

**Medición de la Composición Química de
Piensos para Camarón Usando
Espectroscopía de Infrarrojo Cercano (NIRS)**

Santiago Xavier Torres Egas

Honduras
Diciembre, 2005

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA

Medición de la Composición Química de Piensos para Camarón Usando Espectroscopía de Infrarrojo Cercano (NIRS)

Proyecto de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero en Agroindustria en el Grado
Académico de Licenciatura

Presentado por:

Santiago Xavier Torres Egas

Honduras
Diciembre, 2005

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.

Santiago Xavier Torres Egas

Honduras
Diciembre, 2005

**Medición de la Composición Química de Piensos para Camarón Usando
Espectroscopía de Infrarrojo Cercano (NIRS)**

Presentado por:

Santiago Xavier Torres Egas

Aprobado:

Francisco J. Bueso, Ph.D.
Asesor Principal

Raúl Espinal, Ph.D.
Director
Carrera de Agroindustria

Adela Acosta, D.C.T.A.
Asesor

George Pilz, Ph.D.
Decano Académico

Kenneth Hoadley, D.B.A.
Rector

DEDICATORIA

A mis padres Hernán e Hilda por toda su ayuda y consejos cuando los necesite. Gracias por apoyarme en todo lo que he decidido y estar conmigo en todo momento.

A mis hermanas Diana, Estefanía y Emilia por el apoyo y cariño que me han dado durante toda mi vida.

A Indira por todo el cariño y los momentos increíbles que hemos pasado juntos.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Hernán e Hilda por enseñarme a luchar por lo que quiero y superar todo lo que me pone en frente.

A mis asesores por su tiempo, confianza y sobre todo paciencia durante la elaboración de este proyecto

A todos mis profesores de Zamorano por enseñarme los fundamentos en los cuales se basará mi carrera profesional.

A mis amigos de Zamorano por todos los momentos increíbles que hemos pasado.

A Iván por sus consejos y ayuda.

AGRADECIMIENTO A PATROCINADORES

A la empresa Granjas Marinas S. A. por proporcionarme algunas de las muestras que se utilizaron en este estudio.

RESUMEN

Torres, Santiago. 2005. Medición de la Composición Química de Piensos para Camarón Usando Espectroscopía de Infrarrojo Cercano (NIRS). Proyecto de Graduación del Programa de Ingeniería Agroindustrial. Zamorano, Honduras. 35 p.

Actualmente se realizan estimaciones de la composición química de piensos para alimentación animal rápidamente con espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano conocida como NIRS por sus siglas en inglés. Este estudio tuvo como objetivo desarrollar y validar curvas de calibración para proteína, grasa, humedad y cenizas en piensos para camarón que se comercializan en el mercado hondureño. En Honduras el cultivo de camarón constituye una de las principales actividades generadoras de divisas, requiriendo de análisis que monitoreen la calidad química de los piensos. El Centro de Evaluación de Alimentos (C.E.A.) de Zamorano realiza este tipo de análisis de manera periódica, mediante los métodos químicos tradicionales. Un total de 171 muestras proporcionadas por las empresas Granjas Marinas y Granel colectadas de enero a septiembre del año 2005 fueron analizadas para proteína cruda (PC), grasa (EE), humedad y cenizas por los métodos de referencia tradicionales (AOAC, 1997) y NIRS para el desarrollo de las curvas de calibración. NIRS predijo con alto grado de exactitud PC, cenizas y EE. Los coeficientes de determinación en la validación cruzada (R^2_{val}) y el error estándar de validación cruzada (SECV) fueron 0.990 (SECV: 0.711%) para PC, 0.935 (SECV: 0.385%) para cenizas, 0.910 (SECV: 0.403%) para EE y 0.662 (SECV: 0.601%) para humedad. Se validaron las calibraciones con 36 muestras adicionales, comparando datos reales con estimados. Mediante una prueba t de diferencia de medias no se encontró diferencia ($P < 0.05$) entre los valores reales y estimados para PC, EE y cenizas. Se encontró diferencias ($P < 0.05$) para la predicción de humedad. Los resultados obtenidos en el estudio demostraron el alto poder de predicción de PC, EE y cenizas en piensos para camarón. La principal ventaja del desarrollo de esta curva es que suprime el uso de reactivos, se aumenta la productividad con más muestras por día y mejora la condición laboral del laboratorista.

Palabras clave Método de cuadrados mínimos parciales modificados, reflectancia difusa, región de bandas combinadas, sobretonos, teoría vibracional, tratamientos matemáticos.

Francisco J. Bueso, Ph. D.
Asesor Principal

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Autoría.....	ii
Página de firmas.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Agradecimiento a patrocinadores.....	vi
Resumen.....	vii
Contenido.....	viii
Índice de cuadros.....	x
Índice de figuras.....	xi
Índice de anexos.....	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	1
1.2 ANTECEDENTES.....	2
1.3 JUSTIFICACIÓN.....	3
1.4 ALCANCES Y LÍMITES DEL ESTUDIO.....	4
1.5 OBJETIVOS.....	5
1.5.1 Objetivo general.....	5
1.5.2 Objetivos específicos.....	5
2. REVISIÓN DE LITERATURA	6
2.1 GENERALIDADES.....	6
2.1.1 Alimentos artificiales para camarón.....	6
2.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CERCANO (NIRS).....	6
2.2.1 Espectroscopia de vibración.....	6
2.2.2 Origen e intensidad de la absorción en la banda del NIR.....	6
2.2.3 Reflectancia difusa.....	7
2.2.4 Cuantificación del análisis NIRS.....	8
2.2.5 Factores que afectan la reflectancia de las muestras.....	8
2.2.6 Calibración.....	9
2.2.7 Validación.....	9
2.2.8 Tratamiento de datos.....	9
2.2.9 Uso de NIRS en el análisis de alimentos animales.....	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.1 UBICACIÓN DEL ESTUDIO.....	12
3.2 MATERIALES.....	12
3.2.1 Materiales análisis NIRS.....	12

3.2.2	Materiales análisis de referencia.....	12
3.2.3	Materia prima.....	13
3.3	METODOLOGÍA	13
3.3.1	Muestreo.....	13
3.3.2	Preparación previa de la muestra.....	13
3.3.3	Análisis de referencia.....	13
3.3.4	Recolección de espectros NIRS.....	14
3.3.5	Calibración de las curvas.....	14
3.3.6	Validación.....	15
3.3.7	Estadística descriptiva de calibración y validación.....	15
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
4.1	ANÁLISIS QUÍMICOS POR MÉTODOS DE REFERENCIA	16
4.2	RESULTADOS DE CALIBRACIÓN	16
4.2.1	Métodos de regresión y tratamientos matemáticos evaluados.....	17
4.2.2	Resultados calibración y validación cruzada tratamiento matemático.....	19
4.2.3	Validación externa.....	23
5.	CONCLUSIONES	25
6.	RECOMENDACIONES	26
7.	BIBLIOGRAFÍA	27
8.	ANEXOS	29

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		
1.	Tipo de molécula y longitud de onda (nm) a la que ocurre absorción en el espectro de infrarrojo cercano.....	2
2.	Valores máximos y mínimos en calibración NIRS en alimentos compuestos para bovinos.....	11
3.	Valores máximos y mínimos en calibración NIRS en alimentos compuestos para porcinos.....	11
4.	Estadística descriptiva de la composición química de muestras de piensos para camarón utilizadas para la calibración NIRS (base húmeda, %).	16
5.	Tratamiento matemáticos evaluados con el método de regresión de cuadrados mínimos parciales.....	18
6.	Tratamiento matemáticos evaluados con el método de regresión de cuadrados mínimos parciales modificados.....	18
7.	Calibración y validación cruzada NIRS para distintas entidades químicas en piensos para camarón.....	19
8.	Estadígrafos de predicción NIRS para piensos para camarón.....	23
9.	Estadística descriptiva de la composición química de muestras de piensos para camarón utilizadas para validación externa (base húmeda, %).	23
10.	Prueba t apareadas para contenido de proteína, grasa, humedad y cenizas medidos con los métodos de referencia y predichos por NIRS en piensos para camarón.....	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura

1.	Interacciones del haz de luz y la muestra.....	7
2.	Espectros NIRS del total de muestras utilizadas para la calibración con la desviación estándar del espectro promedio.....	17
3.	Relación entre la predicción NIRS y los valores reales para humedad (%)...	20
4.	Relación entre la predicción NIRS y los valores reales para proteína (%).....	21
5.	Relación entre la predicción NIRS y los valores reales para grasa (%).....	21
6.	Relación entre la predicción NIRS y los valores reales para cenizas (%).....	22

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo

1.	Composición química por métodos de referencia de muestras utilizada para calibración.....	30
2.	Composición química por métodos de referencia de muestras utilizada para validación externa.....	34
3.	Tratamientos matemáticos evaluados con MPLS y PLS.....	35

1. INTRODUCCIÓN

La calidad del alimento es uno de los factores cruciales para alcanzar rendimientos adecuados en una explotación acuícola dedicada al cultivo de camarón. Un factor importante es la cantidad de proteína, ajustada en la formulación del pienso según los requerimientos de cada etapa de desarrollo del crustáceo.

En este estudio se desarrollaron y validaron modelos o curvas de regresión que servirán para relacionar picos de absorción de energía electromagnética en el rango del infrarrojo cercano con la composición química de los piensos que se usan para la alimentación de los camarones en todas las etapas de su cultivo.

Para determinar la calidad nutricional de un alimento se suele realizar un análisis proximal que es preciso y exacto, pero lento y poco compatible con una línea de producción en la industria. Es por eso que la espectroscopía de infrarrojo cercano se convierte en una alternativa a esta serie de problemas ya que solamente toma unos minutos, los resultados obtenidos son precisos y exactos, se evita la contaminación del ambiente y la destrucción de la muestra.

La tecnología NIRS empieza a vislumbrarse como una técnica viable a partir de la década de los 70's, posteriormente en las décadas de los 80's y 90's gracias a las mejoras en instrumentación, software y particularmente a la expansión en el uso de equipos monocromadores aparecen un número elevado de publicaciones que muestran la precisión del NIRS para la predicción de parámetros como los reflejados a continuación. (Garrido *et al.*, 1996).

Químicos

Materia seca
Proteína bruta
Fibra (FB, FND, FAD, LAD)
Extracto etéreo
Cenizas
Minerales

Biológicos

Digestibilidad *in vitro*, T&T
Digestibilidad enzimática
Digestibilidad *in vivo*
Nutrientes Digestibles Totales
Ingestión de materia seca
Energía (EB, EI, EM, EN)

1.1 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

La constante demanda de análisis químicos de piensos para camarón solicitados al Centro de Evaluación de Alimentos (CEA) por la industria local que exporta este crustáceo, estimula el desarrollo de la tecnología NIRS en este campo, debido a que brinda una alternativa más rápida e igual de precisa y exacta que los métodos convencionales.

Los análisis tradicionales son caros, laboriosos, requieren del uso de reactivos costosos, contaminantes y en algunos casos peligrosos, esto sin incluir la necesidad de personal altamente calificado para llevarlos a cabo, sumado al prolongado tiempo que se tiene que invertir para obtener los resultados (aproximadamente 5 días).

1.2 ANTECEDENTES

Durante la pasada década, emerge un nuevo concepto de análisis basado en la absorción en el rango del infrarrojo cercano (NIRS). Actualmente existen miles de publicaciones científicas, cuatro libros específicos y los libros de procedimiento de ocho Conferencias Internacionales NIRS que confirman el potencial de la técnica NIRS para la caracterización química de alimentos y otros productos de una forma instantánea en sus aspectos cuantitativos y cualitativos (Garrido *et al.*, 1996).

Según Andueza *et al.* (1995) las ecuaciones de predicción que se obtienen del NIRS para parámetros químicos de rutina en análisis de productos agrícolas difieren de los análisis de referencia debido a que estas son ecuaciones globales que se diseñan para que cubran todas las fuentes de variación y no miden lo mismo que miden los análisis de referencia.

Los análisis de referencia tratan de determinar la presencia de un determinado grupo de compuestos o compuesto de manera empírica y NIRS lo hace mediante vibraciones de los enlaces que difieren de acuerdo los compuestos. El Cuadro 1 explica este principio.

Cuadro 1. Tipo de molécula y longitud de onda (nm) a la que ocurre absorción en el espectro de infrarrojo cercano.

Constituyente	Absorción	Longitud de onda (nm)
Agua	OH estiramiento	1,400-1,450
	OH estiramiento / deformación combinada	1,920-1,950
Proteínas	NH deformación	1,560-1,670
		2,080-2,220
Lípidos	CH ₂ y CH ₃ estiramiento	1,680-1,760
	Metileno –CH estiramiento	2,300-2,350
Carbohidratos	C-O, O-H combinación de estiramiento	2,060-2,150

Fuente: López, 2001

Las ecuaciones de predicción del NIRS pueden agruparse en tres categorías, de acuerdo su nivel de error:

- La primera donde se muestra una alta correlación de los valores espectrales con los del análisis de referencia. En esta categoría se encuentran las curvas de regresión

para medición de humedad y proteína bruta en la mayor parte de granos, grasa en concentrados proteicos y grasa en varios subproductos de origen animal.

- En la segunda categoría se encuentran los productos que muestran errores de predicción algo superiores. Aquí se encuentra la proteína bruta y humedad en forrajes y piensos, fibra y minerales en productos forrajeros. Pudiendo alcanzar valores entre 0.5% y 0.8%; e incluso superiores en la predicción de proteína bruta de forrajes y piensos.
- Por último se encuentran los productos en donde la correlación entre la medida espectral y la del método de referencia es baja. Aquí se encuentra la proteína bruta de harinas de pescado donde se alcanzan errores de 1.5%.

Como señala Obaldo *et al.* (2001) en su estudio para determinar la composición química de ingredientes utilizados en la elaboración de alimento para camarón los resultados de calibración deben ser evaluados usando el error de predicción que mide la exactitud de NIRS y el coeficiente de determinación (R^2) que describe el grado de ajuste que presentan los datos con respecto al modelo de regresión. Luego se deben comparar con la desviación estándar obtenida de los métodos químicos de referencia.

Posterior a esto se valida los resultados de calibración usando juegos independientes de muestras. Esto conlleva a decir que el NIR es un instrumento rápido y exacto para predecir composición química de ingredientes que se usan para la elaboración de alimento para camarón.

El potencial para el empleo de espectroscopía NIRS como un instrumento para la predicción rápida y exacta de la composición química de ingredientes de alimento para camarón merece una remota investigación (Obaldo *et al.* 2001).

En el Centro de Evaluación de Alimentos se han establecido curvas de calibración y validación para queso cabaña, jamón virginia y leche fluida, pudiendo predecir la composición química de humedad, proteína y grasa con coeficientes de determinación mayores al 0.98. Sin encontrar diferencia significativa entre los resultados NIRS y los métodos de referencia utilizados AOAC (1997).

1.3 JUSTIFICACIÓN

La importancia en que radica la aplicación de tecnología NIRS en el análisis de alimentos está constituida por tres aspectos importantes que son: El ahorro de recursos económicos a largo plazo, la nula contaminación que este produce al no usar reactivos químicos y la rapidez con que se puede brindar resultados.

Garrido *et al.* (1996) concluye que además del largo tiempo requerido para el análisis de parámetros químicos por vía húmeda una limitante que explica en la práctica el bajo volumen de materias primas controladas en la industria y el casi nulo realizado a nivel de explotaciones individuales lo constituye sin duda alguna el alto costo por muestra debido al uso de reactivos y horas hombre en la aplicación de los mismos. Cuando se realizan comparaciones de NIRS con la vía química, el costo del análisis NIRS es bajo, ya que no requiere reactivos químicos, cristalería, balanzas, campanas de humos, etc. Cuando se tiene este hecho en cuenta, el NIRS debe ser visto no como un costo sino como una inversión.

Por otro lado se debe destacar que la tecnología NIRS contribuye con la conservación del medio ambiente debido a que no produce ninguna clase de residuo. Así un laboratorio que realizara 5060 análisis Kjeldahl al año durante 5 años, produciría 2,76 TM de H₂SO₄, 0,75 TM de K₂SO₄, 2,19 TM de NaOH, 75 Kwh y 900 TM de H₂O de refrigeración (Andueza *et al.*, 1995).

El cultivo de camarón en cautiverio en Honduras constituye una industria grande que en el periodo comprendido entre 1990–2003 aportó PIB un total de 1,741.2 millones de dólares, de los cuales 85% corresponden a camarón cultivado. Los principales destino de la exportación son Estados Unidos y Europa (Portillo y Espinosa, 2003)

Esta industria requiere el servicio de análisis químicos de los alimentos por parte del Centro de Evaluación de Alimentos, por esto se desarrolló una curva para predecir la composición química de piensos para camarón usando espectroscopía de infrarrojo cercano ya que se evitará contaminación, se ahorra recursos y se reducirá el tiempo en la entrega de resultados para la industria, en un análisis de rutina que se realiza en Centro de Evaluación de Alimentos de Zamorano.

Una de las empresas más grandes en este rubro en el mercado hondureño es Granjas Marinas, esta ha sido un cliente importante para el C.E.A., aportando aproximadamente un 10% sus ingresos. Esta constituye uno de sus clientes potenciales al que se le puede ofrecer análisis más especializados mucho más rentables para el laboratorio.

La implementación del análisis utilizando la tecnología NIRS en piensos para camarón libera al personal de laboratorio de realizar análisis proximales poco rentables, peligrosos y tediosos; pudiéndose enfocar en análisis que generen más ingresos como la elaboración de etiquetas nutrimentales.

1.4 ALCANCES Y LÍMITES DEL ESTUDIO

Los límites del estudio están dados por la composición química de las 171 muestras de piensos para camarón utilizados para el desarrollo de la calibración del instrumento, para estimar el contenido de proteína, grasa, humedad y cenizas.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo general

- Establecer y validar curvas de calibración para humedad, grasa, proteína y cenizas en piensos para alimentación de camarones en todos sus ciclos de cultivo, mediante espectroscopía de infrarrojo cercano.

1.5.2 Objetivos específicos

- Determinar la composición química de los piensos para camarón usados en todos los ciclos de su cultivo mediante métodos de referencia.
- Determinar la composición química de los piensos para camarón usados en todos los ciclos de su cultivo mediante NIRS.
- Validar las curvas de calibración NIRS.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 GENERALIDADES

2.1.1 Alimentos artificiales para camarón

El uso de alimentos artificiales con peces y camarones está basado en un conocimiento de sus hábitos alimenticios y de sus requerimientos nutrimentales. El propósito es proveer los nutrientes necesarios en la forma de un pienso comprimido que flota o no en el agua, para su desarrollo en una forma física aceptable. Además, el alimento debe tener un costo razonable. Los alimentos acuícolas peletizados a la venta en Centro América contiene entre 18 y 42% de proteína cruda y tienen precios entre USD. 0.34 a 0.60 por kilogramo (Meyer *et al.*, 2004).

2.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CERCANO (NIRS)

2.2.1 Espectroscopia de vibración

Según Osborne (1998) el infrarrojo cercano (NIR, por sus siglas en inglés) forma parte de espectro electromagnético en el rango de longitudes de onda comprendido entre 750 nm y 2,500 nm. Para ser capaz de interpretar los espectros generados por el NIR hay que familiarizarse con la espectroscopia vibracional, que depende de la existencia de sobretonos vibracionales y bandas de combinación.

A temperatura ambiente la mayoría de moléculas están en sus niveles de energía vibracional fundamentales. Los átomos o grupos de átomos que participan en los enlaces químicos son desplazados dependiendo de la fuerza del enlace y la masa individual de los átomos ligados o sus grupos. La amplitud de estas vibraciones es de unos pocos nanómetros y puede ser incrementada si se transfiere energía a la molécula (Pasquini, 2003)

2.2.2 Origen e intensidad de la absorción en la banda del NIR

La radiación a una frecuencia dada capaz de suplementar exactamente la energía entre dos niveles vibracionales o sus sobretonos, o la combinación de dos o más niveles

vibracionales puede ser absorbida por la molécula y producir excitación, ésta genera niveles altos de energía de vibración (Osborne, 1998).

Según Pasquini (2003) el emparejamiento de la energía de radiación con la energía resultado de la diferencia entre los dos niveles vibracionales entre átomos de una molécula causa una respuesta selectiva por parte de las moléculas a la radiación de incidencia. Esto significa que en un rango de longitud de onda determinado algunas frecuencias pueden ser absorbidas, otras (que no alcanzan ninguna de las diferencias de energía posibles para los átomos de la molécula) no serán absorbidas y otras se absorberán parcialmente. Esta combinación compleja de intensidades de absorción y longitudes de onda constituye el espectro de una muestra.

El emparejamiento entre los fotones y los niveles vibracionales no es suficiente para la absorción de radiación, para lograr una vibración activa es necesario que la oscilación del campo electromagnético de la onda pueda interactuar con la molécula, esto solo se puede lograr si se produce un cambio en el momento dipolo de la molécula o del grupo local de los átomos que se encuentran vibrando; esta característica causa que algunas de las vibraciones que no se pueden observar en el infrarrojo mediano pueden mostrarse en el espectro del NIR (Pasquini, 2003). Los instrumentos comerciales utilizan la técnica de reflectancia difusa para captar estas (Shenk y Westerhaus, 1993).

2.2.3 Reflectancia difusa

Según Newgard (2000) cuando el haz de luz golpea la muestra, algunas interacciones pueden ocurrir (Figura 1). En espectroscopia de infrarrojo cercano de materiales agrícolas la reflectancia difusa ha llegado a ser el método más popular. Los productos agrícolas selectivamente absorben la radiación del NIR, esta produce información acerca de los enlaces que se encuentran en el material que se está analizando. Si el material no absorbe nada de la energía incidente se produce una total reflexión.

- (a) Reflexión especular
- (b) Reflectancia difusa
- (c) Absorción
- (d) Transmisión
- (e) Refracción
- (f) Dispersión

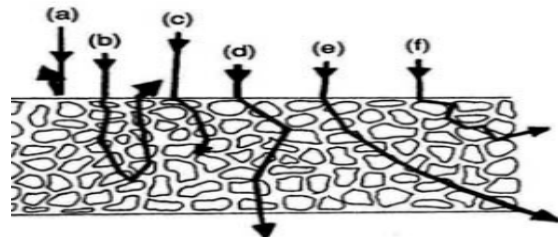


Figura 1. Interacciones del haz de luz y la muestra (Newgard, 2000).

La intensidad total reflejada es la suma de la reflexión regular y de cuerpo. Solamente la reflexión de cuerpo contiene información acerca de la composición del material. La absorbancia medida se calcula con la siguiente ecuación (Newgard, 2000).

$$Absorbancia_Medida = -\log\left(\frac{I_{cuerpo} + I_{regular}}{I_{incidencia}}\right) \quad [1]$$

2.2.4 Cuantificación del análisis NIRS

La relación entre la absorbancia y la concentración de un constituyente se denomina “Ley de Beer”, esta puede ser resumida por el estamento que asume la relación lineal que se da entre la concentración de un enlace molecular y la absorbancia ($\log 1/\text{Transmisión}$). Esta relación solo es válida para materiales que no presentan dispersión y con un solo constituyente (Pasquini, 2003).

Según Newgard (2000) actualmente no existe una teoría definitiva para la reflectancia difusa, pero la aproximación más común esta dada por la siguiente ecuación.

$$C = -K \log(R/R_0) \quad [2]$$

Donde: R es la intensidad reflectada de la muestra, R_0 es la intensidad reflectada por el material estándar, K es una constante, C es la concentración del constituyente.

Se ha demostrado experimentalmente que esta relación es cercanamente lineal para concentraciones de muestras similares, en particular muestras del mismo tamaño de partícula.

2.2.5 Factores que afectan la reflectancia de las muestras

Según Stewart y Whitaker (1983; citado por Reyes, 2002) los factores que se encuentran afectando la reflectancia de las muestras son:

- La concentración y los coeficientes de absorción de cada constituyente.
- Tamaño y forma de la partícula.
- Homogeneidad de la muestra.
- Temperatura de la muestra.

A medida que se aumenta la concentración de un constituyente se incrementa la absorbancia y disminuye la reflectancia (Osborne, 1998). Según Reyes (2002) la temperatura puede afectar algunas de las bandas de absorción debido a que estas son sensibles a los cambios de temperatura este es el caso de la banda de absorción del agua.

Según Newgard (2000) el tamaño de partícula afecta la absorbancia, porque a medida que las partículas son más pequeñas existen más interfaces de dispersión y los fotones pueden ser dispersados de regreso sin ser absorbidos.

2.2.6 Calibración

La calibración del instrumento NIRS consiste en la relación de los valores de referencia obtenidos por los métodos tradicionales de laboratorio y los espectros usados para el desarrollo del modelo, estos representan cada muestra dentro de la región del infrarrojo cercano (Shenk y Westerhause, 1993).

Esta calibración puede verse afectada por errores en la ejecución y selección de los métodos de referencia, también por factores intrínsecos de la muestras como gran diversidad de espectros, complejidad de los modelos espectrales y el número de muestras seleccionadas para la calibración.¹

2.2.7 Validación

Según Pasquini (2003) la validación del modelo puede ser realizada mediante un procedimiento de validación cruzada o utilizando muestras ajenas a la calibración.

El procedimiento de validación cruzada consiste en remover una muestra o un segmento correlacionado de muestras de las usadas en la calibración y construir el modelo sin éstas. La muestra o el segmento de muestras dejados fuera del modelo se predicen por el nuevo modelo y un error de calibración es calculado. Este procedimiento se repite para cada muestra o conjunto de muestras excluidas (Pasquini, 2003).

La validación externa se hace con un conjunto de muestras que no fueron tocadas por la calibración, se compara los valores de la predicción NIRS y los métodos de referencia. Se evalúa si existen diferencias significativas entre ambos mediante una prueba t (FOSS NIRSystem, 2000).

2.2.8 Tratamiento de datos

Se usa un pre-tratamiento matemático de los datos con el fin de superar dificultades que se podrían presentar al realizar el análisis de regresión. Según Osborne (1998) para corregir el efecto del tamaño de partícula se usa derivadas. La derivada de un espectro es la pendiente de un segmento a cierta longitud de onda, donde el segmento a ser evaluado es suavizado.

Existen otros métodos para superar también el efecto del tamaño de partícula como la corrección multiplicativa de la dispersión o la varianza normal estándar y quitado de tendencia (Osborne, 1998).

¹ Cozzolino, D. 2005. The Australian Wine Research Institute, Australia, (correo electrónico).

Después del pre-tratamiento de los datos se procede a calcular las ecuaciones globales, las cuales relacionan una variable independiente (reflectancia a una determinada longitud de onda) con todos o parte de los datos que se obtuvieron de los espectros de cada muestra.

Según Reyes (2002) la forma más utilizada en el análisis NIRS es mediante una regresión múltiple lineal, en la cual el programa del instrumento selecciona las variables, una a la vez, que proporcionan el menor error entre los valores calculados y determina la concentración del compuesto analizado. Mediante la siguiente ecuación.

$$A\% = k_0 + k_1 [\log 1/R]_{\lambda 1} + k_2 [\log 1/R]_{\lambda 2} + \dots + k_n [\log 1/R]_{\lambda n} \quad [3]$$

Donde A representa la concentración del compuesto analizado; k_0 , k_1 , k_2 , k_n son constantes; $[\log 1/R]$ son los valores $1/R$ de $\lambda 1$, $\lambda 2$, λn .

Según Stewart y Whitaker (1983; citado por Reyes, 2002) La precisión del modelo es medida como el error estándar de calibración (por sus siglas en inglés SEC) y el error estándar de predicción (por sus siglas en inglés SEP). Al momento de evaluar distintos modelos calculados con los mismos datos se usa el error estándar de calibración. Se escoge el modelo que tiene el SEC más bajo para todas las entidades químicas que se tratan de predecir con el modelo.

2.2.9 Uso de NIRS en el análisis de alimentos animales

Según Ginger Reverdin *et al.* (1995) para la predicción de parámetros químicos clásicos como carbohidratos, grasas y humedad la técnica NIRS ha sido suficientemente evaluada de manera científica y técnica, aún en productos que en el pasado han sido catalogados como difíciles de analizar. Este es el caso de los piensos de ganado bovino y porcino por tratarse de productos que tienen varios componentes.

Esto constituye un antecedente para inferir que NIRS puede ser utilizado para predecir la composición química de piensos para alimentación de camarones, debido a que su formulación no es muy compleja y las materias primas en la mayoría de los casos son las mismas, únicamente cambiando las proporciones.

Los Cuadros 2 y 3 presentan los coeficientes de determinación máximos y mínimos permisibles cuando se trabaja con tecnología NIRS y el máximo error estándar de calibración para cada componente analizado. Estos datos se citan debido a que nos brindan una guía para determinar la composición química de los piensos para camarón, son valores máximos y mínimos citados por la literatura.

La literatura existente es bastante escasa y difícil de conseguir, ya que los datos no se publican porque generalmente son producto del patrocinio de la industria privada para desarrollar sus propias curvas NIR.

Cuadro 2. Valores máximos y mínimos en calibración NIRS en alimentos compuestos para bovinos.

Método de referencia	Media %	R²	SEC%	CV%
Humedad	11	0.80-0.94	0.22-0.49	2.00-4.50
Proteína	19	0.84-0.99	0.50-1.10	2.60-5.80
Grasa	4	0.87-0.94	0.26-0.47	6.50-11.80
Fibra bruta	11	0.86-0.97	0.64-0.97	5.80-8.80
Cenizas	9.4	0.49-0.92	0.40-1.30	4.20-13.80

Fuente: Garrido *et al.* (1996)

Cuadro 3. Valores máximos y mínimos en calibración NIRS en alimentos compuestos para porcinos.

Método de referencia	Media %	R²	SEC%	CV%
Humedad	11	0.75-0.95	0.17-0.48	1.50-4.40
Proteína	18	0.83-0.93	0.49-0.62	2.80-3.40
Grasa	6	0.95-0.98	0.22-0.44	3.60-7.30
Fibra bruta	5.8	0.82-0.96	0.30-0.70	5.20-12.10
Cenizas	6.4	0.46-0.92	0.40-0.80	6.20-12.50

Fuente: Garrido *et al.* (1996)

En ambos tipos de piensos (bovino y porcino) y para cada parámetro analítico, se observa que es posible obtener coeficientes de determinación superiores a 0.9. Esto indica que las ecuaciones NIRS permiten explicar más del 90% de las variaciones en constituyentes analíticos de los piensos compuestos. El coeficiente de determinación es un estadígrafo cuyo máximo puede estimarse a priori, ya que viene determinado por la relación:

$$R^2 \text{ max} = 1 - (\text{SEC}/\text{SD})^2 \quad [4]$$

Siendo SEC= error estándar de calibración y SD= desviación estándar típica de la población de calibración, para el constituyente considerado (Garrido *et al.*, 1996).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 UBICACIÓN DEL ESTUDIO

El estudio se llevó a cabo en el Centro de Evaluación de Alimentos (CEA), Zamorano, Valle del Yeguaré, departamento de Francisco Morazán, Honduras.

3.2 MATERIALES

3.2.1 Materiales análisis NIRS

- Instrumento FOSSNIR, SY -3650-II. Modelo 5000. NIRSystems, Silver Spring, Maryland, USA. Analizador versátil de alimentos y bebidas compuesto por:
 1. Sistema monocromador (1,100 – 2,500 nm). Módulo detector de reflectancia.
 2. Módulo de transporte de muestras.
 3. Software de calibración WINISI II. Versión 1.50. Infracsoft International Maryland, USA.
 4. Paquete de celda de chequeo.
 5. Celdas de transporte.
- Computadora.
- Hígro termómetro Extech.
- Software estadístico SAS®. Versión 8.0

3.2.2 Materiales análisis de referencia

- Balanza Metler AE 200.
- Molino con criba de 1mm de diámetro Cyclotec 1093.
- Homogenizador de granos.
- Destilador para extracto etéreo Labconco.
- Digestor para proteína Labconco.
- Destilador para proteína Labconco.
- Mufla Sybron/Termolyne.
- Horno de convección Fisher Scientific.
- Bolsas plásticas Ziploc Freeze Guard®.
- Desecador Boekel.
- Reactivos químicos y cristalería para análisis proximales.

3.2.3 Materia prima

Se utilizaron 207 muestras de piensos para todas las etapas de cultivo de camarón, elaborados por las empresas Granel y ALCON en plantas ubicadas en el departamento de Cortés, Honduras (Anexo 1 y 2).

3.3 METODOLOGÍA

3.3.1 Muestreo

El muestreo fue realizado por las empresas que proporcionaron los piensos utilizando la metodología propia de la empresa. Esta consiste en un muestreo de lotes y corridas de acuerdo a la producción mensual que procesan. El tiempo total del muestreo fue de 9 meses, donde se colectaron 171 muestras de un kilogramo cada una. Estas se utilizaron para el desarrollo de la calibración y 36 muestras adicionales de un kilogramo cada una que se utilizaron para la validación externa del modelo.

3.3.2 Preparación previa de la muestra

Inmediatamente después de recibidas las muestras se homogeneizaron en el homogenizador de granos y fueron molidas en un molino tipo ciclón con una criba de orificios de 1 mm de diámetro (Cyclotec 1093 Sample Mill), utilizando el método oficial de la AOAC 950.02. Se almacenaron en bolsas plásticas (Ziploc Freeze Guard®) a 25°C hasta ser utilizadas en los análisis de referencia y la recolección de espectros NIRS.

3.3.3 Análisis de referencia

Todas las muestras se analizaron mediante los procedimientos oficiales de la AOAC (1997) y los resultados se expresaron como porcentaje en base húmeda. Los métodos químicos de referencia que se usaron fueron:

- Humedad: Deshidratación horno convección 105°C por 18 horas AOAC 950.02.
- Cenizas: Incineración a 550°C por 6 horas AOAC 942.05.
- Proteína Cruda: Kjeldahl (N*6.25) AOAC 954.01.
- Grasa: Extracción con éter AOAC 920.39.

3.3.4 Recolección de espectros NIRS

Los espectros se colectaron en el monocromador FOSSNIR, SY -3650-II Modelo 5000 (NIRSystems, Silver Spring, Maryland, USA), utilizando un celda rectangular de 5 por 7 cm y con una ventana de cuarzo 2 mm de espesor a 25°C. Inmediatamente después de analizadas las muestras en el rango de 1,100 – 2,500 nm se procedió a realizar los análisis de humedad y cenizas, para eliminar las variaciones que podrían presentarse. Se monitoreó la temperatura constantemente mediante un Higro termómetro Extech, regulando el aire acondicionado para mantenerla constante.

Los datos de reflectancia se guardaron como el logaritmo (1/R) a 2 nm de intervalo (700 datos por muestra). La luz difusa reflejada (R) por la muestra fue registrada en detectores de sulfuro de plomo, amplificada, digitalizada, transformada en log 1/R y enviada a una computadora para su almacenamiento.

3.3.5 Calibración de las curvas

Para la calibración se utilizaron 171 muestras de piensos para camarón (Anexo 1). El conjunto de valores de absorbancia a diferentes longitudes de onda para una muestra constituyen su espectro. Se desarrollaron las ecuaciones de calibración y predicción usando el método estadístico de cuadrados mínimos parciales modificados (por sus siglas en inglés MPLS). Las ecuaciones generadas se describen a continuación.

$$Y = b_0 + b_1x_1 + \dots + b_nx_n \quad [6]$$

Donde: Y represente el parámetro químico o característica; b_0 es el intercepto; b_1 a b_n los coeficientes de regresión; x_1 a x_n absorbancias a diferentes longitudes de onda.

Se evaluó también el método estadístico de cuadrados mínimos parciales (por sus siglas en inglés PLS), pero no se tuvo mejoras significativas en los coeficientes de determinación al utilizar este método

Se aplicó corrección a los espectros mediante el procedimiento de varianza normal estándar y quitado de tendencia (por su siglas en inglés SNV and detrend). El tratamiento matemático final aplicado a los espectros fue (2,8,8,1); donde el primer número indica el orden de la derivación, el segundo número es la distancia entre los segmentos a derivar, el tercer número es la longitud del segmento a ser suavizado y el cuarto número es la segunda suavización. Un valor de 1 indica que no se realizó esta. También se evaluaron otros tratamientos matemáticos los cuales no mostraron mejoras en los coeficientes de determinación de calibración (Anexo 3).

Para la selección final tanto del tratamiento matemático como del método de regresión se evaluó todos los tratamientos citados por la literatura en ambos métodos de regresión (MPLS y PLS). El criterio de selección que se utilizó para determinar el mejor modelo fue el coeficiente de determinación y el error estándar de calibración, se seleccionó el

modelo con el coeficiente de determinación más alto y el error estándar de calibración más bajo en todas las entidades químicas.

3.3.6 Validación

Se realizó la validación cruzada para evitar el sobre ajuste del modelo. El programa WINISI II. v1.50 (Infrasoft International Maryland, USA) tomó aleatoriamente una muestra cada 4 muestras y desarrolló el modelo sin éstas. Posterior al desarrollo del nuevo modelo con las muestras no excluidas, las muestras excluidas y tomadas al azar fueron predichas con la nueva calibración.

Para la validación externa en este estudio se utilizaron 36 muestras (Anexo 2) de piensos para camarón independientes de las usadas en la calibración proporcionadas por la empresa Granjas Marinas. Los resultados de los análisis químicos por los métodos de referencia de estas muestras fueron comparados con las estimaciones obtenidas por las curvas NIRS mediante una prueba t de diferencia de medias apareadas con un nivel de significancia $\alpha=0.05$ utilizando el programa SAS® Versión 8.0.

3.3.7 Estadística descriptiva de calibración y validación

Las estadísticas de calibración calculadas para cada modelo fueron, error estándar de calibración (por sus siglas en inglés SEC), el coeficiente de determinación en la calibración (R^2_{cal}), el error estándar de la validación cruzada (por sus siglas en inglés SECV) y el coeficiente de determinación en la validación cruzada (R^2_{val}).

Tanto los coeficientes de determinación como los errores estándar de calibración sirven para escoger el mejor modelo de predicción. Los coeficientes de determinación deben ser superiores a 0.9 si se quiere utilizar la curva como herramienta en química analítica. En el caso del error estándar de predicción se busca errores bajos, a medida que disminuye el error estándar de calibración se incrementa el coeficiente de determinación.

El cálculo del SEC o SECV el programa lo calcula mediante la siguiente ecuación.

$$SEC / V = \left[\frac{(Quim - NIRS)^2}{(n - t - 1)} \right]^{1/2} \quad [7]$$

Donde: Quim es el valor del método de referencia; NIRS: es la predicción NIRS; n: número de muestras de la calibración, t: número de términos del modelo de calibración (Shenk y Westerhaus, 1993).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ANÁLISIS QUÍMICOS POR MÉTODOS DE REFERENCIA

En el Cuadro 4 se muestran los resultados de los análisis proximales para proteína, grasa, humedad y cenizas utilizados para desarrollar las curvas de calibración NIRS de piensos para camarón. Los constituyentes presentaron una alta variabilidad evidenciada por su desviación estándar. Los rangos de las entidades químicas fueron amplios. Estos rangos constituyeron los límites en los cuales el instrumento pudo predecir con exactitud. Hay que recalcar que las muestras comprendieron un amplio rango de lotes y formulaciones.

Cuadro 4. Estadística descriptiva de la composición química de muestras de piensos para camarón utilizadas para la calibración NIRS (base húmeda, %).

	Media	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Mínimo	Máximo
Proteína	20.8	7.6	36.5	14.6	49.2
Grasa	4.8	1.4	29.2	2.9	9.1
Humedad	5.3	1.1	20.8	2.1	8.3
Cenizas	9.0	1.8	20.0	2.3	15.5

NIRS: Espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano.

*El número total de muestras analizadas para cada componente fue de 171.

4.2 RESULTADOS DE CALIBRACIÓN

En la Figura 2 se muestran los espectros obtenidos para la calibración de los piensos para camarón, usando todas las muestras y la desviación estándar del espectro promedio (en línea entrecortada). Se puede observar que la desviación estándar fue bastante pronunciada en los picos de absorbancia más relevantes. Se observaron absorbancias a 1,200, 1,450 y 1,930 nm que corresponden a la absorción de los grupos OH, asociados con el contenido de humedad de la muestra. La zona entre los 1,730 y 1,750 nm corresponde a la absorción de los enlaces CH asociados con lípidos y ácidos grasos. Absorciones entre 2,100 y 2,400 nm corresponden a la absorción de enlaces CH y combinaciones (enlaces proteicos) (Murray, 1993; citado por Cozzolino, 2002).

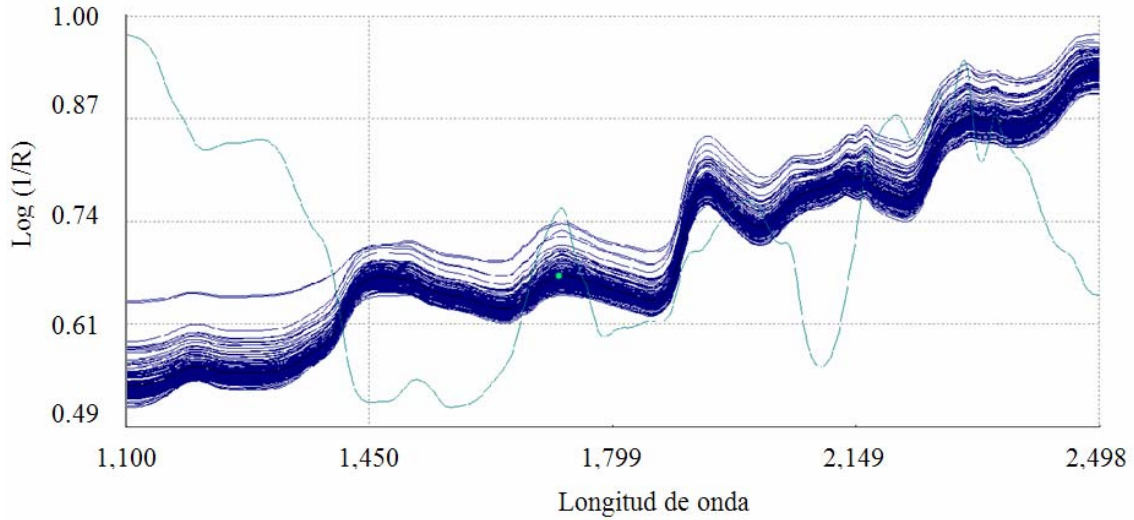


Figura 2. Espectros NIRS del total de muestras utilizadas para la calibración con la desviación estándar del espectro promedio.

NIRS: Espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano.

4.2.1 Métodos de regresión y tratamientos matemáticos evaluados

El método estadístico de cuadrados mínimos parciales (Cuadro 5), no mostró ajustes adecuados en las calibraciones. El Cuadro 6 muestra los tratamientos matemáticos evaluados para cada entidad química y su respectivo coeficiente de determinación de calibración utilizando MPLS. Los coeficientes de determinación que se obtuvieron con MPLS fueron más altos que los coeficientes obtenidos con PLS para el conjunto de entidades químicas evaluadas.

Cuadro 5. Tratamiento matemáticos evaluados con el método de regresión de cuadrados mínimos parciales.

Tratamiento matemático	PLS			
	Proteína	Grasa	Humedad	Cenizas
1,4,4,1	0.9919	0.8916	0.6473	0.9668
1,5,5,1	0.9936	0.8973	0.6324	0.5510
1,5,4,1	0.9334	0.8975	0.6592	0.9630
1,8,4,1	0.9831	0.8921	0.6595	0.9574
1,6,6,1	0.9936	0.8965	0.6598	0.9614
2,4,1,1	0.9959	0.8983	0.7045	0.9218
3,4,2,1	0.9913	0.8907	0.6173	0.9305
2,12,8,1	0.9942	0.8985	0.6501	0.9447
2,8,8,1	0.9941	0.8958	0.6789	0.9377
2,7,7,1	0.9936	0.8984	0.6910	0.9374
3,10,10,1	0.9931	0.8941	0.6740	0.9339
2,9,9,1	0.9941	0.8913	0.6760	0.9370

Cuadro 6. Tratamiento matemáticos evaluados con el método de regresión de cuadrados mínimos parciales modificados.

Tratamiento matemático	MPLS			
	Proteína	Grasa	Humedad	Cenizas
1,4,4,1	0.9929	0.9141	0.6603	0.9519
1,5,5,1	0.9924	0.9112	0.6681	0.9014
1,5,4,1	0.9928	0.9123	0.6452	0.9289
1,8,4,1	0.9930	0.9123	0.6672	0.9369
1,6,6,1	0.9926	0.9124	0.6676	0.9401
2,4,1,1	0.9906	0.9170	0.7076	0.8930
3,4,2,1	0.9918	0.9114	0.6801	0.8824
2,12,8,1	0.9915	0.9123	0.6448	0.9551
2,8,8,1	0.9925	0.9214	0.7097	0.9664
2,7,7,1	0.9925	0.9255	0.6720	0.9339
3,10,10,1	0.9897	0.9178	0.7204	0.9639
2,9,9,1	0.9925	0.9131	0.7125	0.9610

El mejor tratamiento matemático fue el 2,8,8,1 porque presentó el menor error estándar de calibración, el menor error estándar de validación cruzada y los mejores coeficientes de determinación de calibración y validación cruzada para los constituyentes químicos.

4.2.2 Resultados calibración y validación cruzada tratamiento matemático 2,8,8,1

El Cuadro 7 presenta los resultados obtenidos para la calibración NIRS de las entidades químicas analizadas. De mayor a menor los coeficientes de determinación en la calibración (R^2_{cal}) fueron 0.99 (SECV: 0.71%), 0.97 (SECV: 0.39%), 0.92 (SECV: 0.40%) y 0.71 (SECV: 0.60%) para proteína cruda, cenizas, grasa y humedad respectivamente. Los resultados obtenidos se muestran muy similares a los de otros autores que analizaron alimentos animales (Xiccato *et al.*, 1999; Cozzolino, 2002; Garrido *et al.*, 1996).

Cuadro 7. Calibración y validación cruzada NIRS para distintas entidades químicas en piensos para camarón.

	SEC	R^2_{cal}	SECV	R^2_{val}
Proteína cruda	0.6029	0.9925	0.7113	0.9895
Grasa	0.3665	0.9202	0.4036	0.9097
Humedad	0.5588	0.7097	0.6015	0.6623
Cenizas	0.2720	0.9678	0.3853	0.9354

*SEC: Error estándar de calibración; R^2_{cal} : coeficiente de determinación en calibración.

*SECV: Error estándar de validación cruzada; R^2_{val} coeficiente de determinación en la validación.

NIRS: Espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano.

*Expresado en porcentaje.

Los bajos coeficientes de determinación para la humedad, se debieron a que el método de referencia (horno 105°C) no es el más recomendado para determinación de humedad de la muestra cuando se utiliza como método de referencia para la construcción de ecuaciones de calibración NIRS. Según Cozzolino (2002) distintos autores han comprobado que la liofilización o titulación (método Karl Fischer) son mejores como método de de referencia para determinar la humedad con la técnica NIRS. La relación entre la predicción NIRS y los datos reales para humedad se presentan en la Figura 3.

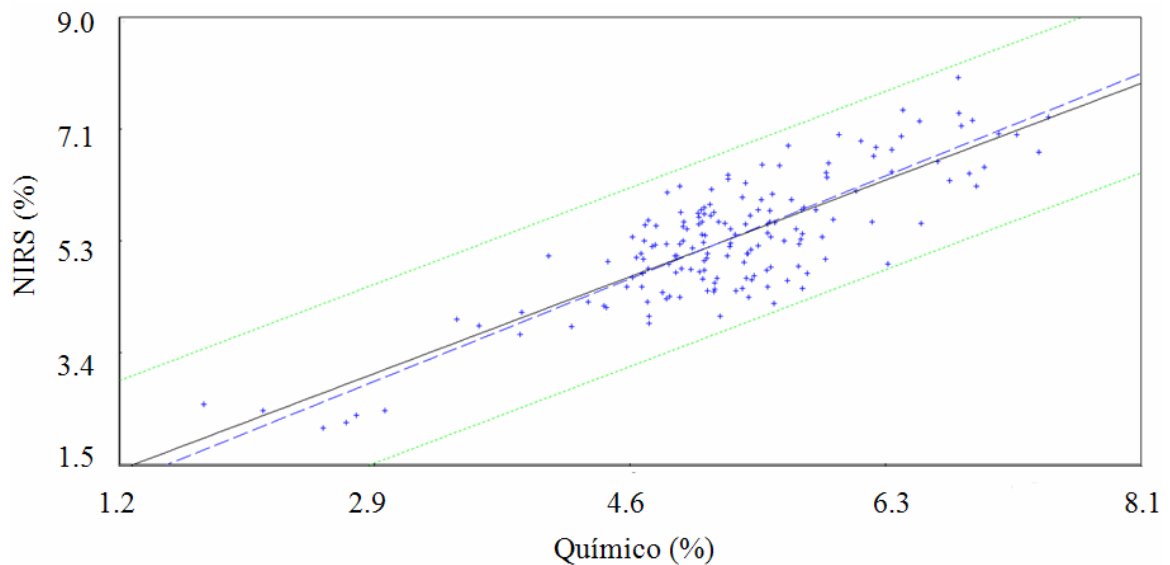


Figura 3. Relación entre la predicción NIRS y los valores reales para humedad (%).
Número de muestras utilizadas: (n=171).
NIRS: Espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano.

Tanto los coeficientes de determinación y los errores de calibración y validación para proteína son una muestra del alto poder de predicción de la calibración desarrollada para este parámetro. En la Figura 4 se muestra la relación entre la predicción NIRS y el método de referencia.

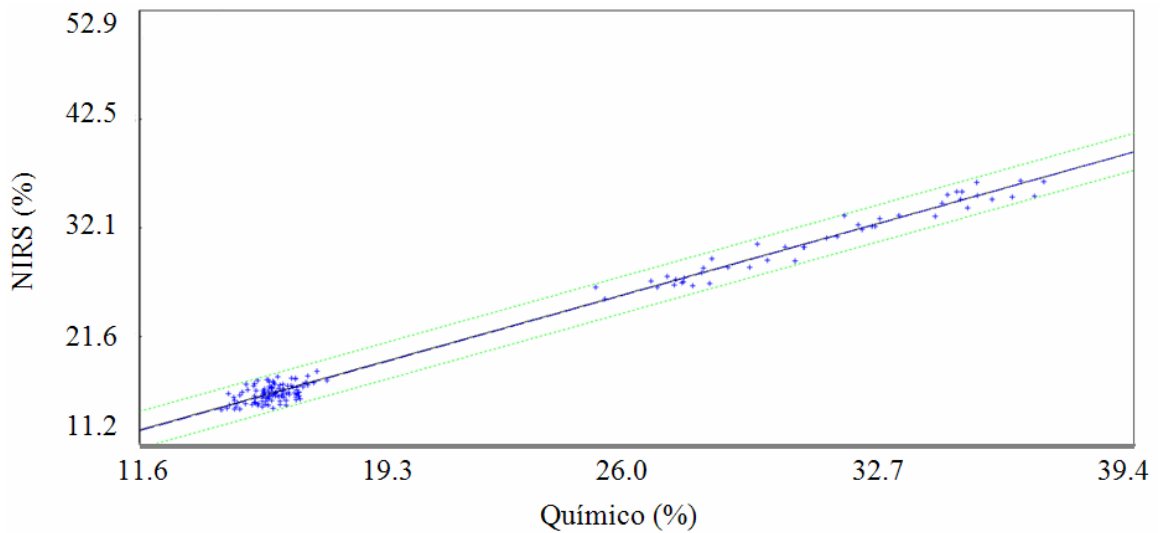


Figura 4. Relación entre la predicción NIRS y los valores reales para proteína (%).
 Número de muestras utilizadas: (n=171).
 NIRS: Espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano.

Los coeficientes de determinación calculados para grasa fueron menores, debido a que el método de referencia extrae no sólo la fase grasa de los piensos, sino también los compuestos que se utilizan para impermeabilizar los mismos. Estos compuestos son generalmente ceras que son solubles en el éter, pero que no tienen enlaces de tipo grasa, por lo que no generan absorbancia a las longitudes de onda de los lípidos. La Figura 5 muestra la relación entre la predicción NIRS y el método de referencia para grasa.

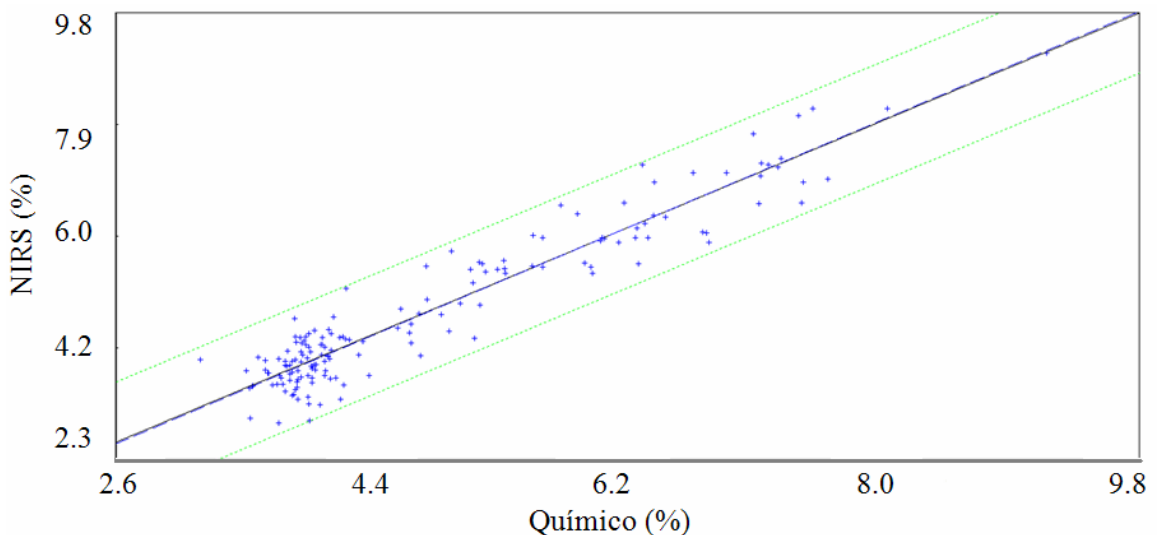


Figura 5. Relación entre la predicción NIRS y los valores reales para grasa (%).
 Número de muestras utilizadas: (n=171).
 NIRS: Espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano.

En el caso de las cenizas se debe destacar que las sustancias inorgánicas y los minerales no poseen absorción en la región del infrarrojo cercano. Sin embargo, los minerales y otros elementos inorgánicos se pueden asociar a la estructura orgánica, bajo la forma de óxidos, quelatos u otros compuestos propios de las materias primas que se utilizan para la elaboración de piensos, e indirectamente pueden ser estimadas por la tecnología NIRS (Xiccato *et al.*, 1999). En este estudio para la determinación de cenizas se alcanzaron coeficientes de determinación bastante altos. La Figura 6 muestra la relación entre la predicción NIRS y el método de referencia.

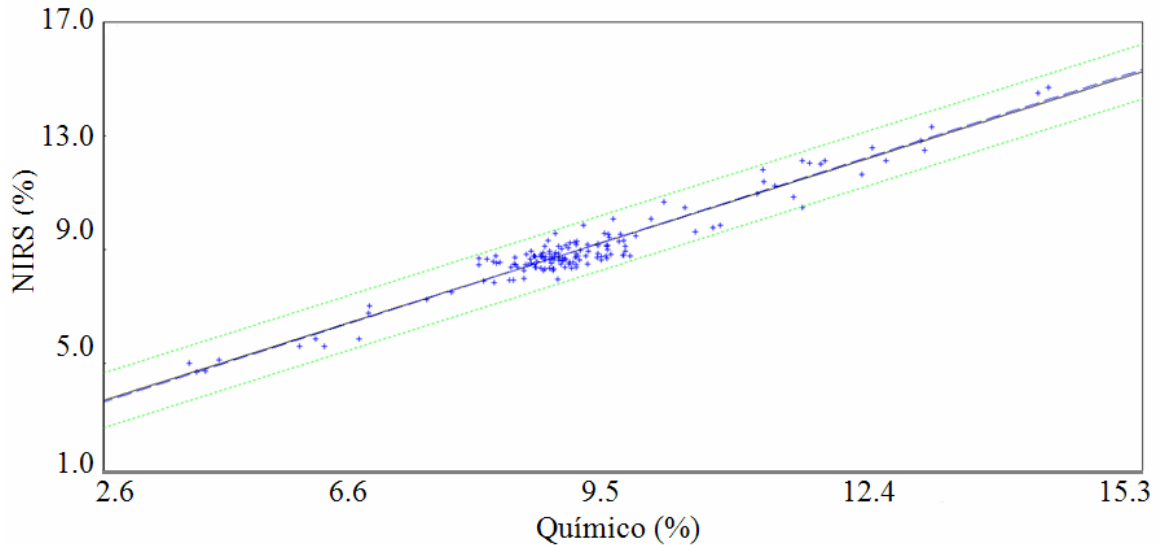


Figura 6. Relación entre la predicción NIRS y los valores reales para cenizas (%).

Número de muestras utilizadas: (n=171).

NIRS: Espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano.

Una forma de evaluar las ecuaciones NIRS con relación a su precisión y exactitud es a través de la relación entre la desviación estándar del método de referencia y el error estándar de la validación cruzada. Si esta relación es menor a 3 las ecuaciones resultan de un bajo poder de predicción y pueden ser utilizadas solamente como herramientas de monitoreo (Murray, 1993; citado por Xiccato *et al.*, 1999). La relación de los parámetros en este estudio fueron 10.7 para proteína cruda; 3.5 para grasa; 1.8 para humedad y 4.7 para cenizas, respectivamente. Esto evidencia un alto poder de predicción para las entidades químicas como proteína, grasa y cenizas; no así para humedad.

El Cuadro 8 muestra el error estándar de predicción, el error estándar de predicción corregido por el *bias*, el valor *bias* y la pendiente de la línea de regresión. El error estándar de predicción muestra la exactitud con la que es expresada cada entidad química analizada; *bias* es el valor esperado de la diferencia entre el valor real y la predicción NIRS y la pendiente da linealidad del modelo de regresión. Los errores de predicción corregidos por el *bias* fueron bastante bajos y acorde con estudios similares para proteína, grasa y cenizas (Xiccato *et al.*, 1999), aunque no para humedad.

Cuadro 8. Estadígrafos de predicción NIRS para piensos para camarón.

	SEP	<i>bias</i>	SEPC	Pendiente
Proteína cruda	0.711	-0.005	0.713	0.999
Grasa	0.404	-0.001	0.405	0.994
Humedad	0.602	-0.005	0.603	0.992
Cenizas	0.385	-0.028	0.386	0.990

NIRS: Espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano.

*SEP: Error estándar de predicción.

*SEPC: Error estándar de predicción corregido.

bias: Valor esperado de la diferencia entre el valor real y predicción NIRS.

* Expresado en porcentaje.

4.2.3 Validación externa

En el Cuadro 9 se muestran los resultados de los análisis proximales para proteína, grasa, humedad y cenizas utilizados para validar las curvas de calibración NIRS de piensos para camarón. Los constituyentes como proteína, grasa y humedad presentaron baja variabilidad evidenciada por su coeficiente de variación. Esto no se cumple para la humedad que tuvo un coeficiente de variación superior. Los rangos de las entidades químicas de las muestras analizadas se encuentran dentro de los rangos que se utilizaron en la calibración.

Cuadro 9. Estadística descriptiva de la composición química de muestras de piensos para camarón utilizadas para validación externa (base húmeda, %).

	Media	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Mínimo	Máximo
Proteína	16.14	0.34	2.08	15.52	17.22
Grasa	3.44	0.28	8.13	3.02	4.48
Humedad	8.12	0.88	10.89	6.42	9.08
Cenizas	8.72	0.39	4.43	8.00	9.56

*El número total de muestras analizadas para cada componente fue de 36.

El Cuadro 10 muestra los resultados de la prueba de diferencia de medias apareadas ($\alpha=0.05$) para los componentes de los piensos para camarón. Debido a que las probabilidades fueron mayores a 0.05, se concluye que no existió diferencia significativa entre el valor real y el estimado para proteína, grasa y cenizas; esto no se cumplió para humedad donde la probabilidad fue menor a 0.05. Por lo tanto, las curvas de calibración para el contenido de proteína, grasa y cenizas en piensos para camarón son válidas.

Cuadro 10. Prueba t apareadas para contenido de proteína, grasa, humedad y cenizas medidos con los métodos de referencia y predichos por NIRS en piensos para camarón.

	Media	Desviación estándar	Valor t	Probabilidad
Proteína	-0.016	0.164	-0.60	>0.5521
Grasa	-0.050	0.220	-1.36	>0.1832
Humedad	2.855	1.010	16.96	<0.0001
Cenizas	-0.016	0.162	-0.61	>0.5477

*El número total de muestras analizadas para cada componente fue de 36.

5. CONCLUSIONES

- Se desarrollaron curvas NIRS con alto poder de predicción de proteína cruda, grasa y cenizas para piensos para camarón, sin presentar diferencia significativas entre el valor real y el estimado NIRS.
- En el caso del contenido de humedad, la curva de calibración no tuvo un buen poder de predicción, mostrando diferencias significativas entre los valores reales y la estimación NIRS.
- La composición química de los piensos de camarón presentaron alta variabilidad en todos sus constituyentes.
- El Centro de Evaluación de Alimentos posterior a la validación cuenta con un modelo que predice la composición de piensos para camarón mediante la tecnología NIRS.

6. RECOMENDACIONES

- Ampliar el rango de acción de la curva mediante el ingreso de nuevas muestras con formulaciones distintas a las evaluadas.
- Probar métodos alternativos como: titulación Karl Fischer y liofilización para la determinación de humedad cuando se esté comparando con el NIR en calibraciones futuras.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Andueza, D.; Muñoz, F. y Garrido, A. 1995. The prediction of nutritive value of Mediterranean alfalfa forage by NIRS (en línea). Zaragoza, España. Consultado el 7 de sep de 2004. Disponible en:
<http://www.ciheam.org/util/search/detail.php?type=motclef&mot=COMPOSITION+CHIMIQUÉ&langue=fr>
- AOAC. 1997. Official Methods of Analysis of AOAC International. Patricia Cunniff. 16a. ed. Maryland, EE.UU. Editorial AOAC International. Vol. I, Cap 4. 4 – 25 p.
- Cozzolino, D. 2002. Uso de la espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) en el análisis de alimentos para animales. *Agrociencia*. 4, 2. 25 – 32 p.
- FOSS NIRSystem, 2000. ISI Windows Near- Infrared Software. US. II. 237p.
- Garrido, A.; Gómez, A.; Guerrero J. y Fernández, V. 1996. NIRS: Una tecnología de apoyo para un servicio integral en alimentación animal. (en línea). Madrid, España. Consultado el 8 de sep de 2004. Disponible en:
<http://www.etsia.upm.es/fedna/capitulos/96capituloXIV.pdf>
- Ginger Reverdin, S.; Duvaux, C. y Sauvant, D. 1995. Contribution of a short term *in vitro* method to formulate dairy goat diets (en línea). Paris, España. Consultado el 7 de sep de 2004. Disponible en: <http://www.CHEMICAL.org/util/search/detail.pdf>
- López, C. 2001. Curvas de calibración y validación por espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRS) para leche fluida. Proyecto de Graduación del Programa de Ingeniería Agroindustrial. Zamorano, Honduras. 35p.
- Meyer, D.; Martínez, S. y Triminio, S. (2004) *Acuicultura*. 2da ed. Zamorano, Honduras. 35,78 p.
- Newgard, E. 2000. Spectroscopy for Analysis of Agricultural Material. University of Illinois. Urbana, Champaign. EE. UU. Consultado el 20 de agosto del 2005 (en línea). Disponible en: www.online.physics.uiuc.edu
- Obaldo, L.; Divakaran, S. y Raymond, S. 2001. World Aquaculture Society, January (en línea). Uchida, Estados Unidos. Consultado el 8 de sep de 2004. Disponible en:
http://www.oceanicinstitute.org/research/abstracts_feeds.html

- Osborne, B. 1998. Collaborative Evaluation of Universal Calibrations for the Measurement of Protein and Moisture in Flour by Near Infrared Reflectance. *J. Food Technol.*, 18, 453–460 p.
- Pasquini, C. 2003. Near Infrared Spectroscopy: Fundamentals, Practical Aspects and Analytical Applications. Sociedade Brasileira de Química. *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 14, No. 2, 198-219 p.
- Portillo, D. y Espinoza, R. 2003. Comportamiento de la camaronicultura en Honduras. Infoagro. Honduras C. A. Consultado el 20 de septiembre del 2005 (en línea). Disponible en: <http://www.sag.gob.hn/>
- Reyes, Y. 2002. Establecimiento y validación de curvas de calibración NIRS para la composición química de queso cabaña. Proyecto de Graduación del Programa de Ingeniería Agroindustrial. Zamorano, Honduras. 29 p.
- Shenk, J. y Westerhaus, M. 1993. Analysis of Agricultural and Food Products by Near Infrared Reflectance Spectroscopy. Monograph. EE.UU. Lehmann., Infracsoft International. 112 p.
- Xiccato, G.; Trocino, A.; Carazzolo, A.; Meurens, M.; Maertens, L. y Carabaño, R. 1999. Nutritive and ingredient prediction of compound feeds for rabbits by near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS). *Anim. Feed Sci. Technol.* 77, 201–212p.

8. ANEXOS

Anexo 1. Composición química por métodos de referencia de muestras utilizada para calibración

No. Muestra	Identificación de la muestra	Proteína	Grasa	Humedad	Cenizas
1	Lote 341	16.29	3.54	6.82	8.45
2	Lote 341	16.20	3.66	7.03	8.71
3	Lote HON 5030B	15.12	3.78	6.78	8.66
4	Lote HON 5030B	14.95	3.98	7.26	8.51
5	Lote HON 5047B	16.80	3.64	6.84	8.60
6	Lote HON 5047B	17.01	3.60	6.31	8.50
7	INHV Código IN 01	26.52	7.36	7.98	8.68
8	INHV Código IN 01	26.62	7.07	7.27	8.68
9	Nicovita Nic 02	36.44	7.28	7.05	7.85
10	Nicovita Nic 02	35.13	7.22	6.38	7.90
11	Borracones línea económica	26.99	6.01	7.44	8.55
12	Borracones línea económica	26.39	5.97	7.39	8.27
13	Biomás Código B1004	26.93	6.02	6.26	8.49
14	Biomás Código B1004	26.85	5.95	6.58	8.65
15	Nasa Código A105	47.67	8.25	5.77	13.76
16	Nasa Código A105	49.15	8.28	5.81	13.77
17	Premium Código Prem 06	36.59	8.08	6.49	6.77
18	Premium Código Prem 06	36.54	8.20	6.93	7.02
19	Lote HON 5131C	16.90	3.95	5.74	8.45
20	Lote HON 5131C	16.37	3.86	6.25	8.52
21	Lote HON 5164C	15.66	3.56	5.86	8.74
22	Lote HON 5164C	15.96	3.56	6.35	8.72
23	Lote HON 5096C	16.53	3.53	6.12	9.25
24	Lote HON 5096C	16.09	3.52	5.71	9.23
25	Muestra compresada alimento	17.64	3.75	5.52	8.81
26	Muestra compresada alimento	17.20	3.39	5.85	8.76
27	IEFA01	30.54	5.60	2.68	5.84
28	IEFA01	28.92	5.53	2.43	5.84
29	IEFA02	35.16	4.04	2.74	4.68
30	IEFA02	34.79	4.13	2.48	4.73
31	IEFA03	33.25	5.42	3.84	5.61
32	IEFA03	32.36	5.53	4.15	5.61
33	IEFA04	35.27	5.17	2.14	5.12
34	IEFA04	34.85	5.63	2.35	5.00
35	IEFA05	34.48	5.39	4.28	12.02
36	IEFA05	31.60	5.73	3.82	12.04
37	IEFA06	35.57	6.27	7.17	7.23
38	IEFA06	35.53	6.19	6.56	7.49
39	S/N	17.44	2.94	5.82	8.46
40	S/N	17.88	2.90	6.07	8.49
41	Lote HON 5129A 287	17.58	3.80	5.63	8.38
42	Lote HON 5129A 287	17.19	4.19	6.16	8.37
43	Lote HON 5130A 319	18.31	4.41	4.41	8.34
44	Lote HON 5130A 312	17.24	4.29	4.00	8.38
45	Lote 1686B Bahía	15.43	4.69	4.49	9.63

No. Muestra	Identificación de la muestra	Proteína	Grasa	Humedad	Cenizas
46	Lote 1686B Bahía	16.30	4.30	4.15	9.42
47	Lote HON 5168C 428	16.34	3.88	5.21	8.88
48	Lote HON 5168C 428	16.51	3.75	4.78	9.17
49	Lote HON 5132C 401	16.31	4.36	5.81	7.93
50	Lote HON 5132C 401	16.83	4.34	5.54	7.91
51	Lote HON 5133C 405	16.88	4.27	4.46	8.33
52	Lote HON 5133C 405	16.23	3.86	4.29	8.26
53	Lote HON 5134C 402	16.06	3.65	4.95	8.34
54	Lote HON 5134C 402	16.93	3.30	5.21	8.39
55	Lote HON 5163C	15.82	4.45	4.78	9.10
56	Lote HON 5163C	17.48	4.04	4.40	9.18
57	Lote HON 5163B	15.15	4.03	4.32	8.78
58	Lote HON 5163B	15.95	3.86	4.56	8.76
59	Lote HON 5165C 385	17.83	3.70	5.32	8.62
60	Lote HON 5165C 385	16.74	3.37	5.88	8.58
61	Lote HON 5133C 408	15.98	3.68	4.21	7.89
62	Lote HON 5133C 409	17.67	3.82	4.49	8.27
63	Bahía 1675B	16.55	4.32	4.77	9.47
64	Bahía 1675B	15.44	4.36	4.82	9.15
65	Lote HON 15178B 671	15.07	3.51	4.63	8.70
66	Lote HON 15178B 671	14.77	3.31	4.67	8.65
67	Lote HON 5133A	16.59	4.05	5.68	8.31
68	Lote HON 5133A	16.24	3.97	5.78	8.52
69	Lote HON 5168B 436	15.54	3.70	4.43	8.63
70	Lote HON 5168B 436	17.09	3.67	4.46	8.32
71	Lote HON 1757A	14.61	4.98	5.54	8.83
72	Lote HON 1757A	14.78	4.92	5.36	8.64
73	Lote HON 5133A 315	15.80	3.79	5.53	8.38
74	Lote HON 5133A 315	15.57	4.01	5.37	8.47
75	Bahía 1727A	16.02	4.57	5.50	9.11
76	Bahía 1727A	15.30	4.50	5.01	9.15
77	Lote HON 5178B 671	15.89	4.22	5.18	8.62
78	Lote HON 5178B 671	16.79	4.11	5.62	8.50
79	Lote HON 5164C 320	16.69	3.78	5.57	8.73
80	Lote HON 5164C 320	16.70	4.18	5.35	8.75
81	Bahía 1737A	17.98	5.61	5.46	9.28
82	Bahía 1737A	17.07	5.45	5.56	9.27
83	Bahía 1716A	17.26	3.94	5.55	9.55
84	Bahía 1716B	15.72	4.28	5.05	9.85
85	Lote HON 5178C 677	15.09	3.96	5.57	8.76
86	Lote HON 5178C 67/	15.77	3.95	6.04	8.76
87	Bahía 17272B	17.83	4.43	5.95	8.87
88	Bahía 17272B	16.15	4.25	5.77	8.98
89	Bahía 17163A	15.81	4.83	5.95	10.07

No. Muestra	Identificación de la muestra	Proteína	Grasa	Humedad	Cenizas
90	Bahía 17163A	16.20	4.74	6.52	10.08
91	Bahía 1889101	17.53	5.58	5.05	9.13
92	Bahía 1889101	15.94	5.80	4.98	9.10
93	Bahía 187A155	16.07	3.67	4.88	8.88
94	Bahía 187A155	15.55	3.93	5.33	8.87
95	Lote HON 5180A 721	16.35	4.23	4.95	8.73
96	Lote HON 5180A 721	16.65	4.47	5.03	8.84
97	Lote HON 18774A	15.18	5.49	5.22	8.94
98	Lote HON 18774A	15.05	5.26	5.45	8.71
99	Lote HON 1807B	16.20	5.43	5.39	8.35
100	Lote HON 1807B	15.06	5.49	5.11	8.39
101	Lote HON 5178B	16.85	4.05	6.24	8.74
102	Lote HON 5178B	16.05	4.41	5.68	8.76
103	Lote HON 18775A	14.70	4.73	5.96	8.56
104	Lote HON 18775A	14.91	4.33	6.34	8.77
105	Bahía 19209202	15.25	4.89	5.52	8.74
106	Bahía 19209203	15.80	5.40	5.04	9.06
107	Lote HON 5187B 166	15.87	4.12	4.92	8.95
108	Lote HON 5187B 166	15.16	4.00	5.19	9.15
109	Lote HON 5168A	18.24	3.21	5.24	8.63
110	Lote HON 5168A	17.14	3.54	5.17	8.50
111	Lote HON 5179B7	15.46	3.47	5.52	9.00
112	Lote HON 5179B7	15.33	3.44	5.01	9.02
113	Lote HON 16862A	17.09	3.70	5.14	9.32
114	Lote HON 16862A	16.00	4.05	5.65	9.53
115	Bahía 1889101	14.69	5.94	5.23	9.21
116	Bahía 1889101	15.25	6.10	5.73	8.94
117	Lote HON 16963A	15.76	5.51	5.60	9.11
118	Lote HON 16963A	15.80	5.54	6.10	9.31
119	Lote HON 5201A 577	16.25	4.66	5.32	8.75
120	Lote HON 5201A 577	15.99	4.34	5.51	7.98
121	Lote HON 5167C	16.84	4.48	5.58	8.64
122	Lote HON 5167C	16.40	4.35	5.77	8.62
123	Lote HON 5179C 685	16.00	4.23	5.82	7.86
124	Lote HON 5179C 685	16.46	4.25	5.26	8.80
125	Bahía 18909302	15.40	6.57	4.77	9.56
126	Bahía 18909302	15.31	6.07	5.16	9.57
127	Lote HON 5179B 700	17.37	3.23	6.29	8.75
128	Lote HON 5179B 700	16.29	2.99	6.17	8.55
129	Lote HON 5187B	15.66	3.76	5.21	7.94
130	Lote HON 5187B	15.95	3.88	5.26	8.78
131	Lote HON 5187A 155	16.14	3.59	6.07	8.94
132	Lote HON 5187A 155	15.93	3.89	5.57	8.83
133	Lote HON 5201 B 603	16.52	4.11	6.23	8.61
134	Lote HON 5201 B 603	16.11	3.73	6.53	8.64
135	Lote HON 5186B 135	17.05	3.63	5.45	8.87

No. Muestra	Identificación de la muestra	Proteína	Grasa	Humedad	Cenizas
136	Lote HON 5186B 135	17.01	3.34	5.72	9.10
137	Lote HON 5179C 711	17.22	3.99	4.00	8.45
138	Lote HON 5179C 712	17.55	4.36	3.88	8.58
139	Lote HON 5206B 174	16.46	3.70	3.83	8.81
140	Lote HON 5206B 175	16.27	3.89	4.24	8.87
141	Lote HON 5164C	15.55	5.55	8.31	8.62
142	230V242	29.01	3.41	6.84	11.82
143	237V60	33.30	5.58	6.57	12.57
144	229V83	27.31	6.96	7.00	10.97
145	237V59	30.27	7.12	9.32	9.78
146	237V252	28.30	6.03	7.22	10.48
147	209	32.27	7.26	8.48	9.58
148	Camarón 27%	28.28	5.63	7.32	10.68
149	Camarón 27%	26.78	6.02	6.39	9.84
150	188V541	31.94	3.74	6.09	12.13
151	193V9307	16.15	3.79	5.33	8.71
152	199V5504	30.27	7.12	5.98	10.47
153	222V57207	28.30	6.03	4.74	11.37
154	222V560309	32.27	7.26	5.68	8.86
155	221V23406	27.42	6.42	7.17	11.25
156	222V23608	27.16	8.20	6.41	11.65
157	201V7705	31.25	6.40	5.76	11.63
158	Camarón 27%	29.12	6.60	7.01	12.11
159	229V14	35.06	6.61	5.01	12.15
160	248811	33.98	6.12	6.68	12.11
161	Lote HON 5047B	16.92	3.49	5.55	8.73
162	183V7605	26.39	10.05	6.74	12.48
163	208	30.22	9.13	4.88	13.49
164	SI 208	27.85	6.96	5.26	13.32
165	230V14	34.70	4.89	7.03	10.84
166	799V190	25.29	7.78	5.78	12.84
167	185V751	32.95	6.61	4.68	14.54
168	Camarón 27%	27.82	5.64	5.01	2.30
169	237V61	33.23	6.37	4.45	14.71
170	237V58	31.14	7.02	4.61	14.49
171	Lote HON 5206B	16.19	3.97	5.49	8.76

Anexo 2. Composición química por métodos de referencia de muestras utilizada para validación externa

No. Muestra	Identificación de la muestra	Proteína	Grasa	Humedad	Cenizas
1	Lote HON 5221A 274	17.22	3.81	6.98	8.44
2	Lote HON 5222B 307	16.03	3.20	6.60	8.69
3	Lote HON 5225C 285	16.62	3.48	8.59	8.31
4	Lote HON 5222C 316	15.99	3.64	8.84	9.21
5	Lote HON 5229A 483	16.22	3.25	6.80	9.56
6	Lote HON 5252A 264	15.73	3.22	7.16	8.97
7	Lote HON 5242A 893	16.10	3.02	7.17	8.65
8	Lote HON 5271C 770	16.27	3.36	7.05	8.59
9	Lote HON 5201A 577	16.15	3.05	7.49	8.78
10	Lote HON 5234A 626	16.53	3.38	8.96	9.56
11	Lote HON 5221C 267	16.08	3.59	8.82	9.10
12	Lote HON 5256B 381	15.84	3.94	8.90	8.07
13	Lote HON 5210B 10	16.27	3.82	8.73	8.47
14	Lote HON 5222A 295	16.51	3.44	7.00	8.48
15	Lote HON 5220A 245	15.91	3.75	8.85	8.45
16	Lote HON 5210B 10	16.32	3.32	8.22	8.20
17	Lote HON 5248B 150	15.84	3.47	8.98	8.39
18	Lote HON 5259A 447	16.15	3.27	7.17	8.65
19	Lote HON 5270C 770	15.97	3.44	8.30	8.51
20	Lote HON 5214A 92	16.47	3.17	8.66	9.33
21	Lote HON 5278A 108	15.80	3.25	8.21	9.00
22	Lote HON 5222C 316	16.36	3.50	6.78	8.63
23	Lote HON 5265C 608	16.22	3.48	8.79	8.57
24	Lote HON 5217C 212	16.47	3.21	6.70	8.65
25	Lote HON 5265A 615	16.34	3.49	8.53	8.81
26	Lote HON 5221C 267	16.35	3.44	9.08	9.36
27	Lote HON 5283B 564	16.24	3.49	8.93	8.50
28	Lote HON 5220A 245	16.16	3.46	8.59	8.00
29	Lote HON 5222A 305	16.28	3.63	6.42	8.97
30	Lote HON 5218A	15.70	4.48	8.30	8.62
31	Lote HON 5209C 804	15.70	3.24	8.95	8.76
32	Lote HON 5269A 720	16.05	3.18	8.86	8.66
33	Lote HON 5219C 242	15.52	3.28	8.92	8.41
34	Lote HON 5220C 260	15.53	3.15	8.35	9.36
35	Lote HON 5220C 260	15.98	3.50	8.55	8.72
36	Lote HON 5274C 44	16.00	3.54	8.98	8.66

Anexo 3. Tratamientos matemáticos evaluados con MPLS y PLS

Tratamientos matemáticos			
1,4,4,1	1,8,4,1	3,4,2,1	2,7,7,1
1,5,5,1	1,6,6,1	2,12,8,1	3,10,10,1
1,8,4,1	2,4,1,1	2,8,8,1	2,9,9,1