

ZAMORANO  
CARRERA DE AGROINDUSTRIA

**Curvas de calibración y validación por espectroscopia en el  
infrarrojo cercano (EIC) para leches fluidas**

Tesis presentada como requisito parcial  
para optar al título de Ingeniero Agrónomo  
en el Grado Académico de Licenciatura.

Presentado por

Carlos Fernando López Bautista

Honduras: Diciembre, 2001.

El autor concede a Zamorano permiso para reproducir y distribuir copias de este trabajo para fines educativos. Para otras personas físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor.

---

**Carlos Fernando López Bautista**

Honduras: Diciembre, 2001.

Curvas de calibración y validación por espectroscopía en el infrarrojo  
cercano (EIC) para leches fluidas

Presentado por

**Carlos Fernando López Bautista**

Aprobada:

---

Gladys de Flores, M. Sc.  
Asesor Principal

---

Claudia García, Ph. D.  
Coordinadora de la Carrera de  
Agroindustria.

---

Oscar Sanabria Garro, MS, MBA.  
Asesor

---

Antonio Flores, Ph. D.  
Decano Académico.

---

Raúl Espinal, Ph. D.  
Asesor

---

Keith Andrews, Ph. D.  
Director General.

---

Aurelio, Revilla. M.S.A.  
Coordinador PIA

## **DEDICATORIA**

A mis Padres: Mario López y Lidia Bautista por el apoyo que me dieron en hacer de un ideal realidad.

A mis Hermanos: Mario Luis y Roxana Marisol por el apoyo que siempre me brindaron.

A mis Sobrinos: Diego Alejandro, Lourdes Paola y Andrés.

A mi Abuelita Tomasa Joaquín (QEPD) por todo su amor.

A mis amigos: Juan Carlos, Dany, Vinicio y los hermanos Juárez Q.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios por todo el amor que me ha brindado para alcanzar esta meta.

A mis padres por todo el esfuerzo para apoyarme en todo momento.

A la Licda. Gladys de Flores por todo su tiempo, comprensión y amistad brindada.

Especialmente agradezco a Diana Pamela Jaramillo por todo su apoyo y amistad brindada.

A Iván e Isabel gracias por toda su ayuda.

Al Lic. Oscar Sanabria por su apoyo y consejos.

Al Dr. Raúl Espinal por su tiempo y oportunos consejos.

A la Dra. Claudia García por sus consejos para la vida profesional, muchas gracias.

A la carrera de Agroindustria por su organización.

A todos mis amigos PIA por todos los momentos que vivimos, especialmente a Susana Sierra, Mauricio Guerra, Renato, Mariano, Martín, Kevin, Carlos, Alejandro, Oscar, Emerson, Edvin, Luis Fernando, Julio César, Francisco Escobedo, Miguel Londoño, Rómulo, José, Sabio y a todos cuyo nombre no recuerdo en este momento.

A toda persona que de una u otra manera contribuyó a la realización de este proyecto.

## **AGRADECIMIENTO A PATROCINADORES**

Agradezco a la Fundación AGROBECA por contribuir financieramente para la realización de mis estudios en el Programa Agrónomo.

Agradezco a mis padres por contribuir financieramente para la realización de mis estudios en el Programa de Ingeniería Agronómica.

## RESUMEN

López, Carlos. 2001. Curvas de calibración y validación por espectroscopía en el infrarrojo cercano (EIC) para leches fluidas. Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, Zamorano, Honduras. 31 p.

La tecnología EIC (en inglés NIR, “Near Infrared Reflectance”) usada en análisis cuantitativos de productos intermedios y finales, elimina los costos por reactivos, cristalería e instrumental de los métodos químicos convencionales y sin costo ambiental. El estudio se realizó de abril a octubre de 2001 en Zamorano. El objetivo del proyecto fue hacer curvas de calibración EIC y validarlas para estimar el contenido de proteína, grasa, azúcares y humedad en leches fluidas y comparar sus costos con los métodos convencionales. Se utilizaron 120 muestras de leche: entera, descremada, homogeneizada, sabor a chocolate y sabor a fresa para la calibración del instrumento. Para la regresión se usó el modelo de cuadrados mínimos parciales modificado, obteniéndose un  $R^2$  de 0.9740 y un error estándar de predicción (EEP) de 0.058 para proteína; un  $R^2$  de 0.9894 y EEP de 0.305 para grasa; un  $R^2$  de 0.9423 y EEP de 0.749 para azúcares, un  $R^2$  de 0.9673 y EEP de 0.952 para humedad. Para validar las curvas se analizaron otras 30 muestras y se hizo una prueba T de diferencia de medias, resultando que los valores reales y estimados no son significativamente diferentes ( $P>0.01$ ) para proteína, humedad ni azúcares. Usando métodos convencionales, el costo de analizar proteína, humedad y azúcares es de 13.2, 2.17 y 6.8 dólares, respectivamente, en cambio usando EIC el costo por componente es de 5.5 dólares.

**Palabras claves:** Azúcares, espectro, grasa, humedad, proteína, regresión.

---

Abelino Pitty Ph. D.

## **NOTA DE PRENSA**



## CONTENIDO

	Portadilla.....	i
	Autoría.....	ii
	Página de firmas.....	iii
	Dedicatoria.....	iv
	Agradecimientos.....	v
	Agradecimiento a patrocinadores.....	vi
	Resumen.....	vii
	Nota de prensa.....	vii
	Contenido.....	ix
	Índice de Cuadros.....	xi
	Índice de Figuras.....	xii
	Índice de Anexos.....	xiii
1.	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1	DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	1
1.2	ANTECEDENTES.....	2
1.3	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	2
1.4	OBJETIVOS.....	2
1.4.1	Objetivo general.....	2
1.4.2	Objetivos específicos.....	3
2.	<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	4
2.1	GENERALIDADES.....	4
2.1.1	Definición de leche.....	4
2.1.2	Composición de la leche.....	4
2.1.3	Importancia de los constituyentes de la leche.....	5
2.2	ESPECTROSCOPIA EN EL INFRARROJO CERCANO.....	6
2.2.1	Principios de la espectroscopía en el infrarrojo cercano.....	6
2.3	REGIÓN ESPECTRAL DEL INFRARROJO CERCANO.....	7
2.4	PRINCIPIOS DE REFLECTANCIA DIFUSA.....	8
2.5	BANDAS DE ABSORCIÓN EN EL INFRARROJO CERCANO.....	8
2.6	CALIBRACIÓN.....	10
2.7	MÉTODOS DE REGRESIÓN.....	10
2.7.1	Regresión por componentes principales (RCP).....	10
2.7.2	Cuadrados mínimos parciales (CMP).....	10
2.7.3	Cuadrados mínimos parciales modificado (CMPM).....	10
2.7.4	Sistema neural.....	11
3.	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	12
3.1	LOCALIZACIÓN.....	12

3.2	MATERIALES.....	12
3.3	MUESTREO DE LAS LECHE DE ZAMORANO.....	12
3.4	FORMA DE MUESTREO.....	13
3.5	GRADO DE PRECISIÓN DEL OPERADOR.....	14
3.6	PROCEDIMIENTO PARA TOMAR EL ESPECTRO EIC.....	14
3.7	VARIABLES MEDIDAS.....	15
3.8	MANEJO DE LOS DATOS.....	15
3.8.1	Datos EIC.....	15
3.8.2	Datos de laboratorio.....	15
3.9	PROCEDIMIENTO DE CALIBRACIÓN.....	15
3.9.1	Centrado de los espectros y VRML.....	16
3.9.2	Selección de los espectros y sus respectivos VRML.....	16
3.9.3	Desarrollo de la ecuación.....	16
3.10	PROCEDIMIENTO PARA LA VALIDACIÓN DE LAS CURVAS.....	16
3.11	CÁLCULO DE COSTOS.....	17
3.11.1	Métodos tradicionales.....	17
3.11.2	Método EIC.....	17
4.	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	18
4.1	<b>COMPOSICIÓN DE LAS MUESTRAS</b> .....	18
4.1.1	Grasa.....	18
4.1.2	Proteína.....	19
4.1.3	Humedad.....	19
4.1.4	Azúcares.....	20
4.2	COMPARACIÓN ENTRE LOTES.....	21
4.3	ESPECTROS RECOLECTADOS.....	22
4.4	DISPERSIÓN DE LOS VALORES DE LABORATORIO Y LOS ESTIMADOS POR EL EIC.....	23
4.5	RESULTADOS DE CALIBRACIÓN.....	26
4.6	RESULTADOS DE VALIDACIÓN.....	27
4.7	COSTOS DE LOS ANÁLISIS.....	28
5.	<b>CONCLUSIONES</b> .....	30
6.	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	31
7.	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	32
8.	<b>ANEXOS</b> .....	34

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	
1.	Composición porcentual de la leche..... 5
2.	Bandas de Absorción de los principales componentes en alimentos..... 8
3.	Plan de muestreo de las leches..... 13
4.	Estadística descriptiva del grado de precisión analítica..... 14
5.	Estadística descriptiva de la grasa en las distintas leches de Zamorano..... 18
6.	Estadística descriptiva de la proteína en las distintas leches de Zamorano.... 19
7.	Estadística descriptiva de la humedad en las distintas leches de Zamorano..... 20
8.	Estadística descriptiva de los azúcares en las distintas leches de Zamorano..... 20
9.	Comparación de la proteína en los lotes de leches procesadas..... 21
10.	Comparación del promedio de grasa en los lotes de leches procesadas..... 22
11.	Análisis estadístico para el desarrollo de las curvas de calibración..... 27
12.	Prueba de diferencia de medias apareadas para proteína, grasa, azúcares y humedad de las leches fluidas..... 27
13.	Costos de operación utilizando métodos convencionales..... 28
14.	Costos de operación según la tecnología EIC..... 29

## ÍNDICE DE FIGURAS

### Figura

1.	Variación espectral debido a cambios en la composición de las leches fluidas en el “set” de calibración con 120 muestras.....	23
2.	Diagrama de dispersión de los valores de grasa.....	24
3.	Diagrama de dispersión de los valores de proteína.....	24
4.	Diagrama de dispersión de los valores de humedad.....	25
5.	Diagrama de dispersión de los valores de azúcares.....	26

## ÍNDICE DE ANEXOS

### Anexo

1. Formulación de leches con sabores..... 34
2. Determinación del costo de los análisis químicos y el EIC..... 35

## 1. INTRODUCCIÓN

La composición de la leche es un factor importante en la industria láctea, el contenido de grasa y proteína de la leche tiene importancia económica porque, en la mayoría de centros de acopio, la leche se compra basándose en la cantidad de esos componentes y células somáticas. La medición diaria de la composición de la leche se está convirtiendo en una importante fuente de información para el manejo de toma de decisiones y podría ser una herramienta de mucho valor para la industria láctea (Carrillo *et al.*, 1993).

Una disminución del contenido de grasa en la leche puede indicar un desbalance en el forraje o concentrado utilizado en las dietas (Hawke y Taylor, 1995). El contenido de lactosa en la leche es muy estable y una desviación podría ser usada como un indicador adicional para el diagnóstico de mastitis. El contenido de proteína de la leche es un parámetro individual para cada vaca, el cual cambia según la etapa de lactancia y cuando la cantidad de células somáticas incrementan. El contenido de proteína puede ser usado como un indicador de la energía suministrada a cada vaca, así un contenido bajo de proteína en la leche indica una deficiencia energética.

Los métodos analíticos de rutina usados para la medición de la composición de la leche son destructivos, de precio alto, consumen mucho tiempo de trabajo y dañan el medio ambiente. En la actualidad hay varios instrumentos que se basan en la espectroscopía en el infrarrojo cercano (EIC), NIR en inglés (“Near Infrared Reflectance”) para análisis de leche como lo es Milko Scan y el EIC con sus respectivas curvas ya calibradas y validadas (Tsenkova *et al.*, 1999).

### 1.1 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

El costo de realizar un análisis proximal haciendo uso de la metodología convencional y considerando únicamente reactivos y cristalería es de 280 lempiras (18 US \$) por muestra. Si a estos costos se añadiera la mano de obra y la depreciación del equipo, los precios de servicio serían más reales. Además, al momento de realizar las pruebas de proteína, humedad, grasa, cenizas y lactosa se invierte un tiempo de 1 a 3 días laborales y se obtienen productos de desechos, como ácidos, detergentes y gases irritantes, que se descartan al acueducto sin ningún tratamiento, considerándolos como fuente primaria de contaminación del agua y aire. Hasta la actualidad no se ha hecho ningún estudio para medir el daño ambiental que se ocasiona.

## **1.2 ANTECEDENTES**

El Laboratorio de Composición de Alimentos del Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP), ubicado en la ciudad de Guatemala, usando la metodología tradicional cobra en promedio 192 US \$ por muestra para etiquetado nutricional que incluye humedad, cenizas, grasa, proteína, carbohidratos, sodio, vitamina A y C. El valor de carbohidratos lo obtienen por diferencia, de manera que el resultado no siempre es exacto.

En los Estados Unidos algunos de los laboratorios de análisis de alimentos han sustituido el método convencional por una tecnología de espectroscopía en el infrarrojo cercano, bajo el principio de la reflectancia difusa, útil para la medición de proteína, grasa, humedad, cenizas y azúcares de cualquier muestra, siempre y cuando tengan la curva de calibración específica para productos y componentes. El tiempo para realizar este análisis es de alrededor de 30 segundos por muestra (Wehling, 1998).

El precio comercial de medir cada componente de interés de una muestra de alimento es en promedio US \$10 - 12 usando la tecnología del infrarrojo cercano. En el caso de los métodos convencionales el precio comercial para proteína (Kjeldahl) es de 30 US \$, 15 US \$ para grasa (Mojonnier), 10 US \$ para humedad (horno) o cenizas (incineración).

## **1.3 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO**

El hato lechero de Zamorano tiene un nivel de producción de 2,150 litros de leche cruda por día que son vendidos a la planta de lácteos, supliéndola en un 86 % del volumen que maneja y alrededor de 400 litros son comprados a productores. Se estima que en el año 2,006 el nivel de producción llegará a 4,150 litros por día.

En la planta de lácteos, la leche cruda que se recibe se destina para varios procesos de elaboración de quesos y leches fluidas, para estas últimas los productos de mayor demanda son: leche homogeneizada (a 2% de grasa), leche sabor a chocolate y leche sabor a fresa. Considerando una expansión en la producción será necesario establecer un plan de control de calidad, en donde la tecnología EIC será una pieza importante para monitorear la composición del producto durante el procesamiento y garantizar la calidad del producto final. Conociendo la composición se podría calcular índices de rendimiento de la materia prima y saber así en que partes del proceso se tienen pérdidas.

## **1.4 OBJETIVOS**

### **1.4.1 Objetivo general**

1. Calibrar y validar el instrumento SY-3650-II, Analizador versátil de bebidas y alimentos, para leches fluidas.

### **1.4.2 Objetivos específicos**

1. Determinar la composición de proteína, grasa, humedad y azúcares de leche entera, leche homogeneizada, leche descremada, leche sabor a chocolate y leche sabor a fresa, utilizando técnicas convencionales.
2. Determinar si los lotes de producción son homogéneos.
3. Establecer y validar las curvas de calibración EIC para proteína, grasa, humedad y azúcares de las leches.
4. Determinar y comparar los costos de los análisis EIC y métodos convencionales.



## **2. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1 GENERALIDADES**

#### **2.1.1 Definición de leche**

El Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial (ICAITI) da la siguiente definición: “Leche fresca de vaca es el producto íntegro, no alterado ni adulterado, del ordeño higiénico regular, completo e ininterrumpido de vacas sanas, que no contenga calostro y que esté exento de color, olor, sabor y consistencia anormales” (Revilla, 2000).

#### **2.1.2 Composición de la leche**

Según Revilla (2000), la leche es un alimento de primera necesidad para el ser humano y su valor alimenticio depende de la clase y cantidad de nutrimentos que estén presentes. La industria láctea necesita conocer cada uno de sus componentes para el desarrollo de nuevos productos que garanticen y conserven el valor nutricional.

Los constituyentes de la leche se agrupan en agua y sólidos totales (ST), este último se divide en sólidos grasos (SG) y sólidos no grasos (SNG). Los sólidos no grasos se conocen también como sólidos del suero de la leche (SS), sólidos del plasma (SP), extracto seco desangrado (ESD), extracto seco magro (ESM) y está formado por los carbohidratos, proteínas y sales minerales (Revilla, 2000), la proporción de estos componentes se muestra en el Cuadro 1.

Según Revilla (2000), la leche difiere en su composición y los factores que la hacen variar son: especie, raza, ordeño, tiempo de ordeño, cuartos de ubre, periodo de lactancia, estado nutricional, composición del alimento, estaciones del año, temperaturas ambientales, edad, salud de la ubre, enfermedades en general, condición de la vaca en el momento del parto, cambio de sistema de ordeño, ejercicios, hormonas, drogas, selección genética, periodo seco de la vaca e iluminación.

Cuadro 1. Composición porcentual de la leche.

Componente	Rango	Promedio
Agua	79 – 90.5	87
Lactosa	3.5 – 6	4.9
Grasa	2.2 – 8	3.9
Proteína	2.7 – 4.8	3.5
Minerales	0.65 – 0.9	0.8

Fuente: Revilla, 2000.

### 2.1.3 Importancia de los constituyentes de la leche

**Agua.** La mayor parte del agua de la leche se encuentra en forma libre y sirve como medio de solución, dispersión o suspensión para los otros ingredientes, quedando así éstos bien distribuidos y asegurando que en pequeñas cantidades de leche se puede encontrar casi todos los nutrimentos.

**Grasa.** Según Revilla (2000), la grasa de la leche es compleja porque está formada de varios compuestos con características especiales que están ligadas con la calidad de la leche. La grasa tiene una importancia económica, nutricional y funcional.

Si el contenido de grasa es alto, arriba del promedio (3.8 %), esta característica es compensada con un incremento en el precio del producto. Nutricionalmente la grasa de la leche es de fácil digestión porque la mayoría de los ácidos grasos que la forman son de cadena corta y son un medio de transporte de vitamina A, D, E y K. Este tipo de grasa le da el sabor único a la leche, además imparte una textura suave y fina a los productos de los cuales forma parte y aun en la actualidad no se ha podido reemplazar por otro tipo de grasa.

**Proteína.** Las proteínas de la leche tienen un alto valor biológico y son de importancia en la manufactura de quesos, leches en polvo y en otros productos lácteos con alto contenido de sólidos no grasos. Las proteínas de la leche están formadas por aproximadamente 78% de caseínas, 17% de proteínas de lactosuero y 5% de sustancias nitrogenadas no proteicas (Revilla, 2000).

La caseína puede ser precipitada de la leche por medio de ácidos débiles, alcohol y por la adición de enzimas de origen animal o microbiano. La caseína es importante en la industria de quesos ya que representa el 30 % del producto terminado; además en la industria del papel es utilizada como repelente del agua y como agente que une y da una superficie lisa a este producto. La caseína es útil también en la manufactura de plásticos

inflamables, peines, hebillas, botones, bolas de billar e imitaciones de hueso y marfil, por estas razones la medición del contenido proteico en la leche es útil para los procesos técnicos (Revilla, 2000).

**Lactosa.** La lactosa representa cerca del 4.9 % de la leche, lo cual equivale al 98% de los carbohidratos que contiene ésta. La lactosa es esencial en la elaboración de todos los productos lácteos fermentados y maduros porque sirve de energía para los microorganismos, además contribuye con el 30% del valor energético y da textura y solubilidad a productos congelados. En los productos tratados con altas temperaturas, ayuda a mantener el sabor y color de éstos (Revilla, 2000).

**Minerales.** “El porcentaje de minerales en la leche, normalmente es mayor que el que se encuentra en las cenizas provenientes de este producto; debido a la oxidación de algunos elementos durante la incineración. Esta diferencia puede ir de 0.9 % en la leche a 0.6% en las cenizas” (Revilla, 2000).

## 2.2 ESPECTROSCOPIA EN EL INFRARROJO CERCANO

La espectroscopía es el estudio de las interacciones entre la energía radiante y la materia (Fessenden y Fessenden, 1982). La espectroscopía infrarroja se relaciona con la medición de la absorción de diferentes frecuencias de radiación infrarroja por alimentos u otros sólidos, líquidos o gases. En 1940 la espectroscopía infrarroja se convirtió en una importante herramienta usada por científicos químicos, en la identificación de grupos funcionales de compuestos orgánicos. En 1970 fue introducido comercialmente un instrumento, basado en la reflectancia en el infrarrojo cercano, para determinar en forma rápida el contenido de humedad, proteína y grasa en granos de cereales y otros alimentos. Actualmente es ampliamente utilizado por la industria para hacer análisis cuantitativos y cualitativos de alimentos terminados y en proceso (Wehling, 1998).

El EIC ha demostrado ser una herramienta exitosa en agricultura y en la industria de alimentos, por su rapidez y conveniencia, en los análisis proximales y para el control de calidad de varios productos (Osborne *et al.*, 1993). El EIC incluye ventajas como simplicidad, velocidad y medición simultánea de un número de constituyentes de interés.

### 2.2.1 Principios de la espectroscopía en el infrarrojo cercano

La radiación infrarroja es energía electromagnética con longitudes de onda ( $\lambda$ ) más grandes que la luz visible, pero más cortas que las microondas. Generalmente las longitudes de onda usadas en el infrarrojo van de 0.8 a 100 micrómetros ( $\mu\text{m}$ ) y está dividida en la región del infrarrojo cercano (0.8 a 2.5  $\mu\text{m}$ ), el infrarrojo medio (2.5 a 15  $\mu\text{m}$ ) y el infrarrojo lejano (15 a 100  $\mu\text{m}$ ). La región del infrarrojo cercano y medio son útiles para análisis cuantitativos y cualitativos de alimentos (Wehling, 1998).

La radiación infrarroja puede ser medida en términos de frecuencia, la cual es útil porque la frecuencia está directamente relacionada con la energía de la radiación por la siguiente igualdad.

$$E = h \nu$$

Donde E = energía del sistema      h = constante Planck.  
 $\nu$  = frecuencia en hertz.

La frecuencia es comúnmente expresada como número de ondas ( $\nu$ ), el cual es calculado de la siguiente manera.

$$\nu = 10^4 / (\lambda \text{ en } \mu\text{m})$$

Según Baltes (1990), la radiación infrarroja puede excitar a las moléculas, sobre la base de que las distancias de los átomos en las moléculas no son fijas, sino que asumen una posición de equilibrio permitiendo así vibraciones con estiramiento o deformación de los enlaces individuales. Según Wehling (1998), una molécula vibra cuando hay una distribución de su carga al absorber energía y el momento dipolo eléctrico cambia durante la vibración. Las vibraciones que se provocan al haber un cambio en el momento dipolo producen movimientos de estiramiento y plegamiento.

El nivel de energía para algunas moléculas está dada por la siguiente ecuación:

$$E = (\nu + \frac{1}{2}) (h/2\pi) (\sqrt{k / (m_1 m_2 / (m_1 + m_2))})$$

En donde  $\nu$  = número de vibraciones contables    h = constante Planck  
 k = fuerza constante del enlace o puente  
 $m_1$  y  $m_2$  = masa de los átomos involucrados en la vibración.

Según Wehling (1998), la frecuencia de la vibración es directamente proporcional a la fuerza del enlace e inversamente proporcional a la masa del sistema molecular. Cuando una molécula aumenta su nivel de excitación a un primer estado, la frecuencia es referida como absorción fundamental y cuando llega al segundo o tercer estado es referida como sobretono.

### 2.3. REGIÓN ESPECTRAL DEL INFRARROJO CERCANO

Las longitudes de onda en la región espectral del infrarrojo cercano son de 0.7 a 2.5 micrómetros ( $\mu\text{m}$ ), lo que equivale a 700 – 2500 nanómetros (nm). Los instrumentos comerciales disponibles para analizar los componentes de los alimentos usan la espectroscopía infrarroja a través de la técnica de reflectancia difusa.

## 2.4. PRINCIPIOS DE REFLECTANCIA DIFUSA

Según Wehling (1998), cuando la radiación infrarroja golpea un material sólido o granular, parte de esa radiación es reflejada de la superficie de la muestra y este espejo de radiación es llamado reflectancia especular, esta porción de luz tiene poca información de la muestra.

“La mayoría de radiación de reflectancia especular es dirigida de regreso hacia la fuente de energía. Otra porción de esa radiación penetrará a través de la superficie de la muestra y será reflejada por varias partículas de la muestra antes de que salga de ella. Esto es referido como reflectancia difusa y esta radiación emerge de la superficie en ángulos de 180 grados al azar. Cada vez que la radiación interactúa con las partículas de la muestra, los constituyentes químicos pueden absorber una porción de la radiación. La radiación de reflectancia difusa brinda información acerca de la composición química de la muestra, como un indicador de la cantidad de energía absorbida a diferentes longitudes onda (Wehling 1998).

La cantidad de radiación que penetra y sale de la superficie de la muestra depende del tamaño y de la forma de las partículas de la muestra. En muestras de forrajes el grado de molienda afecta el espectro EIC.

## 2.5 BANDAS DE ABSORCIÓN EN EL EIC

Las bandas de absorción observadas en la región EIC son primariamente por sobretonos, por lo tanto las absorciones tienden a ser débiles pero lo suficientemente intensas para ser observadas en la región EIC. Los grupos funcionales que tienen un átomo de hidrógeno unido a un carbono, nitrógeno u oxígeno son grupos comunes en los principales constituyentes del alimento, como lo son el agua, proteínas, lípidos y carbohidratos (Wehling, 1998). En el Cuadro 2 se muestran las bandas de absorción asociadas con los principales constituyentes en los alimentos.

Cuadro 2. Bandas de Absorción de los principales componentes en alimentos.

Constituyente	Absorción	Longitudes de onda (nm)
Agua	-OH estiramiento/ deformación combinada.	1920-1950
	- OH estiramiento	1400 - 1450
Proteínas (péptidos)	-NH deformación	2080-2220
		1560-1670
Lípidos	Metileno –CH estiramiento	2300-2350
	Ch2 y CH3 estiramiento	1680-1760
Carbohidratos	C-O, O-H combinación de estiramiento.	2060-2150

Fuente: Wehling, 1998.

Las bandas de absorción en la región EIC tienden a ser anchas, útiles para trabajos cuantitativos y frecuentemente sobrepuestas, útiles para trabajos cualitativos.

La fuente de radiación en la mayoría de los instrumentos EIC es una lámpara de tungsteno-halógeno con una cubierta de cuarzo, similar a una protector de lámpara. Esas lámparas emiten cantidades significativas de radiación en ambas regiones espectrales de luz visible e infrarroja cercano. Algunos instrumentos, que tienen un monocromador basado en rejillas de difracción, permiten que las mediciones se tomen en cada longitud de onda de la región espectral del EIC.

Todas las mediciones de reflectancia son hechas con una referencia estándar que debe de tener una reflectancia difusa del 100% a todas las longitudes de onda de interés. El azufre en polvo ha sido propuesto como referencia estándar para la región del infrarrojo cercano por su alta reflectancia infrarroja, particularmente en la región de 2100 nm (Stewart y Whitaker, 1983).

Según Stewart y Whitaker (1983), lo más importante en el funcionamiento estándar del equipo es la estabilidad de la reflectancia, es decir que la reflectancia debe ser la misma para todas las longitudes de onda. Para un conveniente funcionamiento estándar en la región del infrarrojo cercano se debe de utilizar cristales de teflón y una cerámica especial.

Los factores que afectan la reflectancia en la muestra son: coeficientes de concentración y absorción de cada constituyente, el tamaño y forma de la partícula, índice refractivo de las partículas, homogeneidad de la muestra. La reflectancia varía exponencialmente con los coeficientes de concentración y absorción.

La medición de reflectancia y transmitancia en algunos instrumentos es posible por la posición de los detectores en ángulos de 45 grados con respecto al rayo de luz que penetra, de este modo la radiación reflejada especularmente (en la misma dirección) no es medida. Otros instrumentos utilizan una esfera metálica integrada cubierta de oro con detectores colocados adentro de ella. La esfera recolecta la reflectancia difusa y la dirige hacia los detectores y la radiación especular sale por el espacio de donde entra el rayo de luz infrarrojo.

Según Wehling (1998) en cada longitud de onda, la intensidad de la luz reflejada de la muestra es comparada con la intensidad reflejada de un material no absorbente, como lo es la cerámica o material fluorocarbono, así la reflectancia es calculada por la siguiente fórmula :

$$R = I / I_0$$

Donde I = Intensidad de la radiación reflejada de la muestra a longitud de onda dada.

$I_0$  = La intensidad de radiación reflejada de la referencia a la misma longitud de onda.

Los datos de reflectancia son comúnmente expresados como  $\log (1/R)$  y es una expresión análoga a absorbancia en trasmisión espectroscópica.

## **2.6 CALIBRACIÓN**

Las ecuaciones de calibración cuantifican la relación de la absorción del EIC y los valores de referencia de los métodos de laboratorio (VRML). La precisión de esta conversión es medida como el error estándar de calibración (EEC) y el error estándar de predicción (EEP). Los datos espectrales producidos por el EIC representan el total de las propiedades químicas y físicas de la muestra; sin embargo, las propiedades físicas y el tamaño de las partículas afectan a todo el espectro.

## **2.7 MÉTODOS DE REGRESIÓN**

Son procedimientos estadísticos que cuantifican el grado de relación entre dos o más variables, teniendo una habilidad predicha una respecto a la otra. El modelo matemático ajustado por un sistema de regresión es  $Y = B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + \dots + B_pX_p$ , donde Y es la variable a ser predicha y  $B_0$  es el intercepto en la ecuación,  $B_1$  y  $B_p$  son los coeficientes y relacionan los cambios en la variable X y Y. El valor p es el número de X variables. En nuestro ejemplo, Y es un valor de referencia del laboratorio y  $X_1$  y  $X_p$  son los valores de absorción EIC (Foss Nirsystems, 2000).

### **2.7.1 Regresión por componentes principales (RCP)**

El procedimiento para componentes principales trata de reducir la información espectral en factores independientes (componente principal). Estos factores son formados sin la información química y explican únicamente la variación espectral por la intercorrelación espectral. Un “score” (puntaje) es producido por la multiplicación de los valores espectrales de absorbancia por cada componente principal, de manera que hay una condensación de la información espectral en algunos “scores” y al final la regresión múltiple se aplica a estos “scores” (Foss Nirsystem, 2000).

### **2.7.2 Cuadrados mínimos parciales (CMP)**

El procedimiento utiliza todo el espectro y para determinar los factores utiliza los VRML, de manera que este método es más preciso que RCP.

### **2.7.3 Cuadrados mínimos parciales modificado (CMPM)**

Este método es más preciso y estable que CMP porque los residuales EIC en cada longitud de onda, obtenidos después de calcular cada factor, son estandarizados antes de calcular el siguiente factor (Foss Nirsystems, 2000).

#### **2.7.4 Sistema neural**

Este método es el más preciso de todos y ofrece mejores técnicas de calibración para resolver relaciones no lineales en los datos espectrales (Foss Nirsystems, 2000).



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 LOCALIZACIÓN

El estudio se realizó de abril a octubre del 2001 en el Centro de Evaluación de Alimentos (CEA), Zamorano, Honduras.

#### 3.2 MATERIALES

*Materia prima:*

- Leche cruda.
- Leche homogeneizada (2% de grasa).
- Leche sabor chocolate o chocolatada (1.5% de grasa).
- Leche sabor fresa (2% grasa).
- Leche descremada (0.5% de grasa).

*Para muestreo:*

- 1 beaker de 250 ml
- 1 tijera.
- 120 bolsas plásticas de 454 ml
- 1 rejilla.
- 1 agitador.

Instrumento NIR, SY –3650-II. Analizador versátil de alimentos y bebidas.  
Monocromador Sistema II, Módulo detector de reflectancia.  
Módulo de transporte de muestras.  
Paquete de Software WINISI II para el desarrollo de calibraciones.  
Celda para muestras líquidas.

#### 3.3 MUESTREO DE LAS LECHES DE ZAMORANO

Un total de 150 muestras de leche se recolectaron de la planta de lácteos y del establo de ordeño de Zamorano. Para calibrar el SY-3650II, se analizaron 120 muestras en total de las distintas leches. Para validar las curvas de calibración se necesitaron 30 muestras y todas las leches se recolectaron, como se indica en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Plan de muestreo de las leches.

PRODUCTO	PRODUCCIÓN		# MUESTRAS / SEMANA <sup>b</sup>
	TOTAL (L/DÍA) <sup>a</sup>	FRECUENCIA	
Leche cruda	2100	Diario	5
Leche homogeneizada.	1000	Diario	5
Leche sabor a chocolate.	500	Diario	5
Leche sabor a fresa	200	Miércoles	5
Leche descremada.	800	Diario	5

a. Ing. Manuel Morales, Jefe de la Planta de Lácteos.

b. Codex Alimentarius (FAO/OMS, 1995).

La recolección de las muestras en la planta de lácteos se realizó semanalmente, para un total de 25 muestras que se congelaron hasta el momento de ser analizadas, la descongelación se realizó a temperaturas de refrigeración (4 a 6 ° C) por 12 horas.

Las muestras de leche cruda se recolectaron en el mes de abril 2001, en cambio las leches procesadas se recolectaron en el mes de julio del mismo año.

El volumen de la muestra final para análisis fue de 150 ml y el tiempo de muestreo fue de 6 semanas consecutivas.

### 3.4 FORMA DE MUESTREO

*Leche cruda:* En el establo se mide semanalmente la producción de leche del hato (110 vacas), esto se hace en los ordeños de la tarde del jueves y de la mañana del viernes. Se tomaron muestras de leche de 24 vacas elegidas al azar y de ambos ordeños. La muestra final resultó de la mezcla de ambos en proporción 60:40 (mañana y tarde) que es la relación típica de producción de leche en el ordeño doble.

*Leche homogeneizada y leche sabor a chocolate:* De cada 100 bolsas de un litro, se tomó una bolsa, y se agitó por 2 minutos antes de recoger la muestra.

*Leche sabor a fresa:* El producto es dispensado en 5 o 6 tambos de 40 litros, cada uno se agitó por dos minutos antes de tomar la muestra.

*Leche descremada:* Se recolectó 5 muestras de 150 ml directamente del flujo que sale de la descremadora, a intervalos de 20 minutos cada uno, previo a la recolección el tanque de recepción se agitó por 2 o 3 minutos, esto se hizo con el fin de mezclar la grasa que sobrenada.

### 3.5 GRADO DE PRECISIÓN DEL OPERADOR

Antes de dar inicio a los análisis de las muestras que fueron usadas para calibración, el operador fue entrenado para que dominara el uso del método Kjeldahl, Babcock, gravimétrico y fenol-ácido sulfúrico. Se le entregaron 20 muestras sin que él supiera que provenían de la misma muestra compuesta de leche homogeneizada para que determinara las concentraciones de proteína, grasa, humedad y azúcares.

En el Cuadro 4 se puede observar el grado de precisión analítica del operador, se obtuvo mayor precisión en los análisis de proteína y humedad (CV de 0.74 y 0.14 %, respectivamente). Estos resultados indican que el operador era confiable, aunque los métodos de grasa y azúcares señalaban cierta variación en resultados. Las variaciones mayores en grasa (CV de 13%) se deben a que este método es poco sensible a cambios pequeños en concentración y hay mayor error experimental. Para azúcares la variación es alta (CV de 12%) porque es un método muy sensible y sujeto a error ya que requiere diluciones de la muestra hasta partes por millón (ppm).

Cuadro 4. Estadística descriptiva del grado de precisión analítica.

Componente	Promedio (%)	Desviación estándar (%)	Coefficiente de variación(%)
Proteína	2.97	0.02	0.74
Humedad	90	0.13	0.14
Grasa	3.40	0.40	13
Azúcares	5.90	0.40	12

### 3.6 PROCEDIMIENTO PARA TOMAR EL ESPECTRO EIC

Previo a cada recolección de espectros se pasaron las pruebas de diagnóstico del instrumento, para tener una mayor precisión en los espectros. La primera prueba es conocida como la respuesta del instrumento, la segunda como precisión de las longitudes de onda y la tercera es la prueba de repetibilidad del EIC, esta última es la más importante porque nos indica si la humedad del ambiente puede afectar la lectura del espectro.

El espectro de reflectancia de todas las leches fue obtenido con el equipo SY -3650-II utilizando la celda IH-0397 para muestras líquidas, con un volumen de 20 ml de leche. Los espectros fueron tomados en un rango de longitudes de onda de 1100 a 2498 nm a intervalos de 2 nm y fueron grabados en la computadora como coeficientes de absorbencia ( $\log 1/R$ ). Cada espectro obtenido fue el promedio de 25 barridos ("scan"), mostrando los resultados en una gráfica de absorción. La temperatura de las muestras era de 4 a 6 °C.

### **3.7 VARIABLES MEDIDAS**

Cada muestra fue analizada en los siguientes componentes: proteína, grasa, humedad y azúcares. Cada componente se analizó según el procedimiento específico de la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC, 1990). Así tenemos:

Grasa : Por Babcock y en el caso de los productos azucarados (leche chocolatada y con sabor a fresa) se usó el método Babcock modificado (con hidróxido de amonio, butanol y ácido sulfúrico) (Revilla, 2000).

Proteína Cruda: Por Kjeldahl ( $N \times 6.38$ ).

Humedad: Por deshidratación a  $105^{\circ} \text{C}$  hasta peso constante.

Azúcares: Por el método colorimétrico de fenol – ácido sulfúrico para carbohidratos totales, usando una curva de lactosa para los cálculos.

Las muestras que se utilizaron para la validación de las curvas, fueron analizadas primero con los métodos de la AOAC y luego con el instrumento EIC en proceso de calibración.

### **3.8 MANEJO DE LOS DATOS**

#### **3.8.1 Datos EIC**

Se utilizó el “software WINISI II” para procesar los datos que provienen del EIC y para el desarrollo del modelo de estimación del contenido de proteína, grasa, azúcares y humedad. Todos los valores de reflectancia se convirtieron a  $\text{Log}(1/R)$  para dar una función lineal, sensible a cambios en la concentración de los constituyentes.

#### **3.8.2 Datos de laboratorio**

Al momento de tener todos los valores de cada componente de las 120 muestras, se calcularon las variables estadísticas de tendencia central (media aritmética) y dispersión (desviación estándar, coeficiente de variación, varianza) para saber si los valores presentaban una distribución normal, si las pruebas estuvieron bien manejadas y si había homogeneidad en las muestras.

### **3.9 PROCEDIMIENTO DE CALIBRACIÓN**

Una vez recolectados los 120 espectros para calibración y obtenidos los valores de referencia de los métodos de laboratorio (VRML) se utilizó el Software WINISI II para desarrollar la curva, que incluye los siguientes pasos:

### **3.9.1 Centrado de los espectros y VRML**

EL programa relaciona los espectros y los VRML y los agrupa dentro de un círculo (GLOBAL H) con un diámetro de 3 H (H es una medida de variación espectral). Todos aquellos espectros y sus valores fuera del valor H se consideran valores fuera de serie y son automáticamente eliminados.

### **3.9.2 Selección de los espectros y sus respectivos VRML**

Una vez centrados los valores, algunos de ellos son semejantes entre sí de manera que el programa los agrupa basándose en vecindad con un valor de uno. Esta opción forma pequeños circulitos dentro del círculo grande y esto tiene una ventaja porque se tiene mayor precisión en el desarrollo de la ecuación. En esta etapa del proceso es donde se forman los “scores” de cada espectro y que son utilizados como factores dentro del desarrollo de la ecuación.

### **3.9.3 Desarrollo de la ecuación**

La base de datos utilizada para la ecuación es la que maneja los espectros seleccionados con sus respectivos VRML. El sistema de regresión múltiple utilizado fue el de Cuadrados Mínimos Parciales Modificado (CMPM) porque es más estable, preciso y el residual de cada longitud de onda obtenida después de cada factor es calculado y estandarizado antes de calcular el siguiente factor.

El tratamiento matemático que tuvieron los espectros fue el 2, 10, 4, 1 que consiste en aplicación de la segunda derivada, el valor 10 es un rango del segmento GAP (espacio), estos dos tratamientos son útiles para eliminar variación dentro de los espectros. Los valores 4 y 1 corresponden a la función suavizador. La segunda derivada puede ser útil además para eliminar el efecto de sombra de los espectros.

Los parámetros estadísticos para la evaluación de las curvas serán: el  $R^2$ , el error estándar de calibración (EEC) y el error estándar de predicción (EEP).

## **3.10 PROCEDIMIENTO PARA LA VALIDACIÓN DE LAS CURVAS**

Un total de 30 muestras se analizaron por los métodos tradicionales de laboratorio y por el EIC. Ambos resultados se compararon y se hizo un análisis de diferencia de medias, para saber el grado de precisión del instrumento.

La única variante en la estructuración del instrumento, al momento de hacer la lectura del espectro, es la fuente de comparación que en este caso es el archivo que tiene las ecuaciones desarrolladas con los constituyentes de interés.

### **3.11 CÁLCULO DE COSTOS**

#### **3.11.1 Métodos tradicionales**

En el desarrollo de cada método para determinar cada componente se hizo una identificación minuciosa de los insumos gastados y se clasificaron en costos directos e indirectos y se estimó el porcentaje de participación de cada insumo en el costo real de cada componente, en cada prueba específica.

#### **3.11.2 Método EIC**

Para determinar el costo por muestra se basó en la vida útil de la lámpara de tungsteno y la depreciación del equipo y accesorios (computadora). El instrumento trae dos lámparas y cada lámpara tiene una vida útil de 2 años.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 COMPOSICIÓN DE LAS MUESTRAS

Los Cuadros 5, 6, 7 y 8 muestran los resultados de los análisis químicos convencionales para grasa, proteína, humedad y azúcares, respectivamente. Todas las leches usadas en el grupo de calibración se agruparon para detectar variaciones y similitudes.

#### 4.1.1 Grasa

Los valores de grasa para cada tipo de leche (Cuadro 5) tienen una desviación estándar (DE) menor a 0.5% indicando que las muestras son semejantes entre sí; aunque la mayor variación fue en leche cruda con una DE de 0.45% y un Coeficiente de Variación (CV) del 11% y es debida a que las muestras se obtuvieron de vacas “Holstein”, “Jersey” y “Guernsey” a distintos periodos de lactancia. Sin embargo, el valor promedio esperado era de 3.9% y se obtuvo un promedio de 4%. En el caso de la leche descremada con una DE y CV de cero puede ser debida a que el rango de valores es muy bajo y estrecho y el método Babcock es poco sensible a bajas concentraciones de grasa. La variación de la leche homogeneizada y leches azucaradas (leche chocolate y fresa) puede explicarse por pequeños cambios al momento de estandarizar el producto o al momento de agregar otros insumos, como azúcar o cocoa, que podría alterar las proporciones de la formulación (ver Anexo 1). La variación en todas las muestras puede deberse a su naturaleza y el operador, porque éste tuvo un CV de 13.66% de desempeño en esta prueba.

Cuadro 5. Estadística descriptiva de la grasa en las distintas leches de Zamorano.

Tipo de leche	GRASA (%)					
	Media aritmética	Desviación estándar	Coeficiente de variación	Varianza	Rango	
					Máximo	Mínimo
Leche cruda	4.00	0.45	11.23	0.21	4.65	2.95
Leche descremada	0.01	0.00	0.00	0.00	0.02	0.01
Leche homogeneizada	1.96	0.07	3.42	0.00	2.05	1.80
Leche sabor a chocolate	2.08	0.08	3.73	0.01	2.20	1.95
Leche sabor a fresa	2.09	0.13	6.00	0.02	2.35	1.90

#### 4.1.2 Proteína

Los valores de proteína promedio de cada tipo de leche (Cuadro 6) presentan una desviación estándar menor a 0.5% y un coeficiente de variación menor a 11% indicando que las muestras son homogéneas.

Cuadro 6. Estadística descriptiva de la proteína en las distintas leches de Zamorano.

Tipo de leche	Proteína (%)					
	Media	Desviación	Coeficiente	Varianza	Rango	
	aritmética	estándar	de variación		Máximo	Mínimo
Leche cruda	3.37	0.16	4.73	0.03	3.66	3.00
Leche descremada	3.60	0.07	1.84	0.00	3.67	3.40
Leche homogeneizada	3.10	0.13	4.35	0.02	3.50	2.88
leche sabor a chocolate	3.11	0.15	4.81	0.02	3.29	2.63
Leche sabor a fresa	3.13	0.12	3.90	0.01	3.30	2.90

El valor promedio esperado para leche cruda es de 3.3% y las variaciones son debidas a la raza de vaca, al periodo de lactancia y alimentación. El contenido de proteína en la leche descremada es 3.6% porque el contenido de grasa ha sido removido. Las variaciones en leche especial en el rango de 3.5 a 2.9% son debidas al procesamiento y estandarización. Así mismo las variaciones en las leches azucaradas pueden ser por cambios en las formulaciones (ver Anexo 1). El grado de precisión del operario era de 0.02% de DE y con un CV de 0.74% (Cuadro 4) de manera que la variaciones son por la naturaleza de las muestras y no por error experimental.

#### 4.1.3 Humedad

Los resultados de las pruebas de humedad por el método gravimétrico (Cuadro 7) estuvieron bien manejados, porque los coeficientes de variación son menores del 3%. La dispersión de los valores con respecto a la media es menor al 2% indicando que las muestras son homogéneas. El porcentaje de humedad de la leche cruda coincide con el valor esperado promedio que es del 88%; en el caso de la leche especial y leche descremada los valores son mayores porque se ha removido parte de la grasa. Los valores para leche chocolatada y sabor a fresa son menores porque se adiciona azúcar y saborizantes en cantidades según la formulación. El grado de precisión del operario fue de 0.13% de DE y 0.14% de CV (Cuadro 4) indicando así que las variaciones dadas son por la muestra.



Cuadro 7. Estadística descriptiva de la humedad en las distintas leches de Zamorano.

Tipo de leche	HUMEDAD (%)					
	Media aritmética	Desviación estándar	Coeficiente de variación	Varianza	Rango	
					Máximo	Mínimo
Leche cruda	88.64	1.96	2.21	3.84	96.15	85.88
Leche descremada	92.40	1.54	1.67	2.38	96.64	89.31
Leche homogeneizada	90.29	0.39	0.44	0.15	91.39	89.72
Leche sabor a chocolate	86.21	1.19	1.39	1.43	87.47	83.94
Leche sabor a fresa	85.58	1.82	2.10	3.31	87.22	79.83

#### 4.1.4 Azúcares

Los resultados de los azúcares por el método de fenol-ácido sulfúrico (Cuadro 8) tienen desviaciones estándares menores a 1.6% y coeficientes de variación menores al 20% indicando que las muestras no eran homogéneas.

Cuadro 8. Estadística descriptiva de los azúcares en las distintas leches de Zamorano.

Tipo de leche	AZÚCARES					
	Media aritmética	Desviación estándar	Coeficiente de variación	Varianza	Rango	
					Máximo	Mínimo
Leche cruda	5.66	0.98	17.25	0.95	8.15	3.75
Leche descremada	5.96	0.64	10.66	0.40	6.83	4.48
Leche homogeneizada	5.82	0.68	12.48	0.46	7.51	4.70
leche sabor a chocolate	11.26	1.53	13.60	2.34	13.54	8.39
Leche sabor a fresa	10.96	1.17	10.70	1.38	12.97	9.06

Este método es muy sensible porque se basa en una reacción de intensidad de color, producto del hidroximetilfulfural (HMF) formado por la deshidratación de los azúcares, pero está sujeto a error experimental por el manejo de diluciones. El valor de lactosa para leche cruda no fue el esperado que es de 4.9% y se debe principalmente a la muestra. En el caso de leche descremada y leche homogenizada los valores fueron mayores, por el hecho de haber removido un porcentaje de grasa. Los altos contenidos en las leches azucaradas se debe a la adición de 6% de azúcar que es cuantificado junto a la lactosa. El grado de

precisión del operador fue de 0.46% de DE y 12% de CV (Cuadro 4) de manera que las variaciones pueden ser debidas a la muestra y al método también.

#### 4.2 COMPARACIÓN ENTRE LOTES

Las cinco réplicas de cada tipo de leche provenían de 6 diferentes lotes (semanales) y para conocer la homogeneidad en composición química de los productos de diferentes lotes, se compararon las medias de lotes entre sí para contenidos de proteína y grasa.

En el Cuadro 9 se observan los promedios de proteína por lote para cada producto y la comparación fue realizada mediante una prueba F ( $\alpha=0.05$ ) y la separación de medias por SNK. Se observa que no hubo diferencia significativa entre lotes de las leches procesadas, excepto en las leches homogenizadas y chocolatada donde sólo un lote fue diferente al resto.

Cuadro 9. Comparación de la proteína en los lotes de leches procesadas.

PROTEÍNA, %				
#	L. DESCREMADA	L. ESPECIAL	L. CHOCOLATE	L. FRESA
LOTE 1	3.62(a)	2.89(b)	2.89(b)	3.08(a)
LOTE 2	3.58(a)	3.05(a)	3.02(a)	3.06(a)
LOTE 3	3.57(a)	3.18(a)	3.22(a)	3.23(a)
LOTE 4	3.55(a)	3.08(a)	3.22(a)	3.17(a)
LOTE 5	3.62(a)	3.18(a)	3.18(a)	3.12(a)
LOTE 6	3.59(a)	3.09(a)	3.18(a)	3.13(a)
Probabilidad	0.3096	0.0010	0.0010	0.6000

En el Cuadro 10 se comparan los contenidos grasos promedio de las leches procesadas. No se encontraron diferencias significativas entre lotes, excepto en un lote de leche sabor a fresa.

Según el Codex Alimentarius (FAO/OMS, 1995), en el nivel de inspección uno para productos sin antecedentes de problemas, cuando el peso del producto es < 1 kg y el tamaño del lote es < 4800 unidades se muestrean 6 unidades y se acepta el lote hasta con una unidad defectuosa. Por lo tanto podemos decir que los 6 lotes examinados son homogéneos.

El contenido de grasa es homogéneo (Cuadro 10) en todos los lotes de leche descremada, homogenizada y chocolate. El lote 5 de leche fresa es diferente a los demás lotes y esta variación puede ser debida al proceso de estandarización y formulación (Ver Anexo 1).

Cuadro 10. Comparación del promedio de grasa en los lotes de leches procesadas.

GRASA, %				
#	L. DESCREMADA	L. ESPECIAL	L. CHOCOLATE	L. FRESA
LOTE 1	0.01(a)	1.92(a)	2.13(a)	2.02
LOTE 2	0.01(a)	2.01(a)	2.09(a)	2.23
LOTE 3	0.01(a)	1.92(a)	2.08(a)	2.10
LOTE 4	0.01(a)	1.96(a)	2.04(a)	2.12
LOTE 5	0.01(a)	1.96(a)	2.07(a)	1.98(b)
LOTE 6	0.01(a)	1.96(a)	2.05(a)	2.09
Probabilidad	0.8000	0.2280	0.3280	0.0450

### 4.3 ESPECTROS RECOLECTADOS

Los valores de reflectancia varían exponencialmente con la concentración y los coeficientes de absorción ( $\text{Log } 1/R$ ). Si incrementa la concentración decrece la reflectancia pero el valor  $\text{Log } 1/R$  aumenta (Stewart, 1983). La variación en los espectros debido a la composición de la muestra se puede ver en la Figura 1. En el grupo 1 están todas las leches descremadas y en el 2 están las leches procesadas y leche entera.

La discontinuidad en los espectros a 1,680 y 1,760 nm es debida a la concentración de grasa y se observa el primer sobretono de estiramiento (B).

Para el componente agua (A) los mayores cambios fueron en la región de 1400 a 1450 nm y es debido al primer sobretono de estiramiento (Stewart, 1988) en cambio en la región de 1920 a 1950 nm el agua tiene una fuerte absorción de bandas y hay cambios leves (C).

La discrepancia por proteína se refleja en la región de 2,080 a 2,220 nm (D), la absorción es por el estiramiento del grupo primario carbonilo y por vibraciones de estiramiento de los grupos N-H, C-N que se da en el segundo sobretono. Los aminoácidos aromáticos se miden en el primer sobretono a 1,640 nm.

En el caso de los azúcares la variación se puede dar a lo largo de todo el espectro porque las absorciones se dan en primer sobretono y según Baer (1983) no se han reportado bandas específicas de absorción, aunque en el caso de glucosa existe una región de combinación de 2,060 a 2,150 nm (E).

El EIC es poco preciso para medir la concentración de cenizas, aunque es capaz de detectar complejos orgánicos y quelatos, pero formas iónicas y sales no absorben energía.

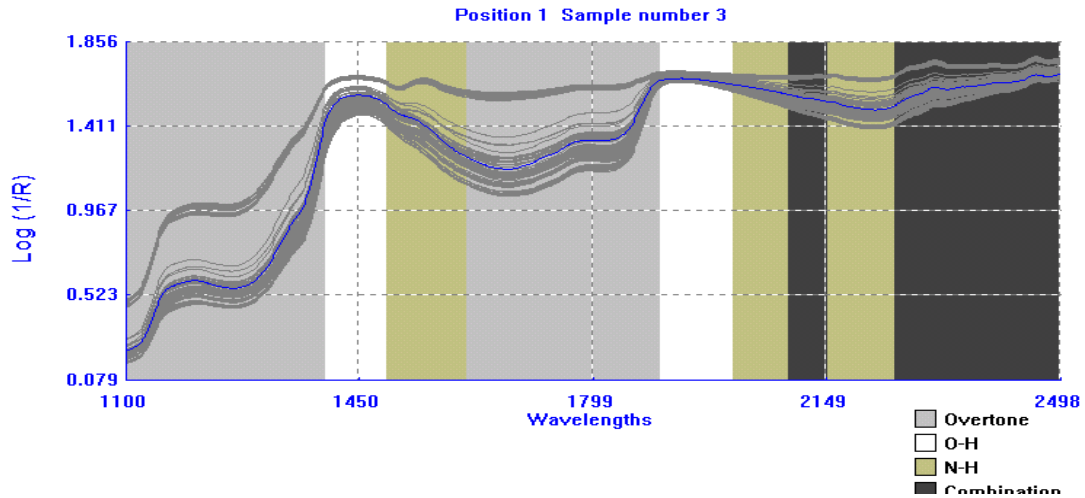


Figura 1. Variación espectral debido a cambios en la composición de las leches fluidas en el “set” de calibración con 120 muestras.

#### 4.4 DISPERSIÓN DE LOS VALORES DE LABORATORIO Y LOS ESTIMADOS POR EL EIC

Los VRML y los estimados por el EIC presentan una relación lineal. La dispersión de los valores de grasa se presenta como agrupaciones, como se observa en la Figura 2. Estas agrupaciones representan la leche descremada, las leches homogeneizadas junto con las chocolatadas y sabor a fresa y por último las enteras. La dispersión de los puntos dentro de cada rango nos indica que hay baja correlación entre los valores reales (VRML) y estimados EIC. Sin embargo, tomando en cuenta los tres grupos el ajuste al modelo lineal ( $R^2$ ) en ingles “RSQ” es de 0.934. Este valor se incrementa a 0.9894 (Cuadro 11) al eliminar las observaciones fuera de serie, que son aquéllas cuya diferencia respecto al valor estimado es mayor a una desviación estándar, y que se observan en la Figura 2 como los valores fuera de la región comprendida entre las dos líneas discontinuas, arriba y debajo de la recta de la ecuación de regresión. El error estándar de predicción corregido (EEPC) en ingles “SEPC” es de 0.30 y está dentro del límite establecido por el instrumento que es de 0.465. La diferencia entre la media de los valores de grasa del laboratorio y los estimados EIC es 0.001 (Sesgo), en ingles se reconoce como “BIAS”.

Tsenkova *et al.* (1999) realizaron una calibración EIC para grasa de leche cruda y obtuvieron un valor  $R^2$  de 0.996, utilizando 258 muestras analizadas por el método Mojonnier modificado, siendo éste más sensible especialmente en leches descremadas. La compañía REIL indica que el Milko Scan trabaja con curvas con un  $R^2$  de 0.999 y un coeficiente de variación (CV) de 1.5% de precisión (Reilip, 2001), pero este instrumento trabaja con un sólo tipo de leche, en cambio la calibración en el presente trabajo es para 5 tipos de leche y aún así se obtuvo un ajuste cercano a los recomendados.

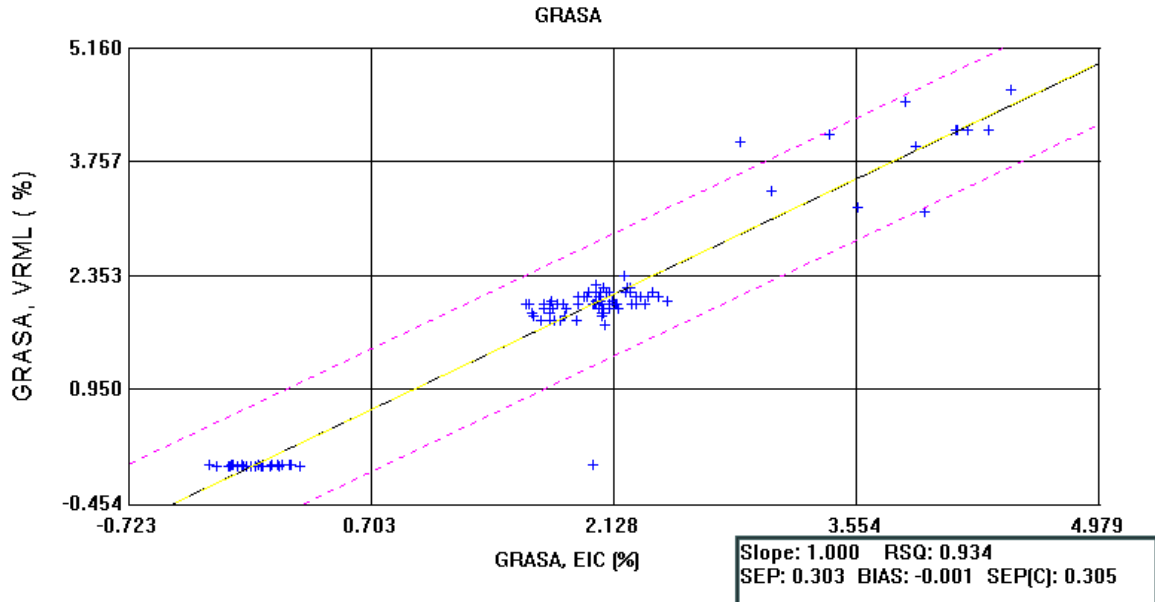


Figura 2. Diagrama de dispersión de los valores de grasa.

En la Figura 3 se presenta el diagrama de dispersión de los contenidos de proteína. El valor bias para proteína es de 0.01 y es la diferencia entre los valores de laboratorio y los estimados EIC. La curva de proteína tiene un  $R^2$  de 0.926 que se puede incrementar a 0.9740 (Cuadro 11) si se descartan las observaciones fuera de serie. El EEPC es de 0.062 que se reduce a 0.058 (Cuadro 5) al incrementar el  $R^2$  y se encuentra dentro del límite establecido por el instrumento que es de 0.074.

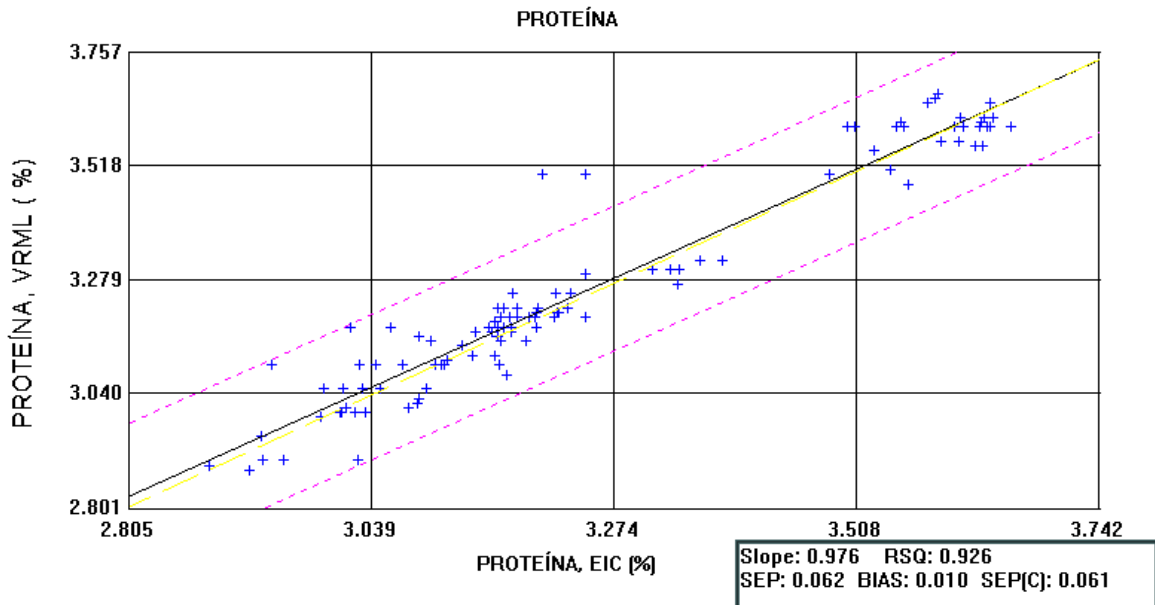


Figura 3. Diagrama de dispersión de los valores de proteína.

Reeves y Kessel (2000) analizaron el contenido proteico de abonos de lechería bajo el método Kjeldahl y encontraron un  $R^2$  de 0.962 utilizando 99 muestras. La curva de proteína del Milko Scan trabaja con un  $R^2$  de 0.999, con un CV de 1.5% y el método químico utilizado es Kjeldahl. Tsenkova *et al.* (1999) analizaron 258 leches enteras y encontraron un  $R^2$  de 0.68 para proteína, con un CV de 3.77%. Rodriguez *et al.* (1995) realizaron una calibración multiproducto utilizando 3 tipos de quesos y reportaron un  $R^2$  de 0.98 utilizando 117 muestras para validación y 25 muestras para validación.

Las curvas de calibración trabajan solamente con un tipo de producto, pero en nuestro caso se calibró para cinco productos de leche fluida y el grado de ajuste lineal encontrado es semejante a los recomendados.

En la Figura 4 se muestra el diagrama de dispersión del contenido de humedad. La diferencia entre la media de los valores del laboratorio y los estimados EIC es de 0.046, de manera que los valores estimados son levemente subestimados por el programa.

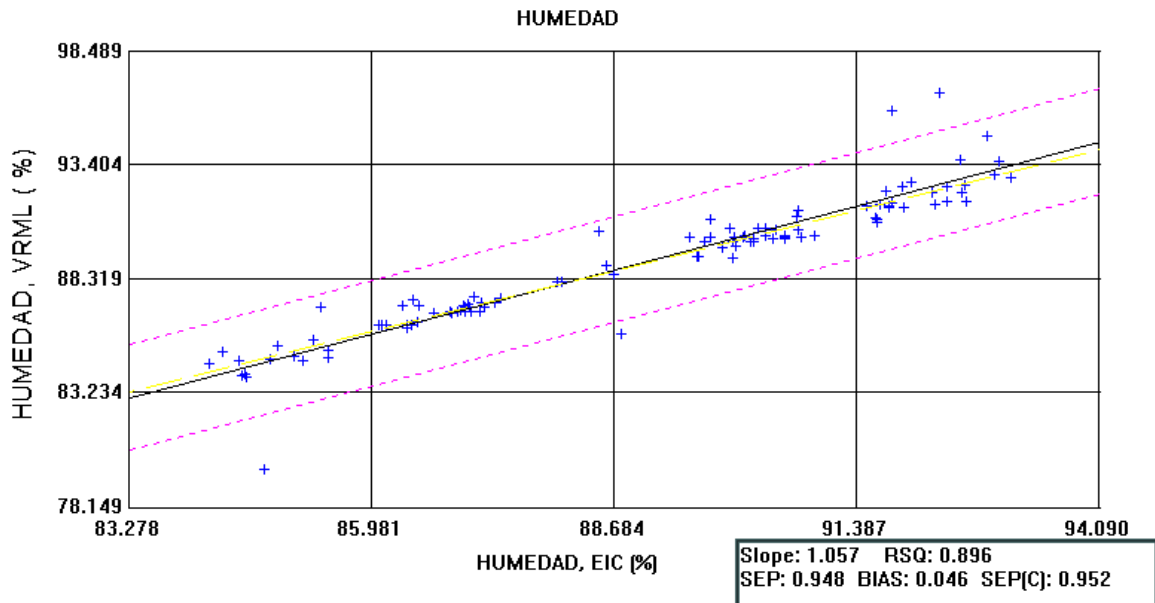


Figura 4. Diagrama de dispersión de los valores de humedad.

El ajuste al modelo lineal es de 0.952 y se incrementa a 0.9673 (Cuadro 11) al eliminar las observaciones fuera de serie. El EEPC es de 0.952 y está dentro del límite establecido por el instrumento que es de 1.16. Reeves y Kessel (2000) reportaron un  $R^2$  de 0.93 trabajando con 99 muestras de abonos de lecherías. El Milko Scan trabaja con curvas de agua con un  $R^2$  de 0.997 y con un CV de 1% (Reilip, 2001), el método de referencia recomendado por la AOAC es el gravimétrico. El  $R^2$  obtenido de la curva multiproducto es parecido a los encontrados por otros autores.

En la Figura 5 se presenta el diagrama de dispersión de los contenidos de azúcares. La diferencia entre la media de los valores de azúcares del laboratorio y los estimados EIC es de  $-0.024$  (Bias), de manera que los valores predichos sobreestiman el valor real. El ajuste lineal inicial es de  $0.926$  y se incrementa a  $0.9423$  (Cuadro 5) al eliminar las observaciones fuera de serie. Estas se observan fuera del límite establecido que es una desviación estándar respecto a la media. El valor EEPC es de  $0.749$  y está dentro del límite que es de  $1.091$ . Tsenkova *et al.* (1999) reportaron un  $R^2$  de  $0.707$  y un CV de  $2.07\%$  considerando 58 muestras de leche cruda. El Milko Scan trabaja con curvas con un  $R^2$  de  $0.99$  y con un CV de  $1\%$  (Reilip, 2001), y el método utilizado para obtener los VRML es el polarimétrico. La curva en este trabajo es multiproductos y los valores  $R^2$  obtenidos son semejantes a los reportados por los científicos, aunque se usó un método colorimétrico muy sensible a error experimental.

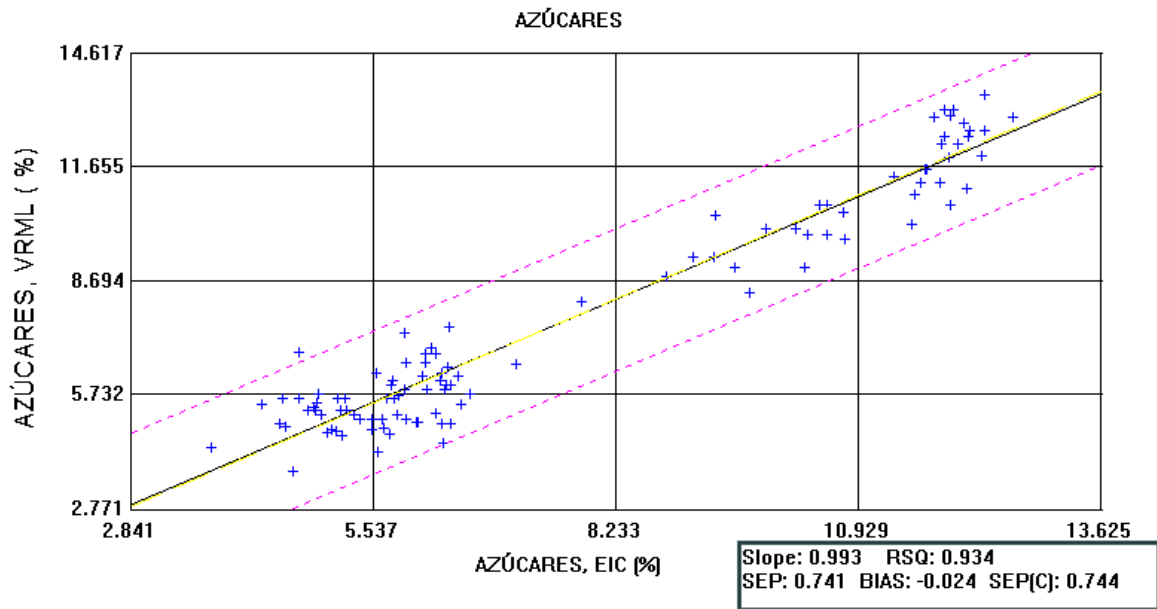


Figura 5. Diagrama de dispersión de los valores de azúcares.

#### 4.5 RESULTADOS DE CALIBRACIÓN

El Cuadro 11 presenta los parámetros estadísticos para el desarrollo de las curvas de calibración que se obtuvieron del programa WINISI y basándose en éstos se analizó el desempeño de la calibración.

Según Wehling (1998) los resultados de calibración son evaluados por el coeficiente de correlación múltiple ( $R^2$ ) y el error estándar, indicando que hay que maximizar  $R^2$  generalmente mayor a  $0.9$  y se debe minimizar el error estándar. El error estándar de calibración (EEC) es  $0.0366$  para proteína, indicando que las variaciones entre los valores de laboratorio y los estimados son pequeñas, considerando el número de términos y

muestras en la calibración. Para obtener los valores de EEP el programa realizó una calibración interna, tomando el mismo set de muestras de calibración para la validación.

Para la curva de grasa la diferencia entre el EEC y el EEP se debe a que se obtuvieron valores desde cero (leche descremada) a 4.04% (leche cruda) de manera la amplitud fue muy grande. Para la curva de lactosa con un EEC de 0.7061 y EEP de 0.741 (valor límite 1.091) se pueden decir que hay poca variación entre los datos de laboratorio y los estimados por la ecuación.

Cuadro 11. Análisis estadístico para el desarrollo de las curvas de calibración

COMPONENTE	N <sup>0</sup>	PARÁMETROS ESTADÍSTICOS, %						
		MEDIA	SD <sup>1</sup>	EEC <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	EECV <sup>3</sup>	EEP	EEPC <sup>4</sup>
PROTEÍNA	94	3.26	0.2268	0.0366	0.9740	0.0558	0.0580	0.0580
GRASA	102	1.68	1.1435	0.1179	0.9894	0.1815	0.3030	0.3050
AZÚCARES	101	7.82	2.9393	0.7061	0.9423	0.8390	0.7410	0.7490
HUMEDAD	94	89.02	2.6653	0.4819	0.9673	0.8921	0.9480	0.9520

<sup>0</sup> = Número de muestras

<sup>1</sup> = Desviación estándar      <sup>2</sup> = Error estándar de calibración

<sup>3</sup> = Error estándar de calibración cruzada

<sup>4</sup> = Error estándar de predicción

#### 4.6 RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN

El Cuadro 12 resume los resultados de la prueba de diferencias de medias apareadas ( $\alpha=0.01$ ) para los componentes de leche. Se observa que con un 99% de confianza se puede decir que no hay diferencia significativa entre el valor real y estimado de proteína, azúcares y humedad. En cambio para grasa si hay diferencia significativa, reflejándose así la correlación entre estos valores.

Cuadro 12. Prueba de diferencia de medias apareadas para proteína, grasa, azúcares y humedad de las leches fluidas.

COMPONENTE	N	Promedio	DE	EE	T	P
PROTEINA	25	-0.0600	0.1179	0.0235	-2.5770	0.0165
GRASA	21	-0.0530	0.0700	0.0150	-3.4830	0.0020
AZÚCARES	25	0.0800	0.2290	0.0450	-1.8229	0.0809
HUMEDAD	25	0.3280	0.7107	0.1421	-2.3103	0.0298



Rodriguez *et al.* (1995) efectuaron la calibración multiproducto de quesos utilizando un  $\alpha=0.05$  y la misma prueba de diferencias apareadas, reportaron que las diferencias entre los valores reales y los estimados no son significativos para grasa y proteína. Los porcentajes de grasa obtenidos estaban dentro del rango de 19 a 31%.

#### 4.7 COSTOS DE LOS ANÁLISIS

La identificación y la cuantificación de los insumos de operación utilizados en los métodos convencionales se pueden ver en el Anexo 2.

Los insumos de operación se clasificaron en reactivos, cristalería, equipo, energía, mano de obra y depreciación como se muestra en el Cuadro 13.

Cuadro 13. Costos de operación utilizando métodos convencionales.

US, \$				
INSUMO DE OPERACIÓN	PROTEÍNA	GRASA	HUMEDAD	AZÚCARES
<i>Reactivos</i>	9.04	1.61	0	0.80
<i>Agua</i>	0.33	0.03	0	0.20
<i>Cristalería</i>	0.69	0.98	0.16	2.99
<i>Equipo</i>	1.38	2.07	0.76	0.79
<i>Mano de Obra</i>	0.44	0.55	0.39	1.25
<i>Energía</i>	0.51	0.01	0.11	0.03
<i>Depreciación</i>	0.75	0.75	0.75	0.75
<b>COSTO TOTAL</b>	<b>13.14</b>	<b>5.96</b>	<b>2.17</b>	<b>6.80</b>

Al determinar el porcentaje de proteína, los reactivos representan el 68.8% de los costos de operación. Al medir la concentración de grasa y humedad el equipo representa el 34.7 y 35% de los costos, respectivamente. En el caso de los azúcares la cristalería representa el 44% de los costos de operación.

Para determinar los costos de operación utilizando EIC se tomó en cuenta la inversión inicial y el costo de las curvas de calibración para forrajes, concentrados y leches fluidas. Considerando que esta inversión tiene que ser depreciada en 10 años y en base a la cantidad de muestras que analiza el laboratorio al año, se distribuyó dicho costo (ver Anexo 2).

El costo de operación para analizar cada componente usando el EIC es de 5.5 US \$ (Cuadro 14).

Si el contenido de Proteína, humedad y azúcares se midiera según los métodos químicos el costo sería de 22 US \$, en cambio si se midieran usando la tecnología EIC sería de 16.5 US \$.

Cuadro 14. Costos de operación según la tecnología EIC (US \$)

<i>INSUMO DE OPERACIÓN</i>	CUALQUIER COMPONENTE
Lámpara	1.0
Depreciación	4.5
Costo Total	<b>5.5</b>

La tecnología EIC tiene otras ventajas adicionales a que el costo operativo sea de 5.5 US \$. El tiempo de análisis es de 2 minutos, no se necesita preparar la muestra en el caso de alimentos fluidos y únicamente se requeriría molienda en productos sólidos. La principal ventaja es que no se daña el ambiente y los costos de los reactivos, cristalería y administración de los mismos es cero. El EIC podría usarse para monitorear el nivel energético de la dieta de las vacas individualmente, a través del contenido de proteína de leche, mejorando su producción al corregir sus deficiencias de energía.

La principal desventaja del EIC es la inversión inicial que es de alrededor de 52,000 US \$ pero es una inversión que se justifica por los beneficios antes mencionados.

## 5. CONCLUSIONES

1. La composición de proteína, humedad, grasa y lactosa para leches fluidas coincidió con los valores teóricos esperados y las variaciones encontradas en proteína y humedad de las leches se deben a la naturaleza de las muestras y no al método ni al error experimental, como podría ser en el caso de la grasa y lactosa.
2. Los lotes son homogéneos en el contenido de proteína y grasa.
3. Las curvas de calibración EIC para proteína, humedad y azúcares pueden estimar los valores reales, con un 99% de confianza en leches fluidas.
4. La curva de calibración para grasa ( $R^2$  0.9874) no es capaz de estimar la concentración real de una muestra de leches fluidas debido a la amplitud de valores (0 a 4 %) de los productos.
5. El costo de analizar grasa, proteína, humedad y azúcares bajo los métodos convencionales es de 5.96, 13.14, 2.17 y 6.8 US \$ respectivamente.
6. El costo de analizar proteína, humedad y azúcares bajo la tecnología EIC es de 5.5 US \$ por componente, en un tiempo < 5 minutos.

## 6. RECOMENDACIONES

1. Probar el método de Mojonnier para grasa en leche, por ser más sensible que Babcock.
2. Medir la concentración de azúcares con el Polarímetro y hacer una nueva curva de calibración.
3. Mejorar el R<sup>2</sup> de las ecuaciones agregando más muestras de cada tipo de leche a la base de datos.
4. Realizar calibraciones EIC para grasa con rangos más estrechos de contenido de grasa (leches procesadas, leche entera).
5. Ensayar el control de calidad de leches fluidas con las curvas de calibración EIC ya validadas en Zamorano.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

AOAC (Association of Official Analytical Chemists. 1990. Official methods of analysis. 15 ed. AOAC, Arlington, VA.

Baltes, W. 1990. Rapid methods for analysis of food And food raw material: Application of NIR to analysis of dairy products.10 ed. Pennsylvania US. TPC. 392 p.

Carrillo, E; Serrano, M; Serradilla, M. 1993. Near infrared calibration for cows milk components. Journal of Near Infrared Spectroscopy. 1(142): 140.

FAO/OMS. 1995. Codex Alimentarius: Métodos de análisis y muestreo. 2 ed. Roma. 146 p.

Fessenden, R; Fessenden, J. 1982. Química Orgánica. 2 ed. México. IA. 1069 p.

FOSS NIRSYSTEMS, 2000. ISI Windows Near-Infrared Software. US. II. 237 p.

Hawke, J; Taylor, M. 1995. Influence of nutritional factors on the yield, composition and physical properties of milk fat. In Fox, F. Advanced Dairy Chemistry 2. London. 300 p.

Osborne, B; Fearn, T; Hindle, P. 1993. Practical NIR spectroscopy with aplication in food and beverage analysis. United Kingdom. Techn. 350 p.

Reeves, J; Kessel, J. 2000. Near infrared spectroscopy determination of carbon, total nitrogen, and ammonium-N in dairy manures. Journal of American Dairy Science Association. 83 (8): 1665-1898.

Reilip, 2001. Milko scan 133-B: Technical specifications (en línea). US.Consultado 1 nov. 2001. Disponible en <http://www.reilip.com/ms133.htm>

Revilla, A. 2000. Tecnología de la leche. 3ra. Ed. rev. Escuela Agrícola Panameicana, Zamorano, Honduras, Centroamérica. 396 p.

Rodriguez, JL; Hermida, M; Cepeda, A. 1995. Determination of fat, protein, and total solids in cheese by near-infrared reflectance spectroscopy. Journal of AOAC International. 78(3): 802-806.

Stewart, K; Whitaker, J. 1983. Modern methods of food analysis. Chicago. IFT. 421 P.

Tsenkova, R; Oyoda, K; Atanassova, S. 1999. Near infrared spectroscopy for dairy management: measurement of unhomogenized milk composition. *Journal of American Dairy Science Association*. 82 (11): 2259-2523.

Wehling, RL. 1998. Basic principles of spectroscopy. *In* Nielsen, S. Food analysis. 2 ed. Indiana US. RB. 630 p.

## ANEXO 1

### FORMULACIÓN DE LECHE CON SABORES

Hay diferentes tipos de combinaciones de ingredientes para la elaboración de la leche con chocolate, ejemplo:

Fórmula en %	A	B	C	D
Leche con 1.6 % de grasa	92.76	93.10	93.11	93.61
Azúcar	6	6	6	6
Cocoa	0.9	0.8	-----	-----
Estabilizador	0.25	0.10	-----	-----
Cocoa con estabilizador	-----	-----	0.80	-----
Sales minerales	0.09	-----	0.09	-----
Extracto aromatizante	-----	-----	-----	0.14

### FLUJO DE PROCESO

