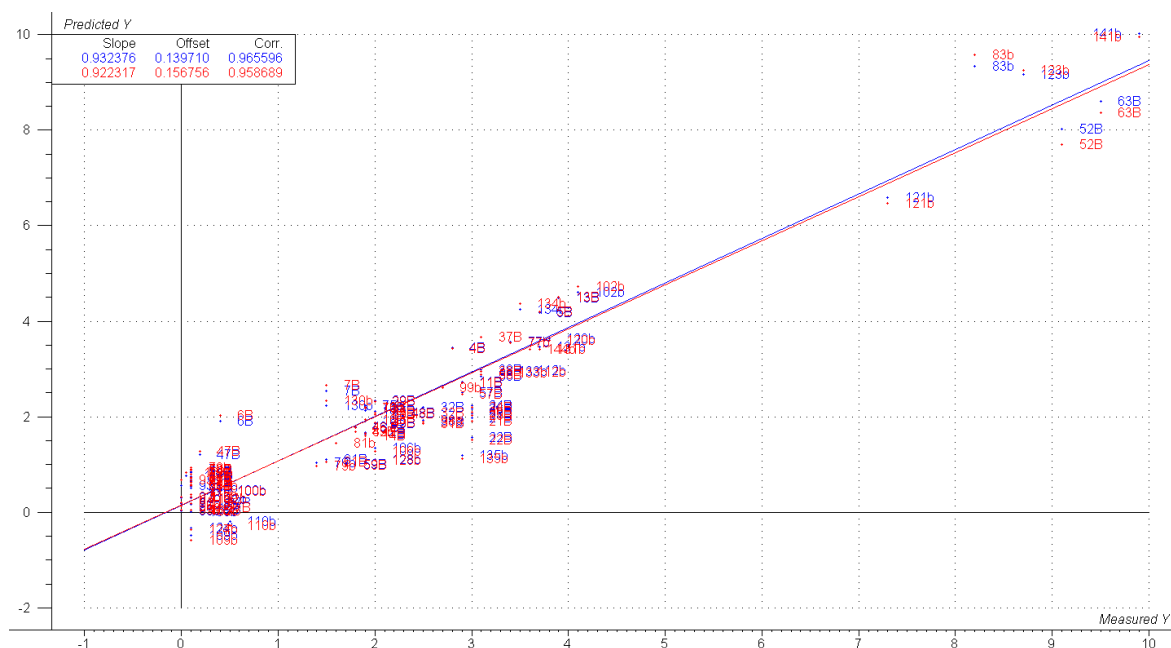


Figura 4.10 Ecuaciones de calibración y validación cruzada para la grasa.

En la Figura 4.11 se representan las longitudes de onda que poseen más peso en este modelo predictivo. Predominan las longitudes de onda comprendidas entre los 1100-1250 nm, donde tiene lugar el segundo sobretono de los enlaces C-H; en torno a los 1700 nm, que se caracteriza por el primer sobretono de los enlaces C-H; y en el rango de los 2200-2400 nm, en el que aparecen las bandas de combinación de las distintas formas de vibración de los enlaces C-H (Murray, 1986; Murray y Williams, 1987; Shenk et al., 1992). Se destacan también dos tramos importantes:

1400-1600 nm y 1900-2100 nm. El primero perteneciente a los enlaces C-H y el segundo a los enlaces C-O + O-H. Como es sabido, la fracción química de las grasas está formada, en gran medida, por ácidos grasos cuya estructura química está compuesta por largas cadenas hidrocarbonadas que explican las longitudes de onda seleccionadas en este caso.

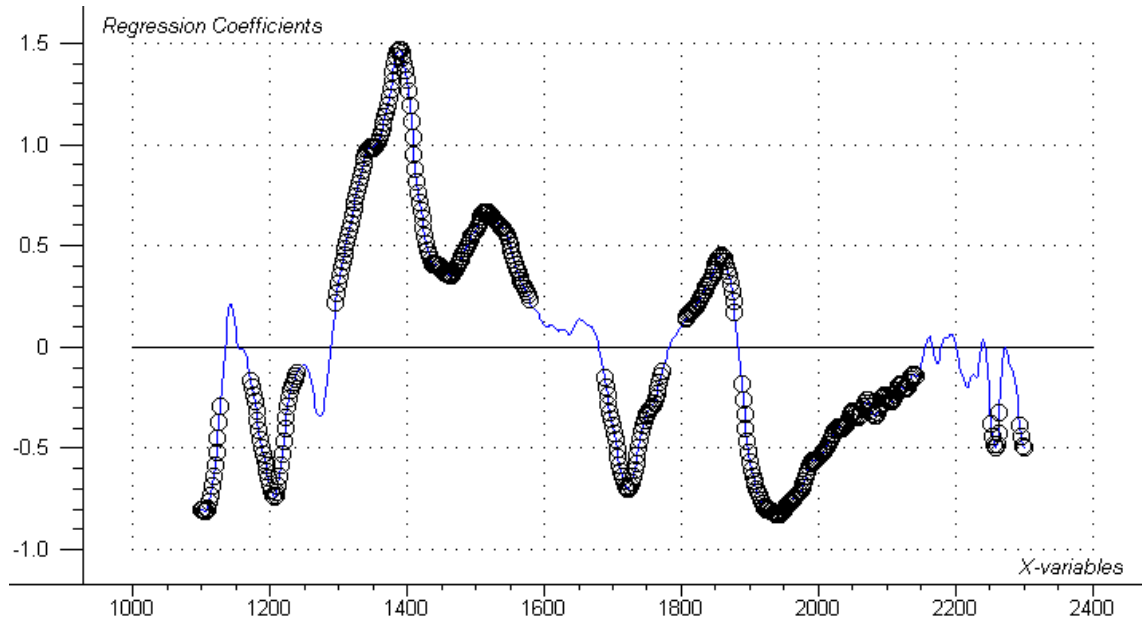


Figura 4.11 Representación de las longitudes de onda más representativas en el modelo.

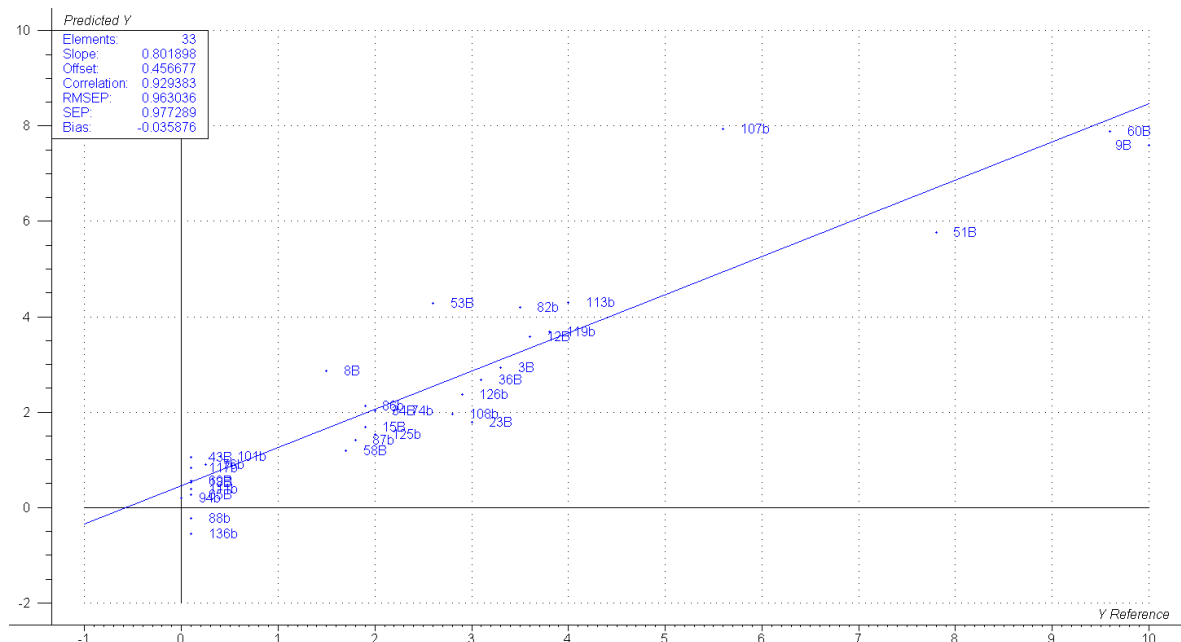


Figura 4.12 Validación externa para las grasas.

Para la validación externa se contaba con un total de 35 de las que se han utilizado 33. El coeficiente de correlación entre los valores predichos y medidos muestra una capacidad predictiva muy buena de 0.929 como se muestra en la Figura 4.12.

4.4.2 Modelo sin yogures griegos

Como se ha explicado anteriormente los yogures griegos son muy distintos al resto de yogures. Eso impide crear un modelo más preciso puesto que los yogures griegos suelen aparecer como valores outliers. Es por este motivo que se ha preferido repetir el modelo predictivo de las grasas, esta vez prescindiendo de los yogures griegos, para comprobar si el modelo resultante es más robusto que el anterior.

Atendiendo al modelo de calibración y de “cross-validation” (Figura 4.13) los coeficientes de correlación resultantes son muy parecidos al modelo con yogures griegos. Se disponía de un total de 90 muestras de las que 3 se han eliminado (outliers). En la Tabla 4.10 se recogen todos los datos estadísticos.

Calibración		Validación cruzada	
<i>Elements</i>	87	<i>Elements</i>	87
<i>Slope</i>	0.918	<i>Slope</i>	0.890
<i>Offset</i>	0.139	<i>Offset</i>	0.182
<i>Correlation</i>	0.958	<i>Correlation</i>	0.936
<i>RMSEC</i>	0.398	<i>RMSEP</i>	0.489
<i>SEC</i>	0.400	<i>SEP</i>	0.492
<i>Bias</i>	-3.754x10 ⁻⁶	<i>Bias</i>	-0.004

Tabla 4.10 Parámetros de calibración y validación cruzada para el contenido en grasas de la muestra de yogures excluyendo los griegos.

A continuación se muestra la recta de la ecuación de la validación externa (Figura 4.14). La correlación es del 0.949, mayor a la resultante en la validación externa del modelo predictivo de todos los yogures en el que se incluían los yogures griegos. Esto demuestra que este modelo es más robusto y más preciso a la hora de predecir el contenido en grasa de los yogures siempre y cuando no se trate de yogures griegos. Por lo tanto, en el caso de la grasa sería recomendable tener dos

modelos predictivos, uno para los yogures griegos y otro para el resto de yogures, a fin de poder dar una mejor predicción de su contenido.

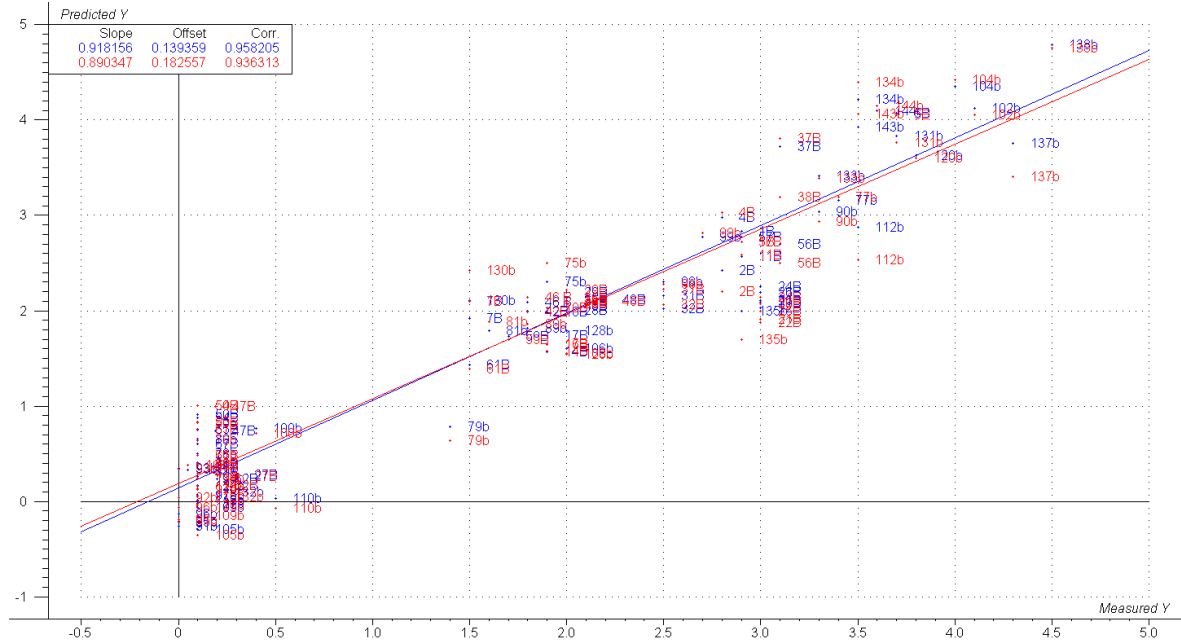


Figura 4.13 Regresión lineal de la calibración y la “cross-validation” de la grasa sin yogures griegos.

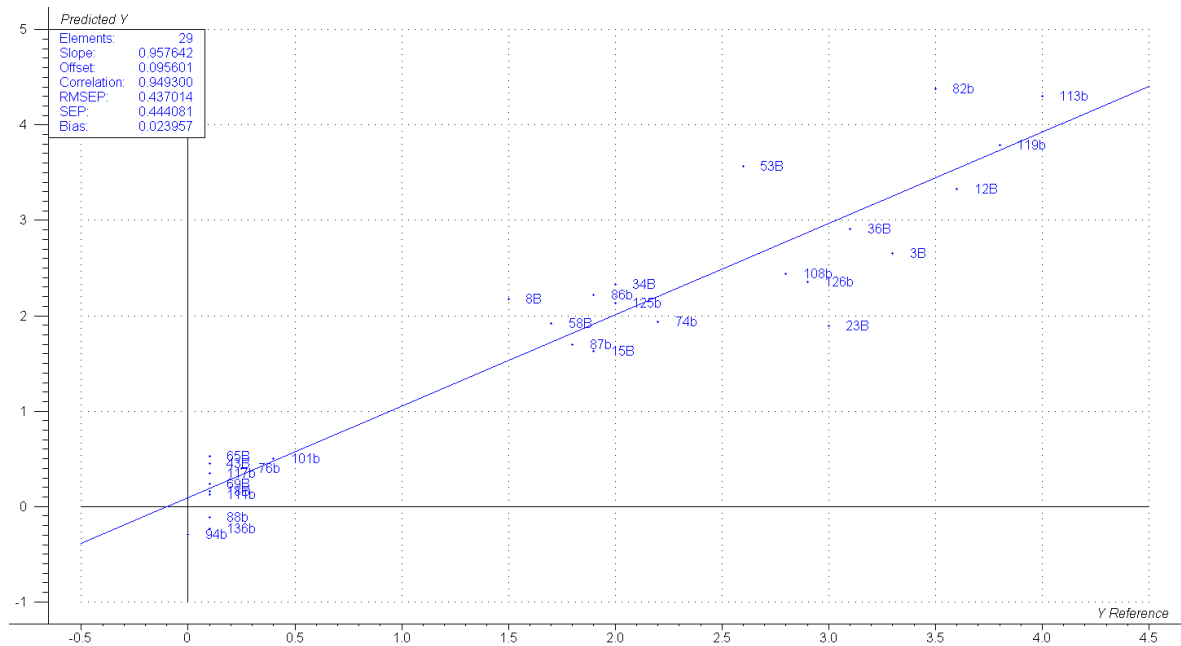


Figura 4.14 Recta de la validación externa para la grasa de los yogures (sin griegos).

4.4.3 Grasas saturadas (GGS)

En la Tabla 4.11 se muestra el rango en el contenido de GGS y su desviación típica. De las 141 muestras de yogur, en 104 aparece el contenido en grasas saturadas. Se van a usar 78 muestras para realizar el modelo de calibración y 26 para el de validación.

	Rango	Media	Desviación típica
<i>Grasas saturadas</i>	0 – 6.50	1.53	± 1.76

Tabla 4.11 Rango, valor medio y desviación típica del contenido en grasas saturadas de la muestra de yogures analizada.

En la Figura 4.15 se representan las gráficas para el modelo de calibración y validación cruzada de las GGS. Los coeficientes de correlación (Tabla 4.12) son próximos a 0.990 por lo que se demuestra una capacidad predictiva excelente para la grasa saturada. Hay que remarcar que en este modelo están presentes yogures griegos, sin embargo, del total de 9 yogures griegos que se incluían en el set de calibración, 5 se han eliminado para realizar el modelo (el número de elementos es de 73). Otra vez se observa que para los yogures griegos se debería tener un modelo predictivo propio.

Calibración		Validación cruzada	
<i>Elements</i>	73	<i>Elements</i>	73
<i>Slope</i>	0.979	<i>Slope</i>	0.970
<i>Offset</i>	0.025	<i>Offset</i>	0.037
<i>Correlation</i>	0.989	<i>Correlation</i>	0.984
<i>RMSEC</i>	0.197	<i>RMSEP</i>	0.240
<i>SEC</i>	0.198	<i>SEP</i>	0.242
<i>Bias</i>	-4.964x10 ⁻⁷	<i>Bias</i>	0.001

Tabla 4.12 Parámetros de calibración y validación cruzada para el contenido en grasas saturadas de la muestra de yogures analizada.

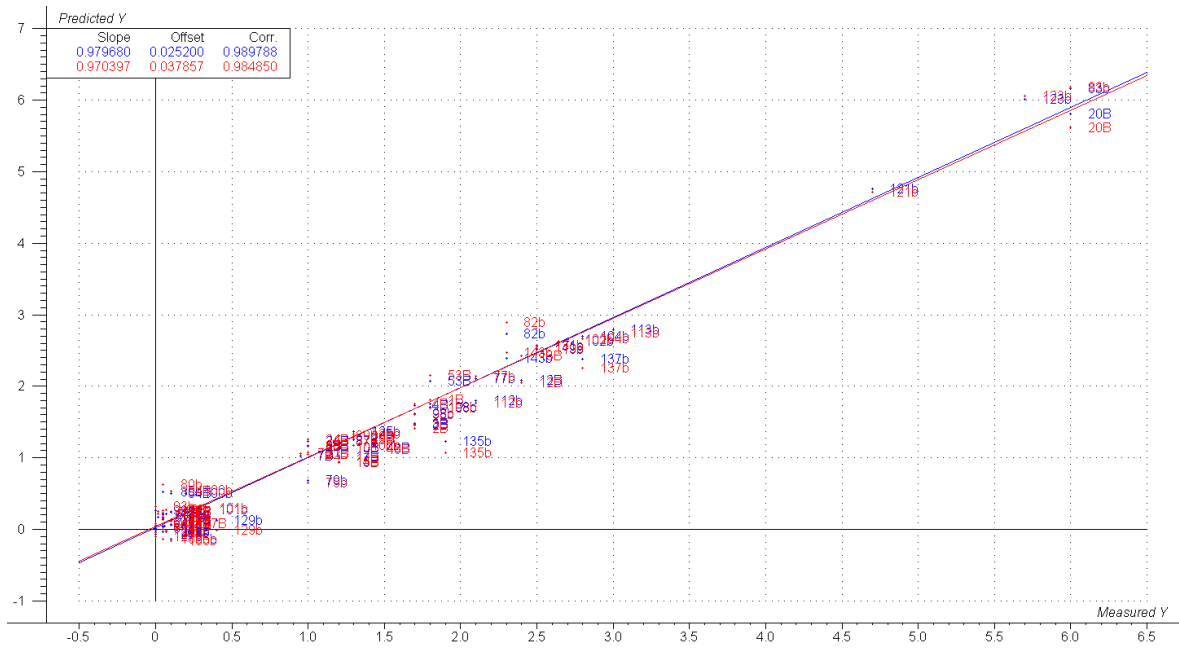


Figura 4.15 Rectas de regresión de las ecuaciones de calibración y validación cruzada para la GGS.

Otra vez más, para comprobar el valor predictivo del modelo realizado se hace la validación externa (Figura 4.16). La correlación es igual a 0.960 y el SEP es bajo e inferior al coeficiente de variación de la muestra, lo que demuestra un alto valor predictivo de este modelo para las GGS.

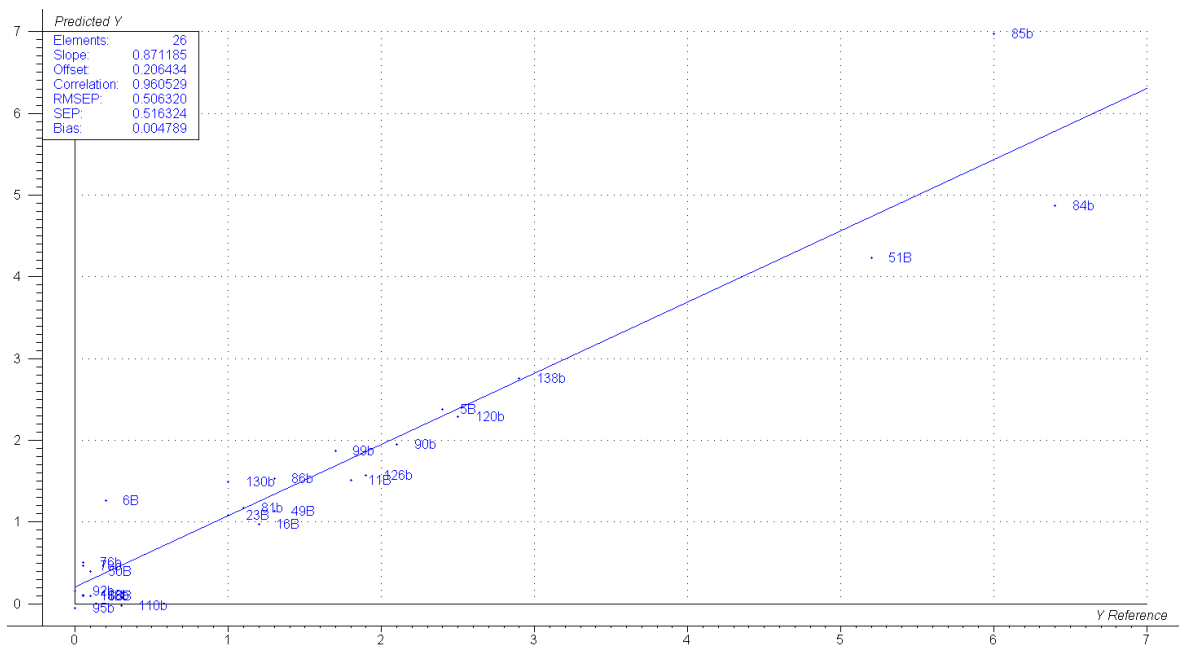


Figura 4.16 Ecuación de validación externa para las GGS.

4.5 Minerales

Según Shenk y Westerhaus (1995) la radiación en el infrarrojo cercano no interactúa con minerales puros, formas iónicas o sales a menos que éstos estén relacionados con la fracción orgánica, o a través de asociaciones con ácidos orgánicos. Es decir, aunque estos componentes no absorban energía en la región del infrarrojo cercano, pueden modificar la absorbancia de otros compuestos a los que se encuentren asociados.

En el etiquetado de algunas muestras de yogur aparece el contenido en sodio, calcio y fósforo. De los 3 minerales citados sólo para el sodio y el calcio hubo un número suficiente de datos que permitiera obtener modelos y sólo con el sodio se consiguieron unos resultados alentadores a la hora de predecir su contenido. Se detalla a continuación.

4.5.1 Sodio

En la Tabla 4.13 se muestra el rango en el contenido de sodio de los yogures, así como su desviación típica. La información del contenido en sodio aparece en el etiquetado de 104 muestras, de ellas 78 se utilizarán para la calibración y 26 para la validación externa.

	Rango	Media	Desviación típica
<i>Sodio (Na)</i>	0.001 – 0.080	0.050	± 0.014

Tabla 4.13 Rango, valor medio y desviación típica del contenido en sodio de la muestra de yogures analizada.

En el modelo de calibración diseñado se han utilizado 66 de las 78 muestras. Se ha obtenido un coeficiente de correlación de 0.890, lo suficientemente alto para usar esta tecnología como método de predicción del contenido en sodio. Este resultado demuestra que el sodio tiene que estar relacionado con fracciones orgánicas. En la Figura 4.17 se representa la gráfica de la recta de regresión de los modelos de calibración y validación cruzada.

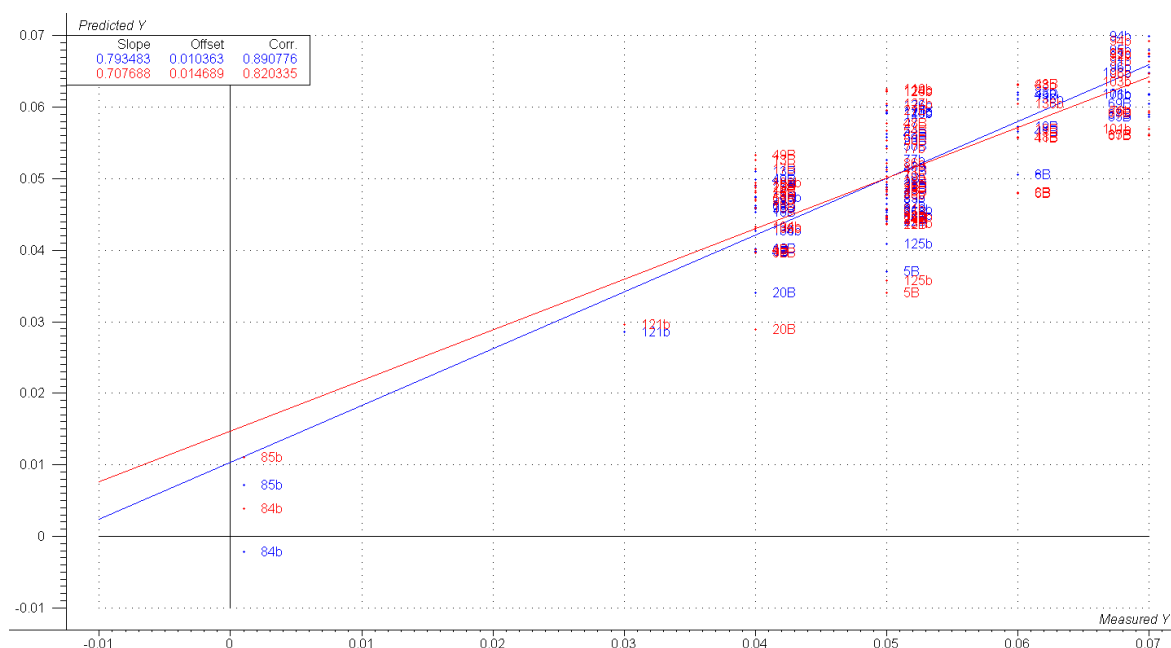


Figura 4.17 Rectas de regresión de las ecuaciones de calibración y validación cruzada para el sodio.

En la Tabla 4.14 se presentan los datos estadísticos de estos modelos.

Calibración		Validación cruzada	
<i>Elements</i>	66	<i>Elements</i>	66
<i>Slope</i>	0.793	<i>Slope</i>	0.707
<i>Offset</i>	0.010	<i>Offset</i>	0.014
<i>Correlation</i>	0.890	<i>Correlation</i>	0.820
<i>RMSEC</i>	0.006	<i>RMSEP</i>	0.007
<i>SEC</i>	0.006	<i>SEP</i>	0.007
<i>Bias</i>	-2.395x10 ⁻⁹	<i>Bias</i>	2.052x10 ⁻⁵

Tabla 4.14 Parámetros de calibración y validación cruzada para el contenido en sodio de la muestra de yogures analizada.

En la Figura 4.18 se muestra la validación externa para el sodio. De las 26 muestras de partida se han eliminado 4 outliers. El resultado es un coeficiente de correlación de 0.821 que es totalmente aceptable, por lo que se comprueba que la tecnología NIRS puede ser una alternativa para medir el contenido en sodio en yogures.

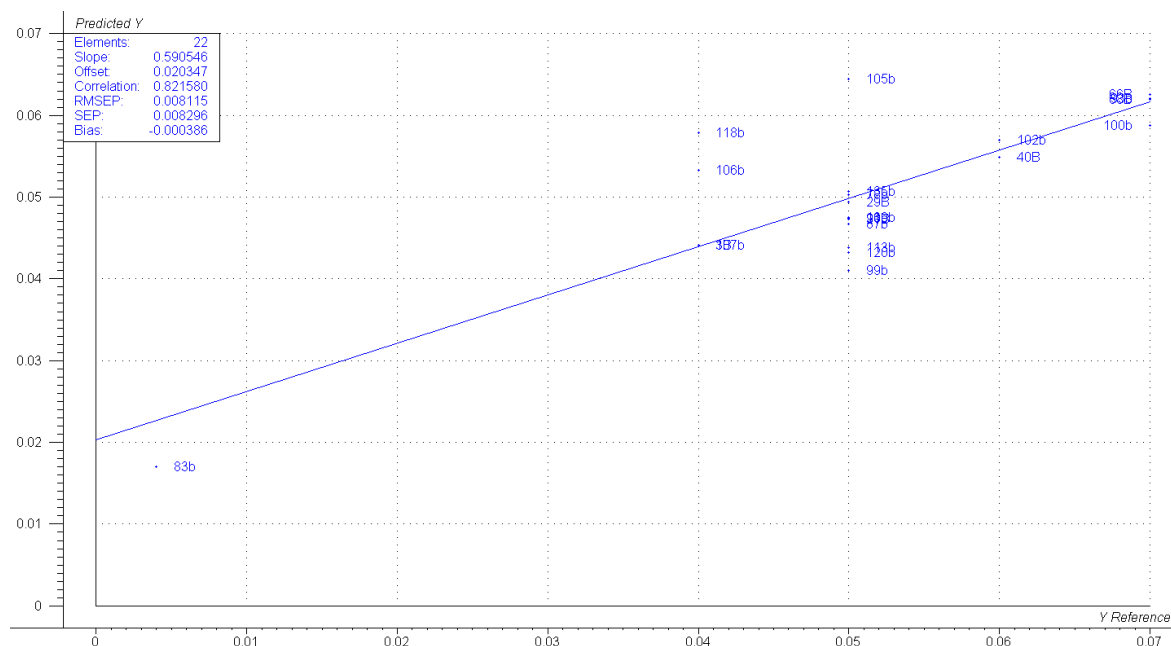


Figura 4.18 Validación externa para el sodio.

4.5.2 Calcio y Fósforo

Para el caso del calcio se tiene la información de su contenido en 66 muestras. Al realizar el modelo de calibración, se obtenía un coeficiente de correlación de 0.09, por lo que no se ha podido predecir el contenido de minerales con la tecnología NIRS.

Respecto al fósforo, sólo se tiene información de su contenido en 8 muestras por lo que no resulta adecuado realizar un estudio ya que son muy pocas muestras.

4.6 Vitaminas

La información presente en el etiquetado del contenido en vitaminas es muy escasa. Tan sólo unos pocos yogures contienen esa información. De todas las vitaminas se escoge la vitamina B12 porque es de la que se posee más información, un total de 9 muestras. A pesar del bajo número de muestras, se decidió obtener el modelo aun sabiendo que con ese número de datos no sería robusto. Si los resultados, que se pueden considerar como preliminares, son satisfactorios se podría en un futuro profundizar en este tema.

4.6.1 Vitamina B12

En la Tabla 4.15 se detalla el rango de valores para el contenido de vitamina B12 junto a su desviación estándar. Como ya se ha mencionado antes, se cuenta con un total de 9 muestras, de las cuales 7 servirán para realizar el modelo de calibración y 2 para la validación externa.

	Rango	Media	Desviación típica
<i>Vitamina B12</i>	0.22 – 0.90	0.33	± 0.20

Tabla 4.15 Rango, valor medio y desviación típica del contenido en vitamina B12 de la muestra de yogures analizada.

En la Figura 4.19 se muestra el modelo de calibración y validación cruzada para la vitamina B12. Los resultados son lo bastante buenos pero se trata de un modelo que cuenta con muy pocas muestras, 6 en concreto, ya que una muestra se ha eliminado por ser outlier. En la Tabla 4.16 se exponen todos los datos estadísticos.

Calibración		Validación cruzada	
<i>Elements</i>	6	<i>Elements</i>	6
<i>Slope</i>	0.725	<i>Slope</i>	0.752
<i>Offset</i>	0.070	<i>Offset</i>	0.063
<i>Correlation</i>	0.852	<i>Correlation</i>	0.731
<i>RMSEC</i>	0.012	<i>RMSEP</i>	0.018
<i>SEC</i>	0.014	<i>SEP</i>	0.019
<i>Bias</i>	-4.967x10 ⁻⁹	<i>Bias</i>	1.010x10 ⁻⁴

Tabla 4.16 Parámetros de calibración y validación cruzada para el contenido en vitamina B12 de la muestra de yogures analizada.

Las longitudes de onda más representativas para realizar el modelo se muestran en la Figura 4.20. Son todas aquéllas que pertenecen a enlaces C-H.

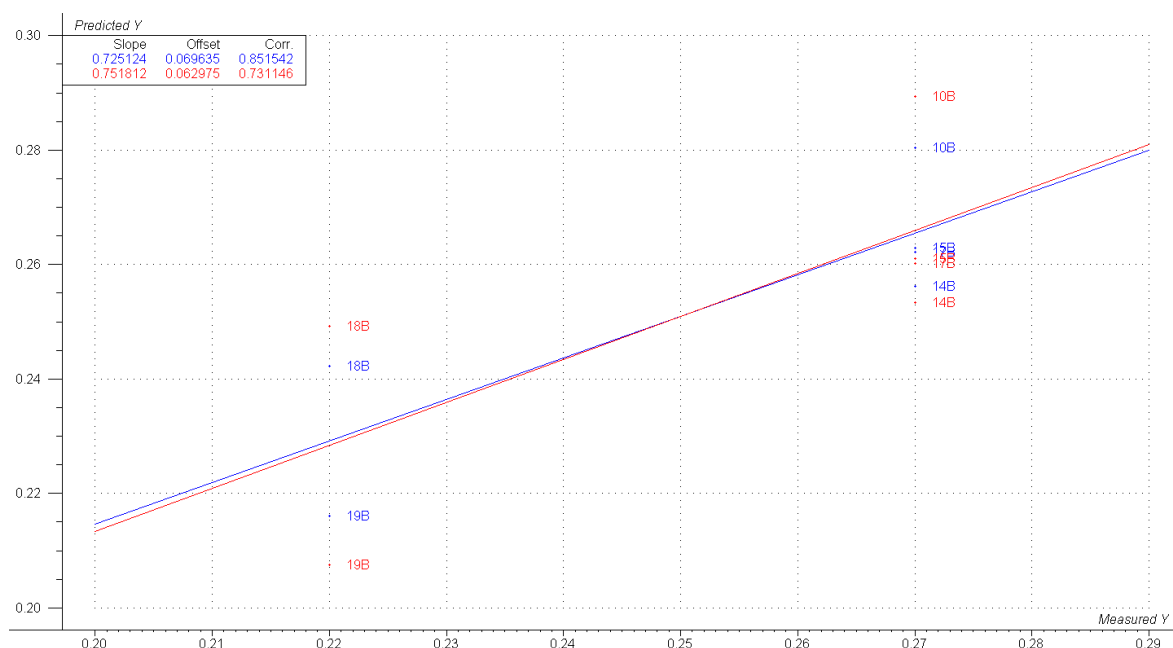


Figura 4.19 Calibración y validación cruzada para la vitamina B12.

Para la validación externa se cuenta sólo con 2 muestras y el resultado del coeficiente de calibración sale igual a 1 (Figura 4.21).

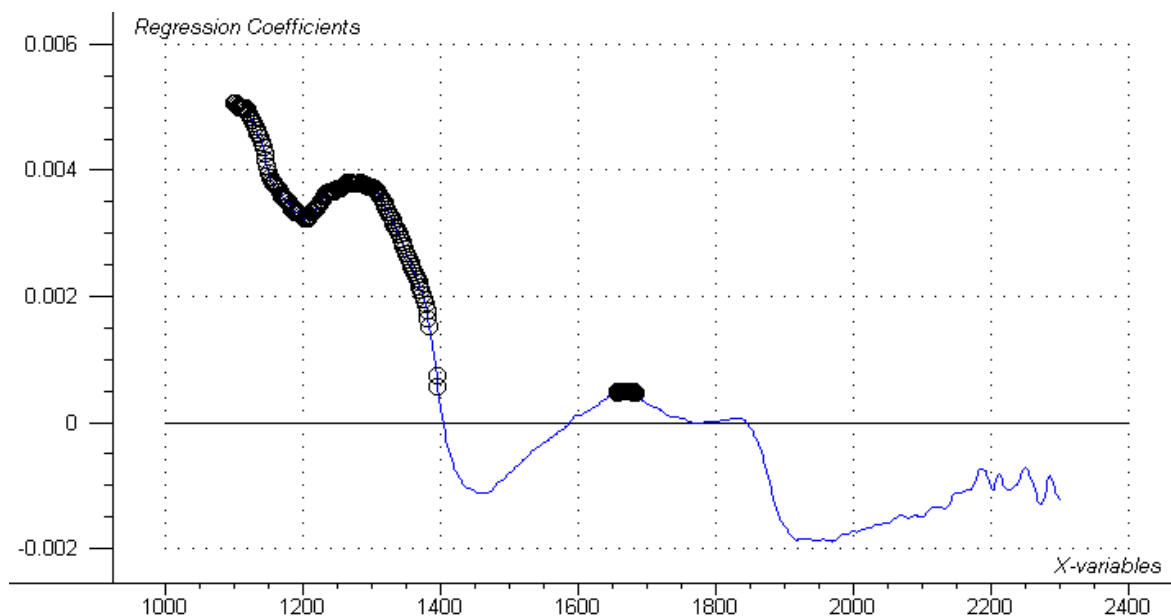


Figura 4.20 Longitudes de onda más representativas para la realización del modelo de calibración.

Los resultados de la ecuación de calibración hacen pensar que se trata de un buen método para predecir las vitaminas, sin embargo no son datos concluyentes puesto que no hay muestras suficientes.

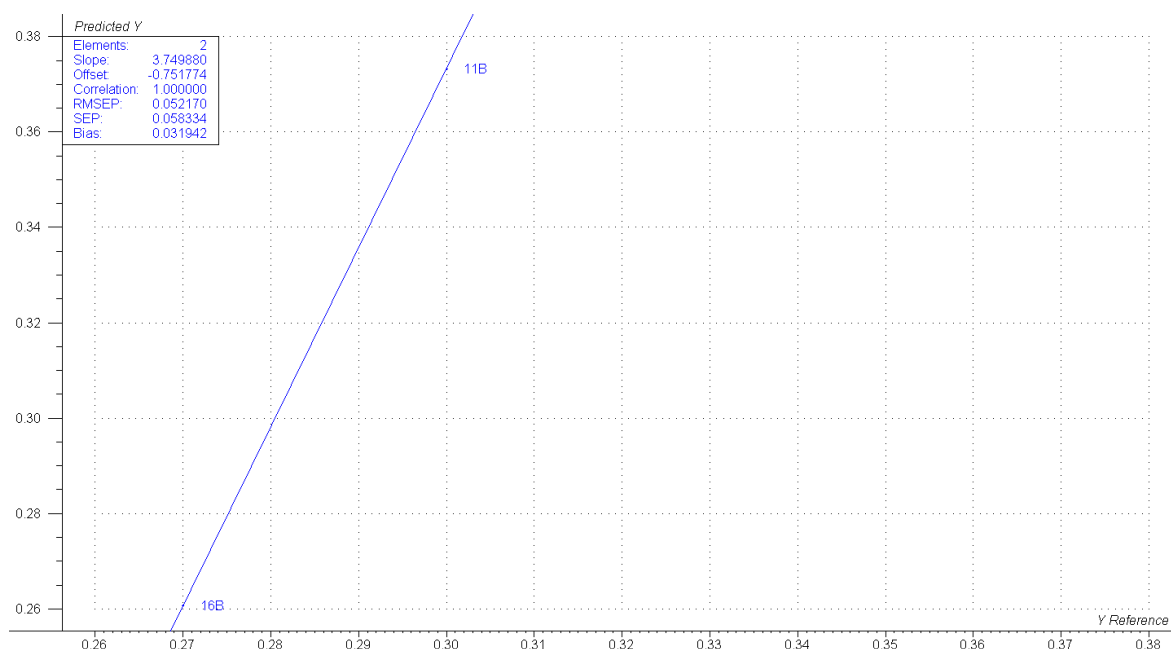


Figura 4.21 Modelo de validación externa.

4.7 Modelos con una marca comercial

Es interesante plantear modelos con una única marca comercial puesto que los valores de referencia usados en este Trabajo Fin de Máster son los que aparecen en el etiquetado de los yogures. Se desconoce, pues, el método analítico que se ha llevado a cabo para obtener los resultados de los diferentes componentes químicos. Se puede anticipar la posibilidad de que haya múltiples diferencias en los valores que aparecen en las etiquetas entre marcas comerciales. Se supone, entonces, que todos los componentes del yogur de una misma marca comercial se habrán analizado de la misma manera y por ende la variabilidad de resultados será menor a la existente entre diferentes marcas comerciales. Además, si se obtienen mejores resultados, sería aún más interesante para las industrias del sector que, en el caso de instalar este sistema de control, verían reducida la variabilidad de la muestra al trabajar únicamente con los productos de su marca.

Se presentan a continuación los modelos predictivos para los componentes principales del yogur; proteínas, hidratos de carbono y grasas; de la marca blanca de Mercadona, denominada "Hacendado". Si se ha elegido esta marca es única y

exclusivamente por el hecho de que es la que aporta más volumen de muestras a este estudio; un total de 22 muestras, de las cuales 17 serán para el modelo de calibración y 5 para la validación externa.

4.7.1 Proteínas

El rango de valores proteicos de los yogures de la marca “Hacendado”, junto con su media y desviación estándar se detallan en la Tabla 4.17.

	Rango	Media	Desviación típica
<i>Proteínas</i>	3.00 – 4.70	3.94	± 0.53

Tabla 4.17 Rango, valor medio y desviación típica del contenido en proteínas de la muestra de yogures “Hacendado”.

En la Figura 4.22 se representan las rectas de las ecuaciones de calibración y validación cruzada y en la Tabla 4.18 se muestran los datos estadísticos. Para el modelo de calibración, el coeficiente de correlación del modelo de calibración es muy bueno (0.999), sin embargo el de la validación cruzada empeora un poco (0.786). De todas formas, si se compara con el modelo anterior de las 141 muestras, la mejora del modelo es evidente; ya que se obtenía una R^2 igual a 0.810 para la calibración y 0.772 para la validación cruzada.

	Calibración		Validación cruzada
<i>Elements</i>	17	<i>Elements</i>	17
<i>Slope</i>	0.999	<i>Slope</i>	1.012
<i>Offset</i>	0.003	<i>Offset</i>	-0.019
<i>Correlation</i>	0.999	<i>Correlation</i>	0.786
<i>RMSEC</i>	0.015	<i>RMSEP</i>	0.428
<i>SEC</i>	0.016	<i>SEP</i>	0.440
<i>Bias</i>	-6.030x10 ⁻⁷	<i>Bias</i>	0.027

Tabla 4.18 Parámetros de calibración y validación cruzada para el contenido en proteínas de la muestra de yogures “Hacendado”.

En la Figura 4.23 se muestra la validación externa. Comparándola con el modelo de las 141 muestras, se puede observar que se constata la mejora, siendo 0.629 para este modelo y 0.539 para el anterior.

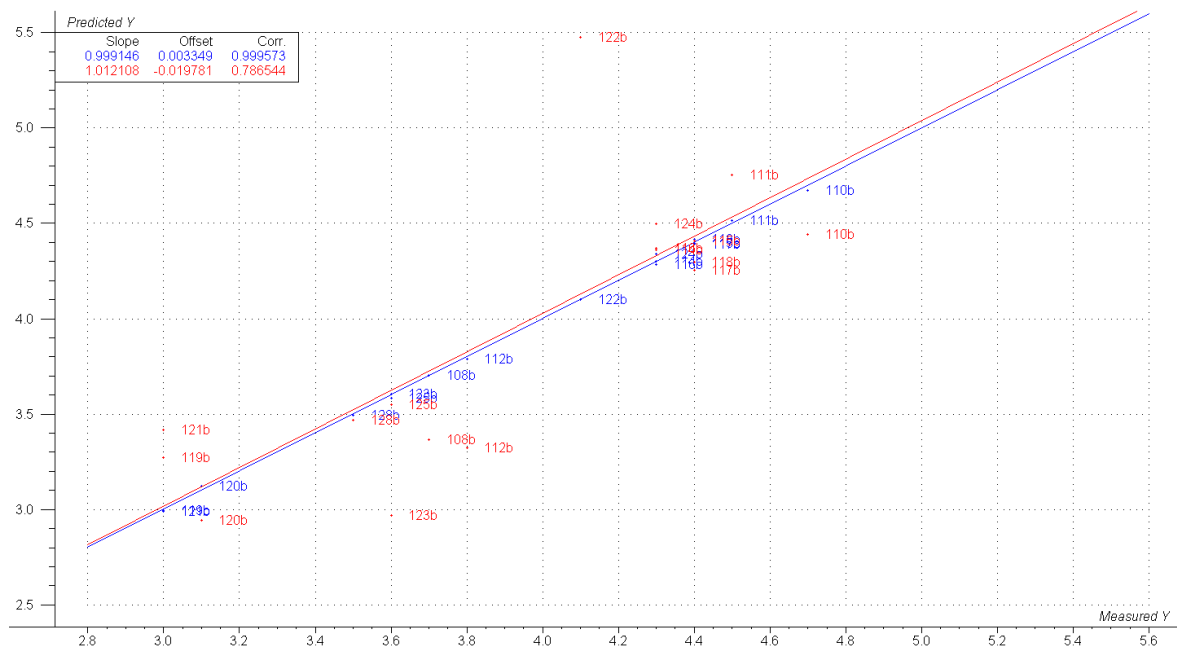


Figura 4.22 Modelos de calibración y validación cruzada para las proteínas de los yogures de la marca “Hacendado”.

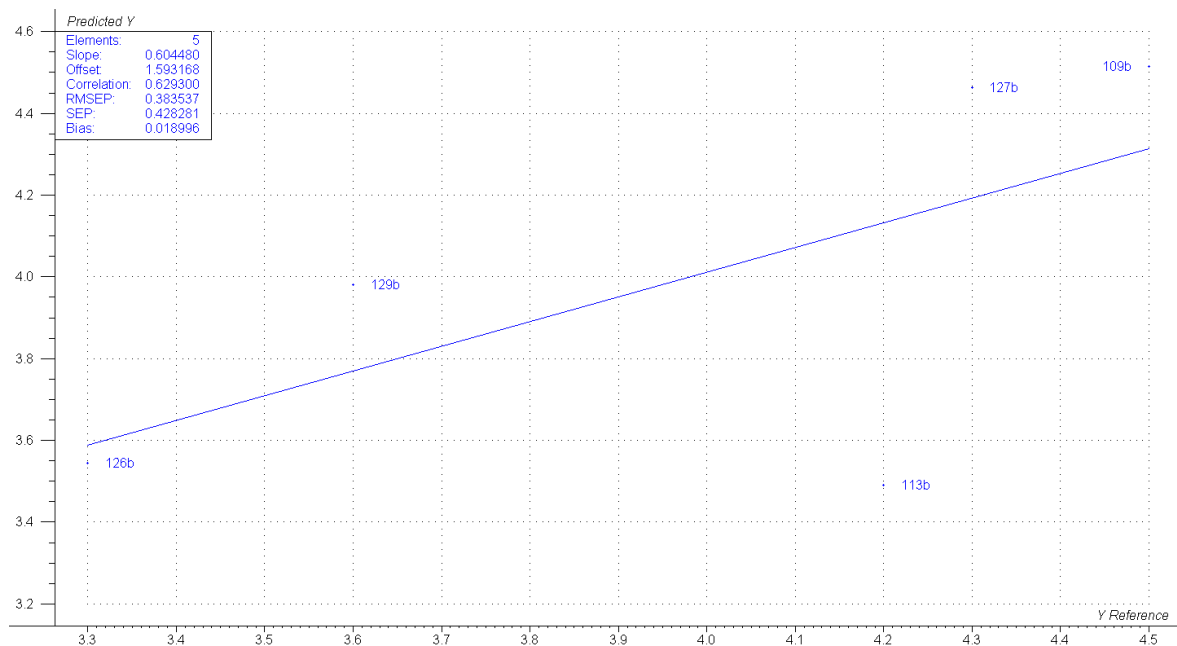


Figura 4.23 Modelo de validación externa para las proteínas de los yogures de la marca “Hacendado”.

4.7.2 Hidratos de carbono

En la Tabla 4.19 se muestra el rango que toman los valores de hidratos de carbono en los yogures de la marca “Hacendado”, así como su media y desviación estándar.

	Rango	Media	Desviación típica
<i>Hidratos de carbono</i>	2.80 – 13.9	7.29	± 3.56

Tabla 4.19 Rango, valor medio y desviación típica del contenido en hidratos de carbono de la muestra de yogures “Hacendado”.

En la Figura 4.24 se representan los modelos de calibración y “cross-validation”. En la Tabla 4.20 se detallan los datos estadísticos. Como se puede observar este modelo se ha realizado con 16 muestras ya que se ha eliminado un valor outlier (se trataba de un yogur griego). Si se compara con el modelo que incluían todas las muestras, se puede notar una leve mejora en este modelo, puesto que los errores estándares, ya sean de calibración o validación, son más pequeños y el coeficiente de correlación de calibración es mayor; 0.976 frente a 0.959 en el anterior modelo.

	Calibración		Validación cruzada
<i>Elements</i>	16	<i>Elements</i>	16
<i>Slope</i>	0.953	<i>Slope</i>	0.914
<i>Offset</i>	0.322	<i>Offset</i>	0.818
<i>Correlation</i>	0.976	<i>Correlation</i>	0.901
<i>RMSEC</i>	0.745	<i>RMSEP</i>	1.573
<i>SEC</i>	0.770	<i>SEP</i>	1.609
<i>Bias</i>	-7.890x10 ⁻⁷	<i>Bias</i>	0.217

Tabla 4.20 Parámetros de calibración y validación cruzada para el contenido en hidratos de carbono de la muestra de yogures “Hacendado”.

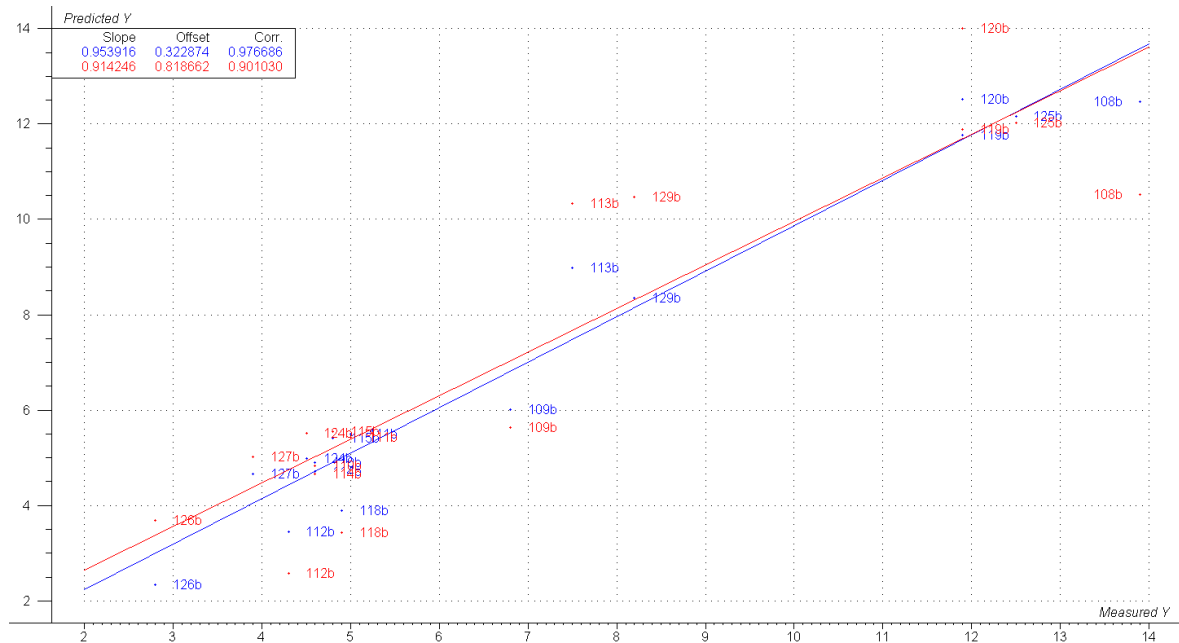


Figura 4.24 Ecuaciones de calibración y “cross-validation” para los carbohidratos de los yogures “Hacendado”.

Los resultados del modelo de la validación externa se muestran en la Figura 4.25. Se ha eliminado un valor dentro del modelo por ser outlier (otro yogur griego). Como se puede comprobar este modelo constata que el valor predictivo del modelo de calibración es muy alto; mejor también que el anterior modelo con las 141 muestras.

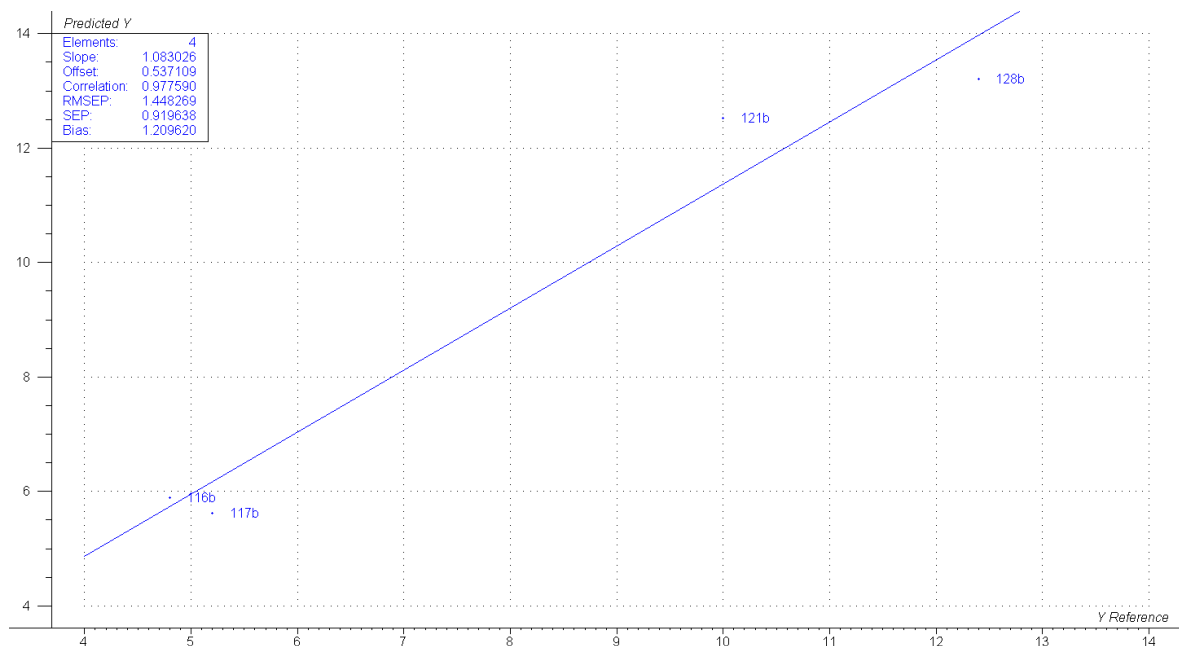


Figura 4.25 Validación externa para los carbohidratos de los yogures “Hacendado”.

4.7.3 Grasas

En la Tabla 4.21 aparecen los rangos de los valores del contenido en grasas de los yogures “Hacendado”, además de su media y desviación estándar.

	Rango	Media	Desviación típica
Grasas	0.10– 10.0	2.47	± 2.94

Tabla 4.21 Rango, valor medio y desviación típica del contenido en grasas de la muestra de yogures “Hacendado”.

En la Figura 4.26 se muestran las rectas de calibración y validación cruzada. En la Tabla 4.22 vienen los datos estadísticos de los dos modelos. Una vez más cuando se comparan los datos estadísticos de este modelo con los del anterior con todas las muestras se puede observar que éste es mejor, ya que la correlación se acerca más a 1 y los errores estándares son menores.

	Calibración		Validación cruzada
<i>Elements</i>	17	<i>Elements</i>	17
<i>Slope</i>	0.990	<i>Slope</i>	1.058
<i>Offset</i>	0.024	<i>Offset</i>	-0.090
<i>Correlation</i>	0.995	<i>Correlation</i>	0.973
<i>RMSEC</i>	0.291	<i>RMSEP</i>	0.750
<i>SEC</i>	0.300	<i>SEP</i>	0.771
<i>Bias</i>	1.622x10 ⁻⁸	<i>Bias</i>	0.047

Tabla 4.22 Parámetros de calibración y validación cruzada para el contenido en grasas de la muestra de yogures “Hacendado”.

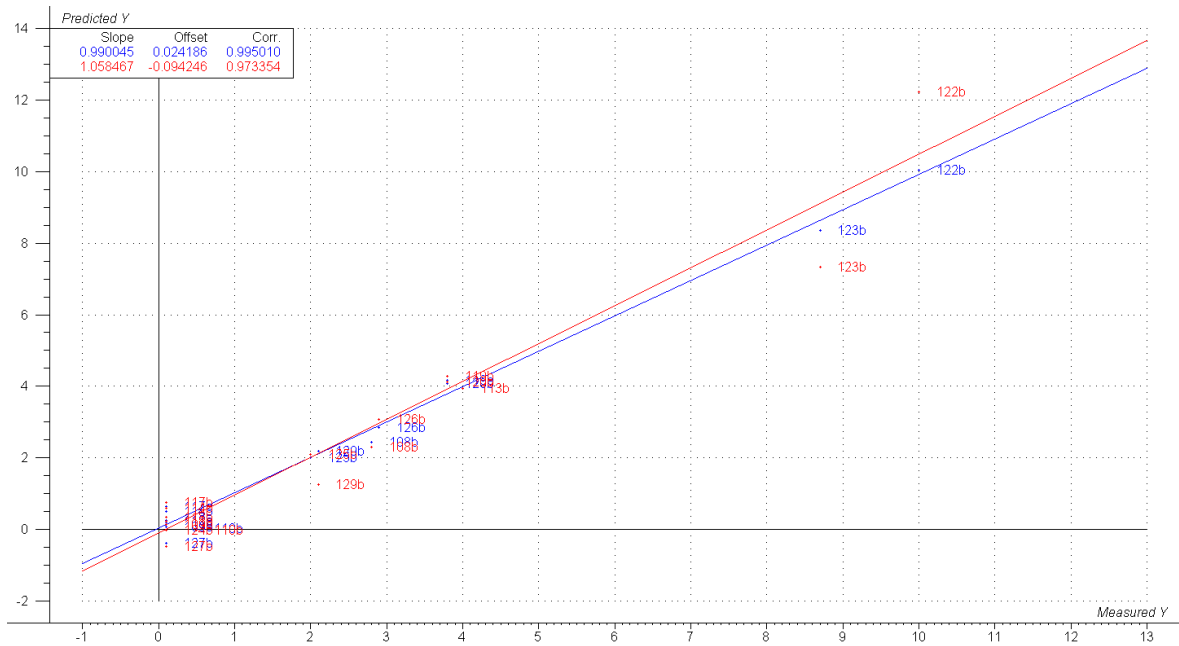


Figura 4.26 Calibración y validación externa para las grasas de los yogures “Hacendado”.

Respecto al modelo de validación externa (Figura 4.27), el coeficiente de correlación es muy alto (0.992) lo que demuestra que el modelo de calibración posee un alto valor predictivo de las grasas.

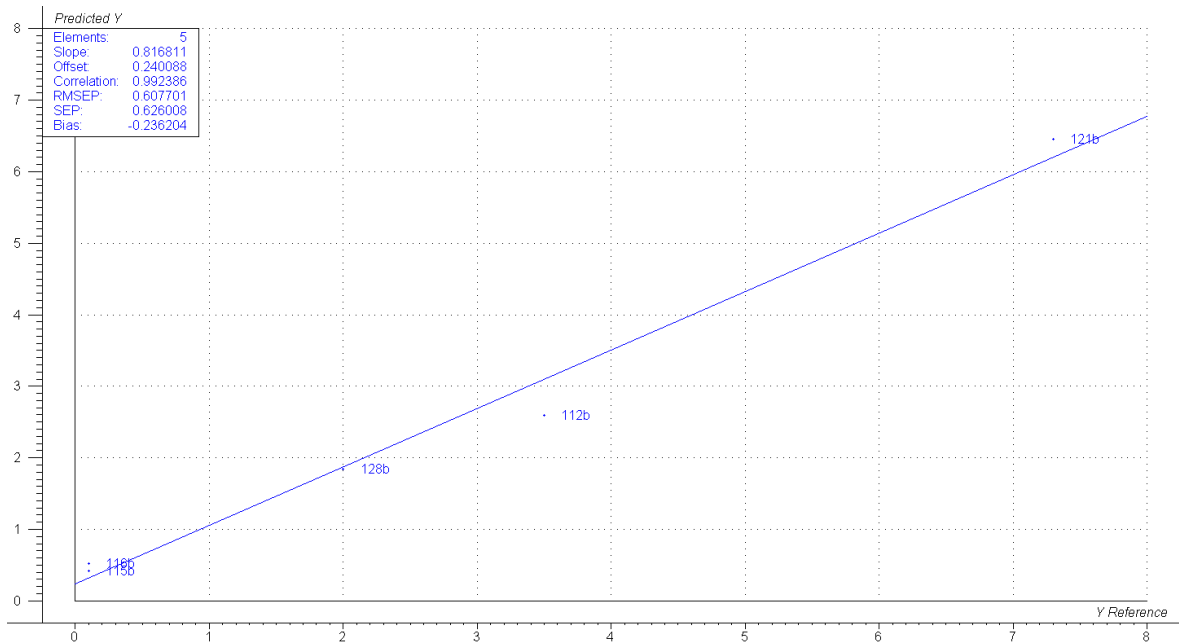


Figura 4.27 Ecuación de validación externa para las grasas de los yogures “Hacendado”.

Capítulo 5

Conclusiones y líneas futuras de investigación

5.1 Conclusiones

Los resultados de este estudio indican que es posible usar una técnica no destructiva para la medición cuantitativa del contenido de proteínas, carbohidratos, grasas, sodio y vitamina B12 de los yogures usando la tecnología NIRS.

Los modelos más robustos se han obtenido para los carbohidratos y las grasas, con coeficientes de correlación superiores a 0.9.

Los yogures griegos suelen aparecer como outliers posiblemente por el hecho de que su textura es muy diferente a la del resto de yogures saturando así la sonda para líquidos utilizada. Por eso, en el caso de las grasas, se hizo un modelo primero con todos los yogures y después prescindiendo de los yogures griegos. Los resultados no variaron mucho de un modelo a otro.

En el caso de los minerales se esperaba que el NIR no fuera capaz de predecir su contenido y así fue para el calcio y el fósforo, pero no para el sodio; por lo que se deduce que este mineral tiene que estar asociado a alguna fracción orgánica y eso permite su determinación cuantitativa por tecnología NIRS..

Para valorar si los resultados dentro de una misma marca comercial hubieran sido mejores que utilizando el total de las muestras se escogió la marca "Hacendado", demostrando dicha hipótesis con coeficientes de correlación siempre superiores.

5.2 Líneas futuras de investigación

A partir de este trabajo se abren múltiples líneas de investigación.

Se ha comprobado que los resultados obtenidos en los modelos de calibración cuando se trabaja con una sola marca comercial son mejores que cuando se utilizan todas las muestras. Esto demuestra diferencias entre marcas. Sería interesante realizar el mismo estudio, pero esta vez partiendo de unos valores nutricionales de

referencia obtenidos por un método de análisis único e igual para todas las muestras.

Los yogures griegos son muy diferentes al resto de yogures, tanto en propiedades físicas como químicas. Una buena línea de investigación sería hacer un trabajo únicamente con este tipo de yogures.

En cuanto a las vitaminas, apenas hay información sobre su contenido en el etiquetado, así que para concluir de forma vehemente que la tecnología NIRS es un buen método de análisis de éstas sería conveniente realizar un estudio con más muestras de las utilizadas en el presente trabajo.

Capítulo 6

Lista de abreviaturas e índice de tablas y figuras

6.1 Lista de abreviaturas

Las abreviaturas utilizadas a lo largo del presente trabajo son las que se muestran a continuación:

- AOTF: Filtro Acústico-Óptico Sintonizable
- DO: Denominación de Origen
- DOSC: Corrección Ortogonal Directa de la Señal
- FIR: Infrarrojo Lejano
- FT-NIR: Espectrometría NIR con transformada de Fourier
- GGS: Grasas saturadas
- IGP: Indicación Geográfica Protegida
- IR: Infrarrojo
- LDA: Análisis Discriminante Lineal
- MIR: Infrarrojo Medio
- MLR: Regresión Lineal Múltiple
- MSC: Corrección del Efecto Multiplicativo de la Dispersión
- NIR: Infrarrojo Cercano
- NIRS: Espectroscopia en el Infrarrojo Cercano
- OSC: Corrección Ortogonal de la Señal
- OWAVEC: Corrección Ortogonal de la Longitud de Onda
- PCA: Análisis de Componentes Principales
- PCR: Regresión en Componentes Principales
- PLS: Regresión Parcial por Mínimos Cuadrados
- R: Reflectancia
- R^2 : Coeficiente de Determinación
- RCS: Recuento de Células Somáticas
- RPHPLC: Cromatografía Líquida de Fase Reversa
- SEC: Error Estándar de Calibración
- SEP: Error Estándar de Predicción
- SNV: Variable Normal Estándar
- UV-Vis: Ultravioleta-Visible

6.2 Índice de tablas

- Tabla 1.1** Métodos tradicionales de análisis empleados habitualmente en la industria láctea, Pág. 5
- Tabla 2.1** Regiones del espectro electromagnético entre 780 y 10^6 nm, Pág. 9
- Tabla 3.1** Descripción de las 141 muestras de yogur utilizadas para el estudio, Pág. 24
- Tabla 4.1** Rango, valor medio y desviación típica del contenido en proteínas, Pág. 29
- Tabla 4.2** Parámetros de calibración y validación cruzada para el contenido en proteínas, Pág. 29
- Tabla 4.3** Rango, valor medio y desviación típica del contenido en hidratos de carbono, Pág. 32
- Tabla 4.4** Parámetros de calibración y validación cruzada para el contenido en hidratos de carbono, Pág. 32
- Tabla 4.5** Rango, valor medio y desviación típica del contenido en azúcares, Pág. 34
- Tabla 4.6** Parámetros de calibración y validación cruzada para el contenido en azúcares, Pág. 35
- Tabla 4.7** Rango, valor medio y desviación típica del contenido en grasas, Pág. 36
- Tabla 4.8** Rango, valor medio y desviación típica del contenido en grasas para la muestra separada por tipo de yogur como griego y resto, Pág. 37
- Tabla 4.9** Parámetros de calibración y validación cruzada para el contenido en grasas, Pág. 38
- Tabla 4.10** Parámetros de calibración y validación cruzada para el contenido en grasas de la muestra de yogures excluyendo los griegos, Pág. 40
- Tabla 4.11** Rango, valor medio y desviación típica del contenido en grasas saturadas, Pág. 42
- Tabla 4.12** Parámetros de calibración y validación cruzada para el contenido en grasas saturadas, Pág. 42
- Tabla 4.13** Rango, valor medio y desviación típica del contenido en sodio, Pág. 44

- Tabla 4.14** Parámetros de calibración y validación cruzada para el contenido en sodio, Pág. 45
- Tabla 4.15** Rango, valor medio y desviación típica del contenido en vitamina B12, Pág. 47
- Tabla 4.16** Parámetros de calibración y validación cruzada para el contenido en vitamina B12, Pág. 47
- Tabla 4.17** Rango, valor medio y desviación típica del contenido en proteínas de la muestra de yogures “Hacendado”, Pág. 50
- Tabla 4.18** Parámetros de calibración y validación cruzada para el contenido en proteínas de la muestra de yogures “Hacendado”, Pág. 50
- Tabla 4.19** Rango, valor medio y desviación típica del contenido en hidratos de carbono de la muestra de yogures “Hacendado”, Pág. 52
- Tabla 4.20** Parámetros de calibración y validación cruzada para el contenido en hidratos de carbono de la muestra de yogures “Hacendado”, Pág. 52
- Tabla 4.21** Rango, valor medio y desviación típica del contenido en grasas de la muestra de yogures “Hacendado”, Pág. 54
- Tabla 4.22** Parámetros de calibración y validación cruzada para el contenido en grasas de la muestra de yogures “Hacendado”, Pág. 54

6.3 Índice de figuras

- Figura 2.1** Espectros electromagnéticos, Pág. 7
- Figura 2.2** Experimento de Herschel, Pág. 7
- Figura 2.3** Vibraciones moleculares entre dos átomos respecto a un átomo central, Pág. 10
- Figura 2.4** Energía potencial para el oscilador armónico, Pág. 11
- Figura 2.5** Energía potencial para el oscilador anarmónico, Pág. 12
- Figura 2.6** Bandas de absorción en la región NIR, Pág. 13
- Figura 2.7** Sistemas de registro en NIR, Pág. 16
- Figura 3.1** Espectrofotómetro AOTF-NIR Luminar 5030, Pág. 25

- Figura 3.2** Sonda de líquidos del espectrofotómetro BRIMROSE, Pág. 25
- Figura 4.1** Espectros de reflectancia de las diferentes variedades de yogur, Pág. 28
- Figura 4.2** Modelo de calibración para las proteínas del yogur, Pág. 30
- Figura 4.3** Modelo de validación cruzada para las proteínas del yogur, Pág. 30
- Figura 4.4** Modelo de validación externa para las proteínas del yogur, Pág. 31
- Figura 4.5** Rectas de regresión de la calibración y la validación cruzada de los hidratos de carbono, Pág. 33
- Figura 4.6** Longitudes de onda con más peso en la ecuación de calibración de los carbohidratos, Pág. 33
- Figura 4.7** Recta de regresión del modelo de validación externa para los carbohidratos, Pág. 34
- Figura 4.8** Rectas de regresión de las ecuaciones de calibración y validación de los azúcares, Pág. 35
- Figura 4.9** Modelo de validación externa para los azúcares, Pág. 36
- Figura 4.10** Ecuaciones de calibración y validación cruzada para la grasa, Pág. 38
- Figura 4.11** Representación de las longitudes de onda más representativas en el modelo para las grasas, Pág. 39
- Figura 4.12** Validación externa para las grasas, Pág. 39
- Figura 4.13** Regresión lineal de la calibración y la “cross-validation” de la grasa sin yogures griegos, Pág. 41
- Figura 4.14** Recta de la validación externa para la grasa sin los yogures griegos, Pág. 41
- Figura 4.15** Rectas de regresión de las ecuaciones de calibración y validación cruzada para las grasas saturadas, Pág. 43
- Figura 4.16** Ecuación de validación externa para las grasas saturadas, Pág. 43
- Figura 4.17** Rectas de regresión de las ecuaciones de calibración y validación cruzada para el sodio, Pág. 45
- Figura 4.18** Validación externa para el sodio, Pág. 46
- Figura 4.19** Calibración y validación cruzada para la vitamina B12, Pág. 48

- Figura 4.20** Longitudes de onda más representativas para la realización del modelo de calibración para la vitamina B12, Pág. 48
- Figura 4.21** Modelo de validación externa de la vitamina B12, Pág. 49
- Figura 4.22** Modelos de calibración y validación cruzada para las proteínas de los yogures de la marca “Hacendado”, Pág. 51
- Figura 4.23** Modelo de validación externa para las proteínas de los yogures de la marca “Hacendado”, Pág. 51
- Figura 4.24** Ecuaciones de calibración y “cross-validation” para los carbohidratos de los yogures “Hacendado”, Pág. 53
- Figura 4.25** Validación externa para los carbohidratos de los yogures “Hacendado”, Pág. 53
- Figura 4.26** Calibración y validación externa para las grasas de los yogures “Hacendado”, Pág. 55
- Figura 4.27** Ecuación de validación externa para las grasas de los yogures “Hacendado”, Pág. 55

Capítulo 7

Bibliografía

Berzaghi, P., Flinn, P.C., Dardenne, P., Lagerholm, M., Shenk, J.S., Westerhaus, M.O., Cowe, I.A., 2001. Comparison of linear and non-linear NIR calibration methods using large forage databases. Proceedings of the 10th International NIRS Conference Ed. By A. M. C. Davies and R. K. Cho.

Burns, D.A. y Ciurczak, E.W., 2001. Handbook of near-infrared analysis. Marcel Dekker, Inc.

Castillo, M., Payne, F.A., Hicks, C.L., Lopez, M.B., 2000. Predicting cutting and clotting time of coagulating goat's milk using diffuse reflectance: effect of pH, temperature and enzyme concentration. *Int Dairy J* 10: 551-562.

Cattaneo, T.M.P., Giardina, C., Sinelli, N., Riva, M., Giangiacomo, R., 2005. Application of FT-NIR and FT-IR spectroscopy to study the shelf-life of Crescenza cheese. *Int Dairy J* 15: 693-700.

Cattaneo, T.M.P., Tornelli, C., Erini, S., Panarelli, E.V., 2008. Relationship between sensory scores and near infrared absorptions in characterising Bitto, an Italian protected denomination origin cheese. *J Near Infrared Spec* 16: 173-178.

Cen, H., He, Y., 2007. Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. *Trends Food Sci Tech* 18: 72-83.

Čurda, L., Kukačková, O., 2004. NIR spectroscopy: a useful tool for rapid monitoring of processed cheeses manufacture. *J Food Eng* 61: 557-560.

Davies, T. The history of near infrared spectroscopic analysis: past, present and future from sleeping technique to the morning star of spectroscopy. *Analysis* 26 4, 17-19.

De Roos, A.P.W., Van Den Bijgaart, H.J.C.M., Horlyk, J., De Jong, G., 2007. Screening for subclinical ketosis in dairy cattle by Fourier transform infrared spectrometry. *J Dairy Sci* 90: 1761-1766.

Dračková, M., Hadra, L., Janštová, B., Navrátilová, P., Přidalová, H., Vorlová, L., 2008. Analysis of goat milk by Near-Infrared spectroscopy. *Acta vet Brno* 77: 415-422.

Gelaldi, P., 2002. Some recent trends in the calibration literature. *Chemometr Intell Lab*, 60: 211-214.

Giangiaco, R., Lizzano, R., Barzaghi, S., Cattaneo, T.M.P., 1998. NIR and other luminometric methods to monitor the primary clotting phase of milk. *J Near Infrared Spec* 6 (1): 205-212.

González-Martín, I., Hernández-Hierro, J.M., Vivar-Quintana, A., Revilla, I., González-Pérez, 2009. The application of near infrared spectroscopy technology and a remote reflectance fibre-optic probe for the determination of peptides in cheeses (cow's, ewe's and goat's) with different ripening times. *Food Chem* 114: 1564-1569.

He, Y., Feng, S., Deng, X., Li, X., 2006. Study on lossless discrimination of varieties of yogurt using the visible/NIR-spectroscopy. *Food Res. Int.*, 39: 645–650.

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

Karoui, R., Dufour, É., Pillonel, L., Schaller, E., Picque, D., Cattenoz, T., Mouazen, A.M., Schaller, E., De Baerdemaeker, J., Bosset J.O., 2005. The potential of combined infrared and fluorescence spectroscopies as a method of determination of the geographic origin of Emmental cheeses. *Int Dairy J* 15: 287-298.

Karoui, R., Mouazen, A.M., Dufour, É., Pillonel, L., Schaller, E., De Baerdemaeker, J., Bosset J.O., 2006. Chemical characterisation of European Emmental cheeses by near infrared spectroscopy using chemometric tools. *Int Dairy J* 16: 1211-1217.

Karoui, R., Pillonel, L., Schaller, E., Bosset J.O., De Baerdemaeker, J., 2006a. Prediction of sensory attributes of European Emmental cheese using near-infrared spectroscopy: a feasibility study. *Food Chem* 101: 1121-1129.

Klandar, A.H., Lagaude, A., Chevalier-Lucia, D., 2007. Assessment of the rennet coagulation of skim milk: A comparison of methods. *Int Dairy J* 17: 1151-1160.

Laporte, M.F., Martel, R., Pasquin, P., 1998. The near-infrared optic probe for monitoring rennet coagulation in cow's milk. *Int Dairy J* 8: 659-666.

Leardi, R., 2008. Chemometric methods in food authentication. In: *modern techniques for food authentication* Da-Wen Sun 1st ed., Amsterdam; Boston: Elsevier/Academic Press. Pp 585-616.

Manley, M., Downey, G., Baeten, V., 2008. Spectroscopic technique: Near-Infrared (NIR) spectroscopy. In: *Modern techniques for food authentication*. Da-Wen Sun 1st ed., Amsterdam; Boston: Elsevier/Academic Press. Pp 65-115.

Mark, H., 1989. Chemometrics in near-infrared spectroscopy. *Anal. Chimica Acta* 223 75-93.

Massart, D.L., Vandeginste, B.G.M., Buydens, L.M.C., et al, 1988. *Chemometrics: A textbook*, Vol.2. Amsterdam: Elsevier.

Miller, C.E., 2001. Near-infrared technology in the agricultural and food industries. P. Williams and K. Norris (editors), American association of cereal chemist, 2nd edition, Minnesota chapter two.

Murray, I., 1986. The NIR spectra of homologous series of organic compounds. In: Proceedings international NIR/NIT conference (Eds. Hollo, J.; Kaffka, K.J. & Gonczy, J.L.), pp. 13-28. Akademiai Kiado, Budapest, Hungary.

Murray, I. y Williams, P.C., 1987. Chemical principles of near-infrared technology. In: Near Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries (Eds. Williams, P.C. & Norris, K.), pp. 17-34. American Association of Cereal Chemists Inc., St. Paul, Minnesota, USA.

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

Navrátil, M., Cimander, C., Mandenius, C.F., 2004. On-line multisensory monitoring of yogurt and filmjolk fermentations on production scale. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52, 415–420.

Sarawong, S., Kawano, S., 2008. System design for non-destructive near infrared analysis of chemical components and total aerobic bacteria count of raw milk. J Near Infrared Spec 16: 389-398.

Shao, Y., He, Y., y Feng, S., 2007. Measurement of yogurt internal quality through using vis/NIR spectroscopy. Food Res. Int., 40: 835–841.

Shenk, J.S., Westerhaus, M.O., 1991. Population definition, sample selection, and calibration procedures for near infrared Reflectance spectroscopy. Crop Sci 31: 469-474.

Shenk, J.S., Westerhaus, M.O. y Workman, J.J., 1992. Application of NIR spectroscopy to agricultural products. In: Handbook of Near Infrared Analysis, Practical Spectroscopy Series (Eds. Burns, D.A. & Ciurczak, E.W.), pp.383-431. Marcel Dekker, New York, USA.

Shenk, J.S., Westerhaus, M.O., 1995. The application of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to forage analysis. In: Forage Quality, Evaluation and Utilization (Eds. Fahey, G.C.Jr.; Mosser, L.E.; Mertens, D.R. & Collins, M.), pp. 406-449. American Society of Agronomy Inc., Crop Science Society of America Inc., Soil Science Society of America Inc., Madison, Wisconsin, USA.

Stark, E., Luchter, K., 2004. Diversity in NIR instrumentation. Proceedings of the 11th International Conference on Near Infrared spectroscopy. NIR Publications 13.

Tsenkova, R., Atanassova, S., Toyoda, K., Ozaki, Y., Itoh, K., Fearn, T., 1999. Near-infrared spectroscopy for dairy management: measurement of unhomogenized milk composition. *J Dairy Sci* 82: 2344-2351.

Tsenkova, R., Atanassova, S., Itoh, K., Ozaki, Y., Toyoda, K., 2000. Near infrared spectroscopy for biomonitoring. Cow milk composition measurements in a spectral region from 1,100 to 2,400 nanometers. *J Anim Sci* 78: 515-522.

Tsenkova, R., Atanassova, S., Ozaki, Y., Toyoda, K., Itoh, K., 2001. Near-infrared spectroscopy for biomonitoring: influence of somatic cell count on cow's milk composition analysis. *Int Dairy J* 11: 779-783.

Tsenkova, R., Atanassova, S., Kawano, S., Toyoda, K., 2001a. Somatic cell count determination in cow's milk by near-infrared spectroscopy: a new diagnostic tool. *J Anim Sci* 79: 2550-2557.

Tsenkova, R., Atanassova, S., Morita, H., Ikuta, K., Toyoda, K., Iordanova, I. K., Hakogi, E., 2006. Near infrared spectra of cows'milk for milk quality evaluation: disease diagnosis and pathogen identification. *J Near Infrared Spec* 14: 363-370.

William P., Norris K. 2001. *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*. American Association of Cereal Chemist, Inc. St. Paul, Minnesota, USA.

Workman, J.Jr., Koch, M., Veltkamp, D.J., 2003. Process analytical chemistry. *Anal. Chem.* 75 2859-2876.