

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología**



***UTILIZACIÓN DE LA TECNOLOGÍA NIRS CON SONDA DE  
FIBRA ÓPTICA PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE  
ALFALFA.***

**José Miguel Hernández Hierro**

**2008**



**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología**

***UTILIZACIÓN DE LA TECNOLOGÍA NIRS CON SONDA DE  
FIBRA ÓPTICA PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE  
ALFALFA***

Memoria que para alcanzar el Grado de Doctor en Química presenta el licenciado  
José Miguel Hernández Hierro

Salamanca, 3 de noviembre de 2008

Fdo: José Miguel Hernández Hierro



**Dra. Dña. M<sup>a</sup> Inmaculada González Martín**, Profesora Titular Química Analítica Nutrición y Bromatología de la Universidad de Salamanca, directora del trabajo: *Utilización de la tecnología NIRS con sonda de fibra óptica para el control de calidad de alfalfa*, realizado por **D. José Miguel Hernández Hierro** para optar al grado de Doctor en Química por la Universidad de Salamanca, autoriza la presentación del mismo, al considerar que se han alcanzado los objetivos inicialmente previstos.

Salamanca, 3 de noviembre de 2008

Fdo: M<sup>a</sup> Inmaculada González Martín



**El trabajo realizado ha sido financiado por el proyecto SA 057A05 de la Junta de Castilla y León (2005-2007).**





## AGRADECIMIENTOS

Al terminar esta memoria sólo me queda mostrar mi agradecimiento a todas las personas, que de una u otra manera, me han brindado su apoyo.

Para mi directora de tesis, la Dra. M<sup>a</sup> Inmaculada González Martín, sólo tengo palabras de agradecimiento por confiar en mí y mostrarme toda su ayuda, paciencia y disposición constante durante todo este tiempo.

Quiero agradecer al Dr. Claudio González Pérez, codirector de mi trabajo de grado de Salamanca, todo su apoyo y cordialidad a lo largo de estos años.

También son muchos los años que he trabajado junto con el Dr. Rafael García-Villanova Ruiz, al que tengo que agradecer su disponibilidad y flexibilidad para hacer posible la realización de esta tesis.

El departamento está constituido por dos áreas, Química Analítica situada en la Facultad de Ciencias Químicas y Nutrición y Bromatología situada en la Facultad de Farmacia. He tenido la suerte de trabajar en las dos áreas, y gracias a la amabilidad y compañerismo de todos sus miembros no puedo hablar de una de ellas sin estar pensando en la otra. Si difícil es nombrar a todos los miembros de un área, más es nombrar al departamento entero, por ello quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todos los que están y a los que han pasado por el departamento, especialmente a mis compañeros, con quien tan buenos momentos he compartido.

Quiero mostrar mi agradecimiento a los miembros de CSIC-IRNASA, especialmente al Dr. Adolfo C. Iñigo Iñigo y su grupo, por la atención mostrada durante mi estancia.

También agradezco a Aquimisa S.L. el suministro de muestras y su colaboración en este trabajo.

Un especial reconocimiento por su apoyo incondicional merecen mis padres; gracias por estar siempre a mi lado, sin vosotros y vuestro apoyo jamás habría podido llegar hasta aquí.

A toda mi familia que ha estado a mi lado, dándome ánimos y deseándome siempre lo mejor; sólo puedo mostrarle mi gratitud, especialmente a mis tíos Miguel y Amelia.

Para Ángeles, sólo tengo que palabras de agradecimiento por escucharme, comprenderme y estar siempre dispuesta a darme ánimos en los momentos que lo he necesitado.

También quiero mencionar a todos mis amigos y compañeros, por interesarse por lo que hago, darme su apoyo e intentar endulzar tantos y tantos momentos.

*“Nunca te arrepientas de haberlo hecho...  
Arrepiéntete de no haberlo intentado...”*

***Anónimo***



*A mi Familia*



## **Índice**





<b>Acrónimos y siglas</b> .....	<b>I</b>
<b>I <i>Introducción y objetivos</i></b> .....	<b>1</b>
<b>I.1 Introducción</b> .....	<b>3</b>
<b>I.2 Objetivos</b> .....	<b>4</b>
<b>II <i>Fundamentos y antecedentes bibliográficos</i></b> .....	<b>5</b>
<b>II.1 La alfalfa</b> .....	<b>7</b>
<b>II.2 Espectroscopía NIR</b> .....	<b>11</b>
<b>II.2.1 Principios</b> .....	<b>11</b>
<b>II.2.1.1 Interpretación de espectros en la región NIR</b> .....	<b>15</b>
<b>II.2.2 Instrumentación</b> .....	<b>21</b>
<b>II.2.2.1 Estandarización del equipo NIR</b> .....	<b>23</b>
<b>II.3 Ventajas e inconvenientes de la espectroscopía NIR</b> .....	<b>24</b>
<b>II.4 Antecedentes bibliográficos</b> .....	<b>25</b>
<b>II.5 Quimiometría</b> .....	<b>34</b>
<b>II.5.1 Pretratamientos espectrales utilizados</b> .....	<b>35</b>
<b>II.5.2 Análisis cualitativos utilizados</b> .....	<b>41</b>
<b>II.5.2.1 Análisis discriminante basado en regresión por                     mínimos cuadrados parciales DPLS</b> .....	<b>41</b>
<b>II.5.2.2 Análisis de componentes principales PCA</b> .....	<b>43</b>
<b>II.5.3 Análisis cuantitativos utilizados</b> .....	<b>46</b>
<b>II.5.3.1 Regresión por mínimos cuadrados parciales                     modificados MPLS</b> .....	<b>46</b>
<b>III <i>Experimental</i></b> .....	<b>53</b>
<b>III.1 Etapas de trabajo en estudios NIR</b> .....	<b>55</b>
<b>III.1.1 Uso de la espectroscopía NIR en análisis cualitativo</b> .....	<b>55</b>
<b>III.1.2 Uso de la espectroscopía NIR en análisis cuantitativo</b> .....	<b>56</b>
<b>III.2 Muestras</b> .....	<b>57</b>
<b>III.3 Registro de los espectros NIR</b> .....	<b>57</b>

<b>IV Resultados .....</b>	<b>61</b>
<b>IV.1 Urea, biuret y gallinaza.....</b>	<b>63</b>
<b>IV.1.1 Detección de urea, biuret y</b>	
<b>gallinaza en muestras de alfalfa.....</b>	<b>66</b>
<b>IV.1.2 Cuantificación de urea, biuret y</b>	
<b>gallinaza en muestras de alfalfa.....</b>	<b>68</b>
<b>IV.2 Proteína y humedad.....</b>	<b>73</b>
<b>IV.2.1 Modelos iniciales (campaña 2004). Alfalfa triturada y</b>	
<b>empacada.....</b>	<b>74</b>
<b>IV.2.2 Ampliación y desarrollo de nuevos modelos</b>	
<b>a lo largode los años 2004-2005-2006. Alfalfa triturada .....</b>	<b>84</b>
<b>IV.3 Determinación de Ca, K, P, Fe, Mn, Na y Zn .....</b>	<b>94</b>
<b>IV.4 Determinación de tocoferoles en alfalfa .....</b>	<b>102</b>
<b>V Conclusiones.....</b>	<b>109</b>
<b>V.1 Urea, biuret y gallinaza.....</b>	<b>111</b>
<b>V.1.1 Detección de urea, biuret y</b>	
<b>gallinaza en muestras de alfalfa.....</b>	<b>111</b>
<b>V.1.2 Cuantificación de urea, biuret y</b>	
<b>gallinaza en muestras de alfalfa.....</b>	<b>112</b>
<b>V.2 Proteína y humedad.....</b>	<b>112</b>
<b>V.2.1 Modelos iniciales (campaña 2004). Alfalfa triturada y</b>	
<b>empacada.....</b>	<b>112</b>
<b>V.2.2 Ampliación y desarrollo de nuevos modelos</b>	
<b>a lo largode los años 2004-2005-2006. Alfalfa triturada .....</b>	<b>113</b>
<b>V.3 Determinación de Ca, K, P, Fe, Mn, Na y Zn.....</b>	<b>114</b>
<b>V.4 Determinación de tocoferoles en alfalfa.....</b>	<b>115</b>

## **ANEXO I-Trabajos publicados**

- 1** González-Martín, I.; Hernández-Hierro, J.M.; Bustamante-Rangel, M.; Barros-Ferreiro, N. Near-infrared spectroscopy (NIRS) reflectance technology for the determination of tocopherols in alfalfa. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2006, 386, 1553-1558.
- 2** González-Martín, I.; Hernández-Hierro, J.M.; González-Cabrera, J.M. Use of NIRS technology with a remote reflectance fibre-optic probe for predicting mineral composition (Ca, K, P, Fe, Mn, Na, Zn), protein and moisture in alfalfa. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, 387, 2199-2205.
- 3** González-Martín, I.; Hernández-Hierro, J.M. Detection and quantification of additives (urea, poultry litter, biuret) in alfalfas by NIR spectroscopy with fibre-optic probe. *Talanta*, 2008, 76, 1130-1135.

## **ANEXO II-Certificado de la empresa**

**Aquimisa**



## **Acrónimos y siglas**



---

<b>BIAS:</b>	Media de los residuales
<b>DPLS:</b>	Análisis discriminante basado en regresión por mínimos cuadrados parciales, <i>Discriminant Partial Least Squares</i>
<b>DT:</b>	Corrección de la tendencia, <i>Detrend</i>
<b>FIR:</b>	Infrarrojo lejano, <i>Far Infrared</i>
<b>H:</b>	Distancia de Mahalanobis
<b>IR:</b>	Infrarrojo, <i>Infrared</i>
<b>MIR:</b>	Infrarrojo medio, <i>Middle Infrared</i>
<b>MPLS:</b>	Regresión por mínimos cuadrados parciales modificados, <i>Modified Partial Least Squares Regression</i>
<b>MSC:</b>	Corrección del efecto multiplicativo de la dispersión, <i>Multiplicative Scatter Correction</i>
<b>NH:</b>	Distancia de Mahalanobis a muestra vecina, <i>Neighborhood H</i>
<b>NIPALS:</b>	Algoritmo no lineal parcial por mínimos cuadrados, <i>Nonlinear Iterative Partial Least Squares</i>
<b>NIR:</b>	Infrarrojo cercano, <i>Near Infrared</i>
<b>NIRS:</b>	Espectroscopía del infrarrojo cercano, <i>Near Infrared Spectroscopy</i>
<b>PCA:</b>	Análisis de componentes principales, <i>Principal Component Analysis</i>
<b>PC:</b>	Componente principal, <i>Principal Component</i>
<b>PLS:</b>	Regresión por mínimos cuadrados parciales, <i>Partial Least Squares Regression</i>
<b>PLS 1:</b>	Regresión por mínimos cuadrados parciales (un parámetro a modelar), <i>Partial Least Squares Regression</i>

---

<b>PLS 2:</b>	Regresión por mínimos cuadrados parciales (varios parámetros a modelar), <i>Partial Least Squares Regression</i>
<b>RMSE:</b>	Error cuadrático medio, <i>Root Mean Standard Error</i>
<b>RPD:</b>	Capacidad de predicción del modelo, <i>Ratio Performance Deviation</i>
<b>RSQ:</b>	Coefficiente de correlación múltiple, <i>R-squared</i>
<b>SD:</b>	Desviación estándar, <i>Standard Deviation</i>
<b>SEC:</b>	Error estándar de calibración, <i>Standard Error of Calibration</i>
<b>SECV:</b>	Error estándar de validación cruzada, <i>Standard Error of Cross Validation</i>
<b>SEP:</b>	Error estándar de predicción, <i>Standard Error of Prediction</i>
<b>SEP (C):</b>	Error estándar de predicción corregido por el BIAS, <i>Corrected Standard Error of Prediction</i>
<b>SNV:</b>	Tipificación de la absorbancia, <i>Standard Normal Variate</i>
<b>T:</b>	Residual dividido por el SECV
<b>UV:</b>	Ultravioleta



# **I      Introducción y objetivos**

## **I.1    Introducción**

## **I.2    Objetivos**



## I.1 Introducción

En los últimos tiempos se ha incrementado notablemente el número de determinaciones analíticas destinadas a la evaluación de la nutrición animal, sin embargo los métodos estandarizados, son tediosos, generalmente lentos y requieren del uso de numerosos reactivos.

Alternativamente se han ido desarrollando nuevas metodologías analíticas que resuelven parte de estos problemas, una de ellas es la espectroscopía del infrarrojo cercano NIRS (*Near Infrared Spectroscopy*). Esta técnica analítica no destructiva es rápida, ya que requiere escasa o nula preparación de la muestra, es multiparamétrica, se pueden determinar varios parámetros simultáneamente partiendo de una misma medida y no requiere ningún reactivo. En la técnica NIRS, como en la mayoría de las técnicas instrumentales, las leyes matemáticas que describen la interacción de la radiación con la materia son complejas, por ello, la información espectral es difícil de interpretar requiriendo una calibración con muestras de composición conocida, lo que implica uno de los mayores obstáculos.

Los avances en esta técnica vienen parejos al desarrollo de su instrumentación, al desarrollo de la informática, a la mejora del software y al consiguiente avance en la quimiometría. Las aplicaciones, tanto cualitativas como cuantitativas, se dirigen a parámetros físicos y químicos, como a la predicción de parámetros globales que estén relacionados con más de un componente.

La alfalfa es uno de los principales forrajes producidos en el área mediterránea y tiene gran interés tanto desde el punto de vista agronómico como industrial. A su riqueza energética y proteica se unen los altos contenidos en ciertos minerales y vitaminas, entre ellas el alto contenido en vitamina E, lo que la convierte en una pieza importante dentro de la nutrición animal. Se considera que la proteína bruta es un buen indicador de su valor energético, la posible adulteración por adición de aditivos como urea, biuret y gallinaza que elevan la proteína hace necesario el control de la misma. Lo que se plantea en este trabajo es una metodología analítica que permita un control sistemático de la calidad de la alfalfa de forma rápida y con bajo coste de análisis por muestra.

## **I.2    Objetivos**

Los objetivos que se desean alcanzar en este trabajo pretenden dar respuesta a la demanda de métodos rápidos, para la evaluación de parámetros de interés en la alfalfa, tanto desde el punto de vista agronómico como industrial. Se evalúa el potencial de la tecnología NIR con sonda de fibra óptica a la determinación de dichos parámetros, utilizando diversas técnicas quimiométricas tanto cuantitativas como cualitativas. A continuación se indican los aspectos concretos que van a ser objeto de estudio:

- Control de aditivos: urea, biuret y gallinaza.
- Determinación de humedad y proteína bruta.
- Utilización de diferentes formas de presentación de alfalfa (empacada y trituradas) para la determinación de humedad y proteína bruta.
- Aplicación y seguimiento de la tecnología NIR como método de control para los parámetros humedad y proteína bruta en un laboratorio externo.
- Determinación de Ca, K, P, Fe, Mn, Na y Zn.
- Determinación de tocoferoles.

## **II Fundamentos y antecedentes bibliográficos**

### **II.1 La alfalfa**

### **II.2 Espectroscopía NIR**

#### **II.2.1 Principios**

##### **II.2.1.1 Interpretación de espectros en la región NIR**

#### **II.2.2 Instrumentación**

##### **II.2.2.1 Estandarización del equipo NIR**

### **II.3 Ventajas e inconvenientes de la espectroscopía NIR**

### **II.4 Antecedentes bibliográficos**

### **II.5 Quimiometría**

#### **II.5.1 Pretratamientos espectrales utilizados**

#### **II.5.2 Análisis cualitativos utilizados**

##### **II.5.2.1 Análisis discriminante basado en regresión por mínimos cuadrados parciales DPLS**

##### **II.5.2.2 Análisis de componentes principales PCA**

#### **II.5.3 Análisis cuantitativos utilizados**

##### **II.5.3.1 Regresión por mínimos cuadrados parciales modificados MPLS**



## II.1 La alfalfa

La alfalfa es una planta herbácea perenne que pertenece a la familia de las leguminosas, subfamilia de las *Papilionoideas*, tribu de las *Trifolieas*. Tiene un amplio sistema radicular, con una raíz principal pivotante de gran robustez y numerosas raíces secundarias. La raíz principal alcanza profundidades de 2 a 5 m, describiéndose algunos casos en los que se puede alcanzar más de 9 m de profundidad. Este tipo de raíz permite llegar a cualquier reserva de nutrientes y soportar sequías extremas. Los tallos son robustos, dando un porte erecto a la planta que proporciona facilidad de segado. Los foliolos son aovados, dentados en el ápice. Aunque las primeras hojas verdaderas son unifoliadas, las hojas normales son trifoliadas. Los foliolos se presentan en formas más o menos alargadas y anchas. Las flores son grandes, de unos 8-10 mm de longitud y se presentan en racimos axiales, presentando una corola violácea o azul, con una forma típica de las *Papilionoideas*, presentando 5 pétalos y 5 sépalos. Los frutos son en legumbre anular o enrollada en espiral, albergando de 2 a 6 semillas de 1.5-2.5 mm arriñonadas y pequeñas<sup>1</sup>.

La alfalfa común, cuyo nombre científico es *Medicago sativa*, L., también se conoce por otros nombres como mielga o lucerna. Históricamente se fija su origen en el suroeste asiático, desde allí probablemente se extendió su cultivo a Grecia como consecuencia de las Guerras Médicas, se cree que fueron los griegos los que le acuñaron el nombre de *médica*. De Grecia esta planta pasaría a Italia y de allí a las distintas provincias del Imperio Romano; con la caída del mismo, el cultivo de alfalfa desaparece prácticamente en Europa, después fue reintroducida por los árabes a través de España, y desde aquí se produce la expansión al resto del mundo<sup>2</sup>.

Esta planta se adapta muy bien a condiciones climáticas variadas en lo que a temperatura y humedad se refiere, pero precisa de ciertas condiciones de suelo y de un cultivo apropiado. Dentro de estas condiciones edáficas se puede destacar la importancia del pH de suelo, el óptimo para el cultivo de la alfalfa está en 7.2, si bien tolera mejor la alcalinidad que la acidez. A valores de pH ácido se dificulta la

---

<sup>1</sup> Guerrero García, A.; *Cultivos herbáceos extensivos*. Ediciones Mundi-Prensa, 6ª Edición, Madrid, España (1999).

<sup>2</sup> Del Pozo Ibáñez, M.; *La alfalfa, su cultivo y aprovechamiento*. Ediciones Mundi-Prensa, 2ª Edición, Madrid, España (1983).

utilización del calcio, se puede favorecer la asimilación de metales pesados tóxicos y verse afectada la nodulación de la planta y, consecuentemente, la nutrición nitrogenada de la planta; ya que *Rhizobium meliloti*, bacteria nodulante de la alfalfa, no se reproduce a valores de pH por debajo de 5. Sin embargo, cuando este factor alcanza valores altos, la disponibilidad de ciertos elementos, tales como fósforo, hierro, manganeso, boro y cinc queda reducida, y en algunos casos pueden alcanzar límites inadecuados para la vida de la planta; la alcalinidad no limita severamente la implantación de la alfalfa a no ser que se complique con problemas de salinidad, la alfalfa en su periodo adulto es bastante tolerante con este factor, sin embargo en la germinación su tolerancia es menor que la de los cereales.

En terrenos de regadío, aumenta la productividad de cultivos posteriores por lo que se usa como acondicionador del suelo. Mientras que la mayoría de las plantas solamente utilizan el nitrógeno mineral, las leguminosas, y concretamente la alfalfa, son capaces de asimilar el nitrógeno atmosférico gracias a la simbiosis con ciertas bacterias radicícolas (*Rhizobium meliloti*) que lo transforman poniéndolo a su disposición. La carencia de nitrógeno en este tipo de plantas es poco frecuente y sólo ocurre cuando el medio que las rodea es poco apropiado para el desarrollo de las mencionadas bacterias. La favorable acción que ejercen las leguminosas sobre la fertilidad del suelo es consecuencia directa de la capacidad de estas plantas para fijar el nitrógeno atmosférico, gracias a la simbiosis alcanzada con bacterias del género *Rhizobium*. Estas bacterias se desarrollan en las células de las raíces formando colonias y son perfectamente detectables exteriormente como un abultamiento que recibe el nombre de nódulo<sup>1</sup>.

La alfalfa puede consumirse en forma fresca, henificada o deshidratada. Estos dos últimos procesos son los únicos de interés para la industria de piensos. La henificación es un secado natural que supone una mayor duración, más pérdidas de valor nutritivo (hoja, proteínas, vitaminas) y mayores riesgos de contaminación por tierra, además, la humedad (por lluvia o rocío) aumenta la contaminación microbiana. La deshidratación reduce al máximo estos problemas, dando lugar a un producto de mayor calidad. Los altos costes energéticos del proceso implican que una parte de la alfalfa comercializada como deshidratada en Europa haya sufrido un proceso previo de henificado, dando lugar a un producto de calidad intermedia. Las alfalfas pueden comercializarse en forma de



pacas, cubos o gránulos. La granulación favorece su manipulación, pero reduce su proporción de fibra efectiva.

Al igual que otras leguminosas, la alfalfa contiene factores antinutritivos. Los principales son las saponinas y los taninos solubles.

Las saponinas proporcionan un sabor amargo y tienden a formar jabones estables en disolución acuosa. La presencia de este tipo de compuestos en las plantas se relaciona con su poder protector frente a hongos e insectos fitófagos. Son especialmente tóxicas para animales de sangre fría (peces, caracoles, anfibios), también tienen un efecto negativo en ganado porcino y aves mientras que rumiantes y conejos presentan poca sensibilidad a estos compuestos.

Los taninos solubles se encuentran a niveles del 3-4% y reducen ligeramente la palatabilidad del producto y la digestibilidad de las proteínas en monogástricos.

La alfalfa contiene alrededor de un 50% de pared celular. La composición de la fibra es equilibrada, incluyendo por término medio un 8% de pectina, un 10% de hemicelulosas, un 25% de celulosa y un 7% de lignina. Esto, asegura un rápido tránsito digestivo, un aporte significativo de fibra soluble y una alta capacidad tampón. Esto unido a su elevada palatabilidad, hace a la alfalfa un ingrediente de elección en piensos de vacas de alta producción y de conejos. En ganado porcino su uso práctico se limita a cerdas gestantes, pues contribuye a reducir problemas de estreñimiento.

El aporte de proteína, lisina y treonina es significativo, siendo algo superior en la alfalfa deshidratada. Sin embargo, su utilización digestiva es limitada, incluso en rumiantes, por la elevada concentración de taninos. Alrededor de un 25% de la proteína bruta es nitrógeno no proteico, altamente soluble en el contenido ruminal. La degradabilidad de la proteína bruta es significativamente inferior en la alfalfa deshidratada que en el heno, por la mayor temperatura del procesado. El contenido de proteína bruta condiciona en gran medida su valor en el mercado. Cuanto más tierna se recoge, menor es la producción de alfalfa por ha, pero mayor es la calidad nutritiva, al aumentar la proporción de hojas sobre tallo. Se estima que la proteína bruta es un buen indicador de su valor energético, en el mercado español se comercializan alfalfas en un rango entre 12 y 18% en proteína bruta, y en las alfalfas de importación se pueden llegar a conseguir valores superiores al 20%.

La alfalfa es una buena fuente de macrominerales (calcio, fósforo, magnesio, potasio...) y de microminerales (cinc, hierro...) vitaminas (liposolubles, hidrosolubles) y pigmentos. El fósforo es de gran disponibilidad en monogástricos. El contenido en hierro depende de la contaminación del suelo y el de potasio depende de la fertilización del terreno. El contenido de xantofilas varía en función del proceso de secado.

Las alfalfas, especialmente las henificadas, exigen un control de calidad sistemático, ya que su valor nutritivo varía en función de la calidad de la materia prima inicial, las condiciones del proceso de conservación, recogida y almacenamiento (fermentación, contaminación bacteriana y fúngica) y de su adulteración con otros ingredientes (paja, cañote de maíz, urea y gallinaza entre otros). Las concentraciones de  $\beta$ -caroteno y xantofilas pueden utilizarse como indicativo del proceso de obtención y conservación del producto. En ocasiones, y sobre todo al final del invierno aparecen en el mercado alfalfas negruzcas que en los análisis de laboratorio suelen dar niveles muy bajos de proteína bruta y niveles normales o ligeramente altos de fibra bruta. Normalmente se debe a adulteraciones con productos fibrosos tipo cañote de maíz, hojas de olivo, orujos, etc, todos ellos más pobres en proteína y más ricos en lignina que la alfalfa original<sup>3</sup>.

La extensión en España en los últimos años alcanzó valores de unas 250000 ha y una producción de unos dos millones de toneladas, la mayoría de los cultivos en Aragón, Castilla y León y Cataluña se encuentran en régimen de regadío (75%), ya que la producción duplica la de secano. La alfalfa se sitúa como uno de los principales forrajes, lo que hace que el número de determinaciones necesarias se eleve considerablemente para conseguir un buen conocimiento del producto y poder así cubrir las necesidades que se puedan plantear dentro de la nutrición animal derivadas de la utilización de la misma<sup>1,3</sup>.

---

<sup>3</sup> De Blas, C., G. Mateos, G., G. Rebollar, P.; *Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la fabricación de piensos compuestos*. Fundación española para el desarrollo de la nutrición animal, 2ª Edición, Madrid, España (2003).

## II.2 Espectroscopía NIR

### II.2.1 Principios

El NIR es la región del espectro electromagnético comprendido entre 700 y 2500 nm. En la figura 1 se muestra su situación dentro del espectro electromagnético y la zona de trabajo (1100 a 2000 nm) cuando se utiliza la sonda de fibra óptica.

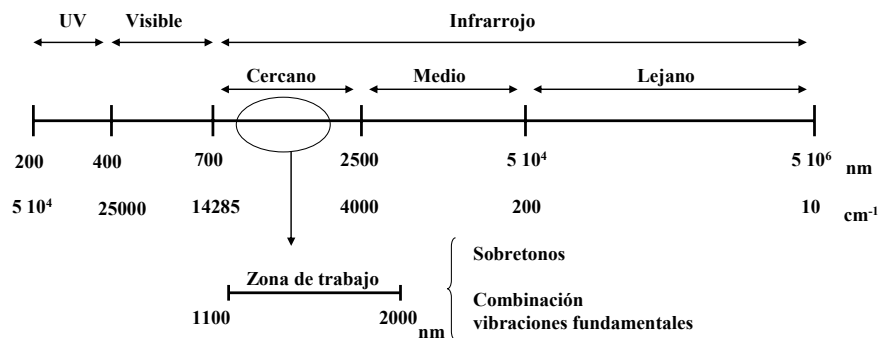


Figura 1. Situación de la zona NIR y zona de trabajo de la sonda de fibra óptica en el espectro electromagnético.

La región IR del espectro electromagnético se extiende desde 10 cm<sup>-1</sup> a 14285 cm<sup>-1</sup>, se divide esta zona instrumental y funcionalmente en: cercano, medio y lejano. La zona utilizada en este estudio es la del infrarrojo cercano, y más concretamente de 1100 nm a 2000 nm debido al uso de sonda de fibra óptica como veremos más adelante.

La radiación electromagnética, como es sabido, está formada por ondas que se propagan por el espacio a gran velocidad y están constituidos por campos eléctricos y magnéticos perpendiculares entre sí. Cuando una radiación monocromática incide sobre una muestra, la interacción entre la radiación electromagnética y la muestra puede ser muy diversa (absorción, transmisión y reflexión). En la región NIR es de interés la espectroscopía de absorbancia/transmisión, reflectancia y transreflectancia. Para la realización de este trabajo se utiliza la radiación reflejada; por tanto nos referiremos a la espectroscopía de reflectancia.

### ***Espectroscopía de reflectancia***

Este tipo de espectroscopía estudia la luz reflejada por la superficie de la muestra y puede ser de dos tipos: *especular* y *difusa*. Las medidas de reflectancia en condiciones normales contienen ambas componentes; la componente especular posee una escasa información sobre la composición y por tanto las medidas se realizan intentando minimizar el efecto de este componente, mientras que la componente difusa es la base de las medidas cuantitativas en NIR.

*Reflectancia especular:* predomina cuando el material sobre el que se produce la reflexión tiene altos valores de los coeficientes de absorción a la longitud de onda de la radiación incidente, cuando la penetración es muy pequeña en comparación con la longitud de onda y cuando las dimensiones de la superficie reflectante son mucho mayores que la longitud de onda.

La primera consecuencia de esto es que aunque la reflexión en cada superficie obedece a las leyes de Fresnel<sup>4</sup>, el efecto del grosor difumina el componente especular de la reflectancia. Para la mayoría de los materiales, excepto metales, alrededor del 4% de la radiación incidente sufre reflectancia especular y este nivel de fondo se superpone sobre la reflectancia difusa a efectos internos.

*Reflectancia difusa:* es la base de las medidas cuantitativas que se realizan en la espectroscopía NIR y tiene lugar en todas las direcciones de la superficie como consecuencia de los procesos de absorción, dispersión (*scattering*), que varían además con la forma, tamaño, grado de compactación...etc, de la muestra. Este tipo de reflectancia predomina cuando los materiales de la superficie reflectante son débilmente absorbentes a la longitud de onda incidente y cuando la penetración de la radiación es grande en relación con la longitud de onda como se puede observar en la figura 2.

---

<sup>4</sup> Beynon, J.; *Waves and optics*. MacMillan. College Work, Basingstoke, England (1990).

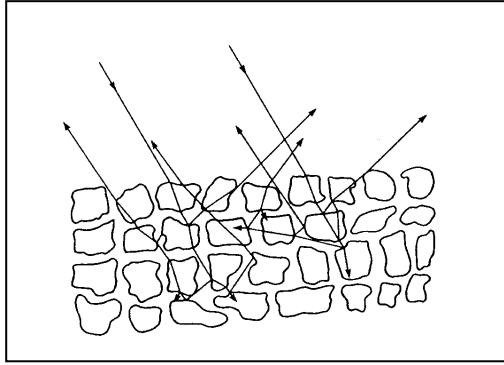


Figura 2. Representación del efecto de reflectancia difusa.

La teoría propuesta por Kubelka-Munk<sup>5</sup> explica la reflectancia difusa y tiene en cuenta una capa infinitamente gruesa de una muestra opaca, cuando la absorción es débil e ignora los efectos de la dispersión anómala. La reflectancia de una delgada capa homogénea viene dada por:

$$\frac{(1 - R_{\infty})^2}{2R_{\infty}} = \frac{K}{s} = f(R_{\infty})$$

donde,  $R_{\infty}$  es la reflectancia absoluta de la muestra. Esta reflectancia absoluta se define como la fracción de radiación incidente que es reflejada,  $K$  es el coeficiente de absorción de la muestra, y  $s$  es el coeficiente de dispersión. La reflectancia, por tanto, es función únicamente de la relación de dos constantes,  $K$  y  $s$  y no de sus valores absolutos.

En el análisis cuantitativo la ecuación de Kubelka-Munk puede escribirse en función de la concentración del analito absorbente, siendo  $\epsilon$  la absorptividad.

$$f(R_{\infty}) = \frac{(1 - R_{\infty})^2}{2R_{\infty}} = \frac{K}{s} = \frac{\ln 10 \cdot \epsilon \cdot c}{s}$$

Esta ecuación requiere medir la reflectancia absoluta  $R_{\infty}$ , y en la práctica se mide la reflectancia relativa  $R$ , que es la relación entre la intensidad de luz reflejada por la muestra y la de un estándar, como sulfato de bario u óxido de magnesio finamente pulverizado.

<sup>5</sup> Kubelka, P., Munk, F.; *Ein Beitrag zur Optik der Farbanstriche*. Zeitschrift für Technische Physik. **12**, 593 (1931).

$$\frac{R_{muestra}}{R_{estandar}} = R$$

Teniendo en cuenta esta consideración la ecuación de Kubelka-Munk puede escribirse de la siguiente manera:

$$f(R) = \frac{(1-R)^2}{2R} = \frac{c}{a}$$

donde  $a$  queda definida como:

$$a = \frac{s}{2.033\varepsilon}$$

Gráficamente la relación entre  $f(R)$  y  $c$ , es lineal y con pendiente  $1/a$ . En el caso de que la matriz tenga una absorción débil y regular o el analito correspondiente tenga bandas de absorción intensas, la relación deja de ser lineal.

Se acepta que la ecuación de Kubelka-Munk, como la ley de Beer, es una ecuación que sólo se puede aplicar a bandas débilmente absorbentes, caso de NIR, pero como no puede aislarse la absorción del analito de la matriz, que frecuentemente absorbe fuertemente a la misma longitud de onda que el analito, se producen desviaciones de la ecuación de Kubelka-Munk. Por ello en la práctica se aplica una relación alternativa y análoga a la ley de Beer, donde,  $R$  es la reflectancia relativa,  $a'$  es una constante y  $A$  es la absorbancia aparente.

$$A = \log \frac{1}{R} = a'c$$

A pesar de que esta relación no tiene las bases teóricas de la ecuación de Kubelka-Munk, proporciona resultados muy satisfactorios en las condiciones utilizadas en muchas aplicaciones prácticas de la espectrofotometría de reflectancia difusa.

### II.2.1.1 Interpretación de espectros en la región NIR

Para que se produzca absorción de la radiación infrarroja por la materia, la energía del fotón incidente debe tener la energía precisa para satisfacer los requerimientos energéticos de la sustancia material, ya que los niveles energéticos se encuentran cuantizados. Además debe producirse un acoplamiento entre la radiación y la materia; para ello, la molécula debe experimentar un cambio neto en el momento dipolar. Por ello, especies monoatómicas y homonucleares, como son He, Ne, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, Cl<sub>2</sub>...no absorben en el infrarrojo. Por otra parte, en los sólidos y en los líquidos, la rotación está muy restringida, por lo que en este tipo de muestras sólo tienen interés transiciones vibracionales. Al producirse un tránsito energético se dará la siguiente variación de energía:

$$\Delta E = h \nu$$

La frecuencia de vibración ( $\nu$ ) viene dada por la siguiente expresión:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

siendo  $k$  una constante de proporcionalidad que depende de las características de los enlaces químicos y  $\mu$  la masa reducida de los átomos implicados en un determinado enlace, de masas  $m_1$  y  $m_2$ , definida como:

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$$

Según la mecánica cuántica los osciladores no pueden tener cualquier valor de energía potencial, sino los permitidos por la relación:

$$E = \left( \nu + \frac{1}{2} \right) \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

siendo  $h$  la constante de Plank y  $\nu$  el número cuántico vibracional que puede tomar los valores: 0, 1, 2, 3.....

Para cualquier pareja de valores adyacentes, y puesto que  $v$  solo puede tomar valores enteros, tendremos que: para  $v = 0$ ;  $E_0 = (1/2) h \nu$  y para  $v = 1$ ;  $E_1 = (3/2) h \nu$ , podemos escribir la diferencia energética entre estos niveles como:

$$\Delta E = h \nu = \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

Según las reglas de selección, las únicas transiciones que pueden tener lugar son aquellas en el que el número cuántico vibracional cambie en una unidad,  $\Delta v = \pm 1$ . Por ello, dado que los niveles vibracionales están igualmente espaciados, para una vibración molecular determinada sólo tendría que observarse un pico de absorción.

Sin embargo, los enlaces reales, aunque elásticos, no se comportan exactamente como un oscilador armónico. Al aproximarse dos átomos, la repulsión coulombiana entre los núcleos produce una fuerza que actúa en la misma dirección que la fuerza restauradora del enlace, por lo que la energía potencial se eleva rápidamente. Por otra parte, cuando los átomos están muy alejados se produce una disminución de la fuerza restauradora y de energía potencial, originándose la disociación.

Por todo ello se toma el modelo del oscilador anarmónico, cuya energía viene dada por la siguiente expresión:

$$E = (v + 0.5) h \nu - (v + 0.5)^2 h \nu x - (v + 0.5)^3 h \nu x' - \dots$$

donde  $x$  y  $x'$ ...son constantes de anarmonicidad, que tienen valores pequeños positivos y de magnitud decreciente. Al aumentar  $v$ ,  $\Delta E$  se hace más pequeño. Además, otra consecuencia de la anarmonicidad es que la regla de selección cambia, observándose transiciones de  $\Delta v = \pm 2, \pm 3, \dots$ etc, lo que contribuye a los denominados sobretonos; además de la ya existente,  $\Delta v = \pm 1$  correspondiente a la transición fundamental (figura 3).



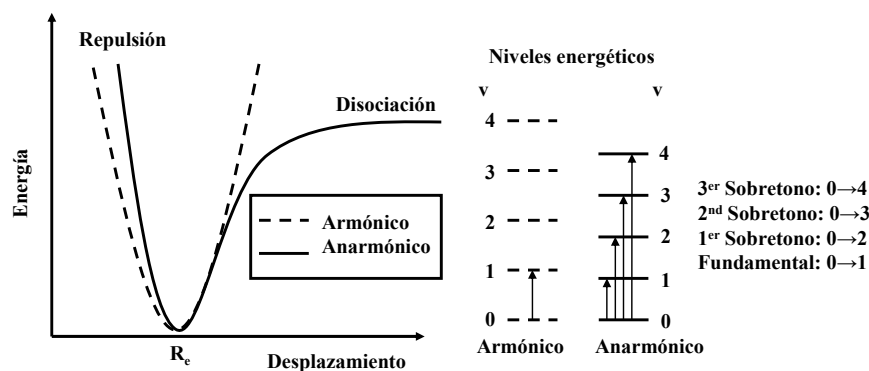


Figura 3. Diagrama de energía potencial y niveles energéticos. Osciladores armónico y anarmónico.

Las frecuencias de los sobretonos ocurren en la zona comprendida entre  $4000$  y  $14285 \text{ cm}^{-1}$ . Además de los sobretonos, son posibles bandas de combinación y diferencia, si dos o más vibraciones diferentes interactúan para originar bandas con frecuencias que son sumas o diferencias de las fundamentales.

$$v_{\text{comb}} = n_1 v_1 + n_2 v_2 + \dots, \text{ siendo } n_1, n_2 \dots \text{ números enteros.}$$

Los enlaces en los que están implicados los átomos de hidrógeno vibran con una gran amplitud cuando sufren tensión y, por lo tanto, esto provoca una desviación apreciable de la armonicidad. En consecuencia, casi todas las bandas de absorción observadas en el NIR proceden de sobretonos y bandas de combinación de vibraciones fundamentales que se producen en el MIR (infrarrojo medio), donde están implicados grupos H-Átomo, o combinaciones de vibraciones de tensión o flexión de tales grupos. Para el estudio de los espectros IR de muestras sólidas o líquidas sólo es necesario considerar los movimientos vibracionales debido a que la energía requerida para causar un cambio en estados rotacionales es mucho menor que para estados vibracionales y las bandas de absorción rotacional solo son observables para el caso de los gases.

Las transiciones entre niveles energéticos vibracionales que originan bandas en el NIR, como en el MIR, deben de originar un cambio en el momento dipolar. Las intensidades de los sobretonos y de las bandas de combinación en el NIR, crecen con la magnitud del cambio de momento dipolar y con el grado de anarmonicidad en el enlace; así, las vibraciones que implican átomos de hidrógeno son mas intensas que las de otros

átomos; la baja masa y las elevadas constantes de fuerza para enlaces en los que está implicado el hidrógeno son las responsables de que las vibraciones fundamentales de hidrógeno aparezcan a altas frecuencias y en consecuencia los primeros sobretonos aparezcan en la región NIR. Las transiciones en las diferentes regiones del IR se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Regiones características del Infrarrojo.

Región	Transiciones	Longitud de onda (nm)	Nº de ondas ( $\text{cm}^{-1}$ )
NIR	Sobretonos y Combinación	700-2500	14285-4000
IR	Vibraciones Fundamentales	$2500-5 \cdot 10^4$	4000-200
FIR	Rotaciones	$5 \cdot 10^4-10^6$	200-10

Por todo ello, un espectro típico correspondiente a la región NIR, es como el representado en la figura 4.

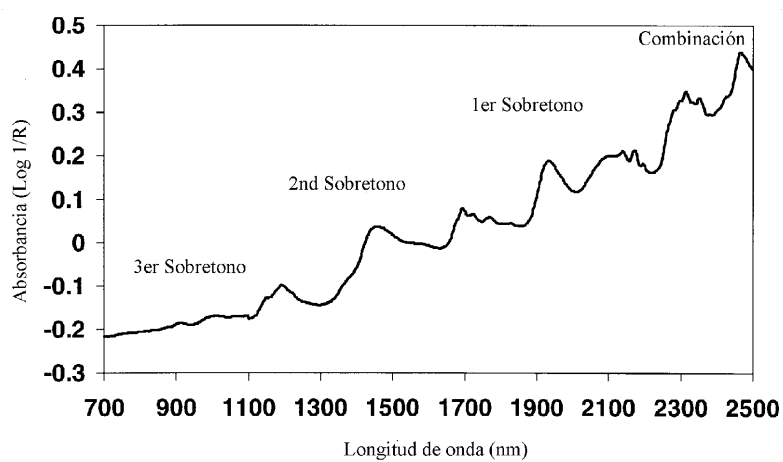


Figura 4. Espectro NIR.

Se observa que las bandas de combinación presentan intensidades más elevadas que los sobretonos y que las intensidades de las bandas de los sobretonos disminuyen cuando crece el número de tono en un factor de aproximadamente 10.

Los grupos funcionales más importantes que presentan absorciones en esta zona del espectro son:

- Las bandas de alargamiento de los grupos O-H, N-H, S-H, y P-H, tienen absorciones fuertes en el NIR, mientras que las bandas de los grupos C=O, C-C, C-F, y C-Cl están generalmente ausentes.
- La extensión de grupos R-H o tensión/flexión de estos mismos grupos, forma la mayoría de las bandas NIR.

Las bandas de NIR son muy anchas, con lo que los espectros se encontrarán muy solapados, por lo general no se suele utilizar la correlación de las longitudes de onda con el espectro de la molécula en cuestión. Las principales asignaciones químicas de estas bandas se muestran en la figura 5.

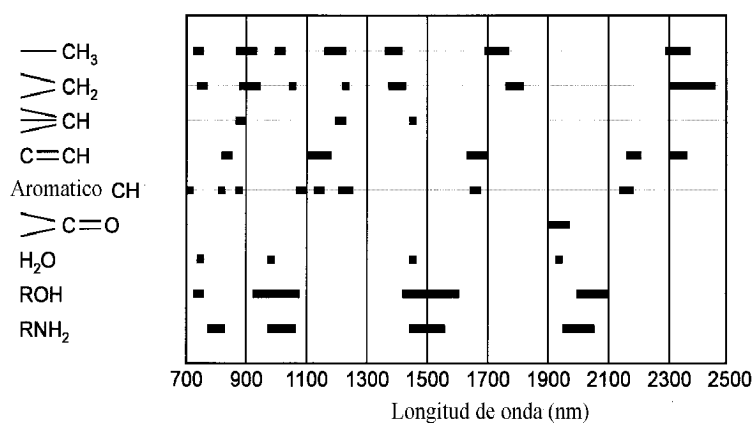


Figura 5. Asignación de bandas de grupos funcionales en la región NIR.

En el análisis de cualquier sustancia, y en especial de los alimentos frescos, hay que tener en cuenta las absorciones que produce la molécula de agua, ya que pueden interferir en la señal y, por tanto, en la cuantificación del producto. Las longitudes de onda en las que el agua absorbe se conocen con gran exactitud y son las que se muestran en la tabla 2 y en la figura 6.

Tabla 2. Características de absorción NIR del agua.

$\lambda$ (nm)	Absorción Molar (L/mol cm)	Banda
760	$4.69 \cdot 10^{-4}$	3 <sup>er</sup> Sobretono
970	$8.31 \cdot 10^{-3}$	2 <sup>o</sup> Sobretono
1190	$1.90 \cdot 10^{-2}$	Combinación
1450	0.469	1 <sup>er</sup> Sobretono
1940	2.06	Combinación

Se observa que la bandas a  $\lambda = 1940$  nm y  $\lambda = 1450$  nm presentan unas absorciones molares elevadas en la zona NIR, lo que indica que el agua es un mal disolvente para estudios en NIR, ya que estas bandas puede causar saturación en los detectores e interferir de forma considerable al poder enmascarar fuertemente las absorciones debidas a otros analitos. Por otra parte, cuando el agua forma parte de la matriz, la modificación de estas bandas da oportunidad de medida a analitos que cambian la posición y la forma de las mismas, como pH y metales al poder formar acuocomplejos con la misma<sup>6</sup>.

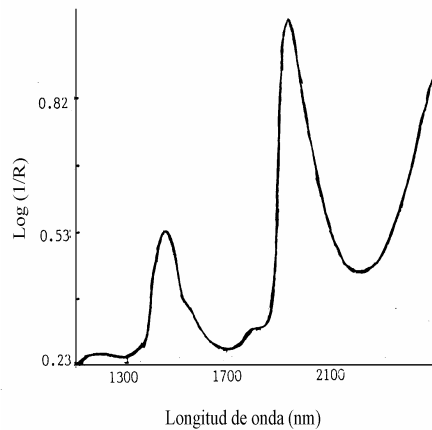


Figura 6. Espectro NIR del agua.

<sup>6</sup> Murray, I.; *Scattered information: philosophy and practice of near infrared spectroscopy*. Davies A.M.C., Garrido-Varo, A (Eds.). Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 11<sup>th</sup> International Conference. NIR Publications, Chichester, England (2004).

## II.2.2 Instrumentación

Los componentes básicos de un equipo NIRS son el sistema óptico y el módulo de muestra así como el software necesario para el procesado de los resultados obtenidos y su posterior tratamiento. Dentro de las diferentes modalidades de medida, como pueden ser la reflectancia, transmitancia, transflectancia, nos centraremos en la reflectancia y más concretamente utilizando como módulo de muestra una sonda de fibra óptica, ya que ha sido la modalidad utilizada en todo el trabajo. En la figura 7 se muestra un esquema del sistema en el que se pueden distinguir los componentes que lo integran:

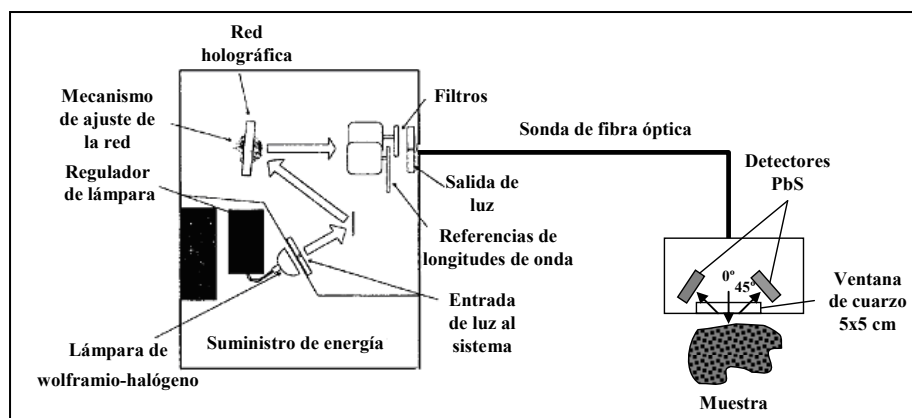


Figura 7. Esquema de un equipo NIRS con sonda de fibra óptica.

*Fuente de radiación:* se trata de una fuente térmica, es dependiente de la temperatura, ya que la radiación se produce por el calentamiento de un filamento. Se emplea una lámpara de wolframio-halógeno de alta temperatura, el filamento de wolframio se encuentra en una célula de cuarzo que soporta altas temperaturas, la atmósfera de gas halógeno favorece que el wolframio vaporizado regrese al filamento alargando así la vida útil de la lámpara. Esta fuente, de elevada intensidad de emisión, proporciona una radiación continua en la zona NIR<sup>7,8</sup>.

<sup>7</sup> Blanco, M., Villarroja, I.; *NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool*. TrAC Trends in Analytical Chemistry. **21**, 240 (2002).

<sup>8</sup> Stark, E., Luchter, K.; *Diversity in NIR instrumentation*. Davies A.M.C., Garrido-Varo, A (Eds.). Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 11<sup>th</sup> International Conference. NIR Publications, Chichester, England (2004).

*Redes holográficas:* la radiación generada en la lámpara se dirige mediante un espejo a una red holográfica cóncava que dispersa la luz blanca incoherente en longitudes de onda individuales transformándola en luz coherente, es decir, tiene la misma frecuencia, amplitud y fase o una diferencia constante de esta; al mover esta red se cambia el ángulo de posición respecto al haz incidente recorriendo de esta manera todo el espectro NIR. Este tipo de sistema de selección de longitud de onda se encuadra dentro de los sistemas dispersivos<sup>7,8</sup>.

*Filtros:* la red holográfica proporciona un espectro disperso en que junto a las líneas de primer orden (las más intensas), aparecen líneas de órdenes superiores, estas deben eliminarse mediante filtros, los cuales están montados en un soporte cuyas posiciones están controladas por un motor y a la vez, perfectamente sincronizado con la red holográfica<sup>9</sup>.

*Referencia de longitudes de onda:* la calibración de longitudes de onda se realiza por medida respecto a un estándar interno, se utiliza el poliestireno, observándose picos a las siguientes longitudes de onda:  $\lambda = 1143.63$  nm,  $\lambda = 1680.90$  nm,  $\lambda = 2166.72$  nm,  $\lambda = 2306.10$  nm. En el caso de utilizar la sonda de fibra óptica para la zona de 1100-2000 nm, como es el caso, el pico  $\lambda = 2306.10$  nm no se utiliza, debido a la atenuación de la fibra óptica<sup>9</sup>.

*Detector de reflectancia:* recibe la radiación de dispersión difusa de la superficie de la muestra. Los elementos del detector están colocados a 45° de la superficie de la muestra para intentar minimizar la reflectancia especular. Un detector típico de reflectancia consta de 4 detectores de PbS para la zona de 1100-2500 nm. El PbS es un material fotoeléctrico y semiconductor que a temperatura ambiente presenta una sensibilidad adecuada en esta región<sup>7,9</sup>.

*Sonda de fibra óptica:* se trata de una sonda de tipo Bundle (haz) regular 210/210, para la aplicación directa sobre las muestras; la sonda tiene una ventana de cuarzo de 5 cm x 5 cm. Consta de un detector de reflectancia que ha sido mencionado anteriormente y usa como referencia una placa cerámica. La sonda se une al equipo mediante una conexión de 1.5 metros de fibra óptica, como se muestra en la figura 7. El uso de este

---

<sup>9</sup> Your NIRSystems instruments performance test guide. Foss NIRSystems, Inc., Silver Spring, MD, USA (1999).

tipo de sondas limita el rango espectral en el que se pueden realizar las medidas, en este caso la zona óptima se encuentra en 1100-2000 nm, ya que por encima 2000 nm se producen importantes atenuaciones de la señal debido principalmente a la fuerte absorción de grupos –OH que pueden estar presente en la fibra óptica<sup>8,9</sup>.

*Software:* el software utilizado por el NIRSystem 5000 es el programa WinISI versión 1.50. Este programa se utiliza en la adquisición de datos y en el tratamiento de los mismos<sup>10</sup>.

### II.2.2.1 Estandarización del equipo NIR

Previamente al registro de las muestras, el equipo NIR debe ser estandarizado. En este trabajo todas los registros fueron realizados en reflectancia con sonda de fibra óptica, por ello la estandarización solo se referirá a este modo de medida<sup>9</sup>.

*Test de diagnóstico:* su objeto es evaluar la respuesta del instrumento, la precisión de la longitud de onda y el ruido.

- *Respuesta del instrumento:* el test se basa en una medida de reflectancia absoluta de un plato de cerámica, conocido como cerámica Coors y que es aproximadamente el 80% reflectiva, un test de lámpara y comprobación de la actuación de los detectores.
- *Precisión de la longitud de onda:* se basa en la medida de alineación de la longitud de onda del instrumento usando como referencia poliestireno, a  $\lambda=1143.63$  nm,  $\lambda=1680.90$  nm y  $\lambda=2166.72$  nm, alineando el instrumento.
- *Ruido:* da una medida de la precisión del dato óptico a cada longitud de onda. Para obtener el test de ruido, se realizan 32 barridos de la cerámica constituyendo así el espectro de referencia. Otros 32 barridos constituyen el espectro de muestra. El valor de Log 1/R se calcula, restándose una de otro. La diferencia obtenida será el espectro de ruido. El espectro del ruido se utiliza para diagnosticar otras perturbaciones como: fallos en la lámpara, excesiva temperatura ambiente, variaciones en la humedad ambiente y problemas instrumentales mecánicos. El ruido fotométrico es

---

<sup>10</sup> WinISI II, v. 1.50. Infrasoftware International, LLC, Port. Matilda, PA, USA (2000).

medido por escaneado del material de referencia dos veces, primero como referencia y después como muestra. El test se repite 20 veces consecutivas y el resultado se da como media.

Una vez pasados los test se puede comenzar los registros de las diferentes muestras.

### II.3 Ventajas e inconvenientes de la espectroscopía NIR

La espectroscopía NIR posee ciertas ventajas e inconvenientes<sup>7</sup>, que se debe conocer, a continuación se enumerarán algunos de ellos.

*Ventajas:*

- Se trata de una técnica analítica no destructiva.
- Rapidez de análisis, ya que se requiere escasa o nula preparación de muestra, además no se generan subproductos y no es necesario utilizar disolventes contaminantes. La utilización de sondas de fibra óptica aumenta aún más la velocidad de medida.
- La muestra puede estar tanto en forma sólida como líquida o pastosa lo que incrementa las posibilidades de aplicación.
- Multiparamétrica, determinación de varios parámetros simultáneamente.
- Proporciona información sobre la naturaleza física y química de la muestra. Además puede determinar parámetros globales que no están relacionados con un único componente.
- En muchos casos, la exactitud de esta técnica es comparable a otras técnicas analíticas, y su precisión, en numerosas ocasiones, es mayor que en otras técnicas ya que no existe tratamiento de muestra.
- El coste de análisis por muestra es bajo, debido en gran parte a la ausencia de tratamiento de muestra, a la velocidad de medida y a la facilidad de uso en rutina.



*Inconvenientes:*

- Las bandas son muy anchas y se superponen, y normalmente no es posible la identificación por observación visual del espectro por falta de selectividad en la medida, esto se puede complicar aún más en el caso de los componentes minoritarios por la falta de sensibilidad.
- La señal obtenida es tan compleja que las bandas del espectro son de difícil interpretación, por lo que se hace necesario el uso de la quimiometría junto con diferentes pretratamientos espectrales.
- El desarrollo de los modelos para una posterior utilización sobre muestras desconocidas es lento, ya que se debe elaborar un grupo de calibración robusto, y obtener un valor de referencia mediante el empleo de métodos analíticos de referencia. En estos grupos de calibración se debe de recoger tanto la variabilidad física como la química que se pudiese dar en las muestras.
- Dificultad en la transferencia de calibraciones entre diferentes instrumentos.
- El coste de un equipo NIR es elevado, su puesta a punto es laboriosa y requiere de una inversión inicial considerable.

**II.4 Antecedentes bibliográficos**

Aunque las primeras medidas realizadas en el infrarrojo cercano (NIR) datan de comienzos del siglo XIX, los primeros trabajos publicados con contenido analítico tuvieron lugar hacia 1960. En ellos, se describía la determinación cuantitativa de agua en distintos productos, así como de algunos compuestos orgánicos<sup>11,12</sup> con grupos funcionales -OH, -NH, -CH.

En esa época se llevaron a cabo toda una serie de estudios en el infrarrojo cercano y en la zona visible, utilizando medidas de transmitancia y reflectancia. Los resultados

---

<sup>11</sup> Herschel, W.; *Experiments on the refrangibility of the invisible rays of the sun*. Philosophical Transactions of the Royal Society. **90**, 284 (1800).

<sup>12</sup> Kaye, W.; *Near infrared spectroscopy*, in The Encyclopedia of Spectroscopy, Clark G.L (Eds.).Reinhold, New York, USA (1960).

más prometedores se obtuvieron operando en esta última modalidad, haciendo posible la detección y determinación de ciertos parámetros en muestras opacas<sup>13</sup>.

El interés por la técnica se extendió durante la década de los 60<sup>14,15</sup> como consecuencia de los avances producidos en la instrumentación, unido al desarrollo de las técnicas quimiométricas para el tratamiento de datos<sup>16,17,18</sup>. Desde entonces la técnica NIR ha evolucionado enormemente, demostrando ser un método analítico, rápido, fiable y con un coste de mantenimiento bajo; esto ha contribuido a que su uso se haya extendido en las dos últimas décadas y que actualmente sea un método rutinario, tanto a nivel cualitativo como a nivel cuantitativo, para realizar controles de calidad en muy diversos productos<sup>19</sup>.

En su vasto campo de aplicación para la resolución de todo tipo de problemas quedan incluidos desde cereales, uno de sus pilares históricos, hasta el seguimiento de procesos biológicos y el análisis de piezas de arte de valor excepcional, uno de sus últimos logros, pasando por un amplio rango de aspectos relacionados con la agricultura, la industria, la alimentación, la ecología y el medio ambiente<sup>20,21,22,23,24</sup>.

---

<sup>13</sup> Norris, K. H., Butler, W.L.; *Techniques for obtaining absorption spectra on intact biological samples*, IRE Transaction on Biomedical Electronics. **8**, 153 (1961).

<sup>14</sup> Ben-Gera, I., Norris, K. H.; *Direct spectrophotometric determination of fat and moisture in meat products*; Journal of Food Science. **33**, 64 (1968).

<sup>15</sup> Ben-Gera, I., Norris, K. H.; *Determination of moisture content in soybeans by direct spectrophotometry*; Israel Journal of Agricultural Research. **18**, 177 (1968).

<sup>16</sup> Savitzky, A., Golay, M.J.E.; *Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedure*; Analytical Chemistry. **36**, 1627 (1964).

<sup>17</sup> Draper, N., Smith, H.; *Applied regression analysis*; John Wiley, New York, USA. (1966).

<sup>18</sup> Snedecor, G.W., Cochran, W.G.; *Statistical methods*. 6<sup>th</sup> ed. *Validation of regression models: Methods and examples*; Technometrics. **19**, 415 (1968).

<sup>19</sup> Osborne, B.G., Fearn, T.; *Near infrared spectroscopy in food analysis*; (2<sup>nd</sup> Ed.); Longman Scientific & Technical, Harlow, England (1986).

<sup>20</sup> Murray, I., Cowe, I.; *Making light work: advances in near infrared spectroscopy*; VCH., London, England (1992).

<sup>21</sup> Hildrum, K.I., Isaksson, T., Naes, T., Andenberg, A.; *Bringing the gap between data analysis and applications*; Ellis Horwood, N.Y., USA (1992).

<sup>22</sup> Davies, A.M.C., Williams, Ph.; *Near infrared spectroscopy: the future waves*. NIR Publications, Chichester, England (1996).

<sup>23</sup> Davies, A.M.C., Giangiacomo, R.; *Near infrared spectroscopy*: Proceeding of the 9<sup>th</sup> International NIR Conference; Publications, Chichester, England (2000).

<sup>24</sup> Shenk, J.S., Workman, J.J., Westerhaus, M.; *Applications of NIR spectroscopy to agricultural products*; *Handbook of near infrared analysis*; Burns, D.A., Ciurczak, E.; (Eds). Marcel Dekker, New York, USA (2001).

El uso de la espectroscopía en el infrarrojo cercano, tal y como es entendido en la actualidad, es una síntesis de espectroscopía, estadística, quimiometría e instrumentación, su desarrollo y evolución han sido paralelos a los avances registrados en dichos campos<sup>24,25,26,27</sup>. Estos avances han permitido desarrollar nuevos métodos en campos como el textil<sup>28,29,30</sup>, combustibles<sup>31</sup>, biomedicina<sup>32</sup>, agrícola<sup>33</sup>, alimentario<sup>34,35</sup>, químico<sup>36</sup> y farmacéutico<sup>22,37,38,39</sup>.

<sup>25</sup> Kaffka, K., Giarmati, L.S.; *Leaping ahead with near infrared technology*. Batten, G.D. et al. (Eds.). Royal Australia Chemical Institute, Melbourne, Australia (1995).

<sup>26</sup> Stark, E.; *Near infrared spectroscopy: the future waves*. Davies, A.M.C., Williams, P.C. (Eds.). NIR Publication, Chichester, England (1996).

<sup>27</sup> Geladi, P.; *Near infrared spectroscopy: the future waves*. Davies, A. M. C., Williams, P.C. (Eds.). NIR Publication Chichester, England (1996).

<sup>28</sup> Blanco, M., Coello, J., Iturriaga, H., Maspocho, S., Pages, J.; *Use of near-infrared spectrometry in control analyses of acrylic fibre manufacturing processes*. *Analytica Chimica Acta*. **383**, 291 (1999).

<sup>29</sup> Cleve, E., Bach, E., Schollmeyer, E.; *Using chemometric methods and NIR spectrophotometry in the textile industry*. *Analytica Chimica Acta*. **420**, 163 (2000).

<sup>30</sup> Durand, A., Devos, O., Ruckebusch, C., Huvenne, J. P.; *Genetic algorithm optimisation combined with partial least squares regression and mutual information variable selection procedures in near-infrared quantitative analysis of cotton-viscose textiles*. *Analytica Chimica Acta*. **595**, 72 (2007).

<sup>31</sup> Fernanda Pimentel, M., Ribeiro, G. M. G. S., da Cruz, R. S., Stragevitch, L., Pacheco Filho, J. G. A., Teixeira, L. S. G.; *Determination of biodiesel content when blended with mineral diesel fuel using infrared spectroscopy and multivariate calibration*. *Microchemical Journal*. **82**, 201 (2006).

<sup>32</sup> Widjaja, E., Zheng, W., Huang, Z. W.; *Classification of colonic tissues using near-infrared Raman spectroscopy and support vector machines*. *International Journal of Oncology*. **32**, 653 (2008).

<sup>33</sup> Viscarra Rossel, R. A., Walvoort, D. J. J., McBratney, A. B., Janik, L. J., Skjemstad, J. O.; *Visible, near infrared, mid infrared or combined diffuse reflectance spectroscopy for simultaneous assessment of various soil properties*. *Geoderma*. **131**, 59 (2006).

<sup>34</sup> Huang, H.; Yu, H.; Xu, H., Ying, Y.; *Near infrared spectroscopy for on/in-line monitoring of quality in foods and beverages: a review*. *Journal of Food Engineering*. **87**, 303 (2008).

<sup>35</sup> McClure, W. F.; *204 years of near infrared technology: 1800-2003*. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. **11**, 487 (2003).

<sup>36</sup> Blanco, M., Villaescusa, V.; *Use of NIR spectroscopy in the production of modified industrial resins*. *Talanta*, **71**, 1333 (2007).

<sup>37</sup> Roggo, Y., Chalus, P., Maurer, L., Lema-Martinez, C.; Edmond, A., Jent, N.; *A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **44**, 683 (2007).

<sup>38</sup> Azzouz, T., Tauler, R.; *Application of multivariate curve resolution alternating least squares (MCR-ALS) to the quantitative analysis of pharmaceutical and agricultural samples*. *Talanta*. **74**, 1201 (2008).

<sup>39</sup> Blanco, M., Bautista, M., Alcalá, M.; *Preparing calibration sets for use in pharmaceutical analysis by NIR spectroscopy*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **97**, 1236 (2008).

La proteína bruta y la humedad son dos parámetros que han sido evaluados mediante esta técnica en forrajes<sup>40,41,42</sup>, estos dos parámetros siguen siendo de un gran interés en campo de la agricultura y la nutrición animal<sup>43,44,45,46,47,48,49,50</sup>. La medida de estos parámetros se realiza habitualmente en NIR de forma convencional (contenedores de muestra), lo que implica un aumento del tiempo de análisis; sin embargo el uso de sondas de fibra óptica de reflectancia remota es menos frecuente<sup>51</sup>.

Se tiene constancia de la utilización de nitrógeno no proteico con objeto de elevar el valor del parámetro proteína bruta y así obtener un mayor rendimiento económico en el mercado<sup>3</sup>, si bien la eficiencia de este nitrógeno no proteico en la nutrición animal se sitúa entorno a un 60-70% comparado con el proveniente de fuente natural<sup>52</sup>. La

<sup>40</sup> Norris, K.H., Barnes, R.F., Moore, J.E., Shenk, J.S.; *Predicting forage quality by infrared reflectance spectroscopy*. Journal of Animal Science. **43**, 889 (1976).

<sup>41</sup> Abrams, S. M., Shenk J. S., Westernhaus M. O, Barton F. E.; *Determination of forage quality by near infrared reflectance spectroscopy: efficacy of broad-based calibration equations*. Journal of Dairy Science. **70**, 806 (1987).

<sup>42</sup> Park, R. S.; Agnew, R. E.; Gordon, F. J.; Steen, R. W. J.; *The use of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) on undried samples of grass silage to predict chemical composition and digestibility parameters*. Animal Feed Science and Technology. **72**, 155 (1998).

<sup>43</sup> García-Ciudad, A., Ruano, A., Becerro, F., Zabalgogazcoa, I., Vázquez de Aldana, B. R., García-Criado, B.; *Assessment of the potential of NIR spectroscopy for the estimation of nitrogen content in grasses from semi-arid grasslands*. Animal Feed Science and Technology. **77**, 91 (1999).

<sup>44</sup> Ruisanchez, I., Rius, F. X., Maspoch, S., Coello, J., Azzouz, T., Tauler, R., Sarabia, L., Ortiz, M. C., Fernandez, J. A., Massart, D., Puigdomenech, A., Garcia, C.; *Preliminary results of an interlaboratory study of chemometric software and methods on NIR data. Predicting the content of crude protein and water in forages*. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems. **63**, 93 (2002).

<sup>45</sup> Azzouz, T., Puigdomenech, A., Aragay, M., Tauler, R.; *Comparison between different data pre-treatment methods in the analysis of forage samples using near-infrared diffuse reflectance spectroscopy and partial least-squares multivariate calibration method*. Analytica Chimica Acta. **484**, 121 (2003).

<sup>46</sup> Stuth, J.; Jama, A.; Tolleson, D.; *Direct and indirect means of predicting forage quality through near infrared reflectance spectroscopy*. Field Crops Research. **84**, 45 (2003).

<sup>47</sup> Andres, S., Murray, I., Calleja, A., Giraldez, F. J.; *Nutritive evaluation of forages by near infrared reflectance spectroscopy*. Journal of Near Infrared Spectroscopy, **13**, 301 (2005).

<sup>48</sup> Ohlsson, C., Houm, Iler, L. P., Weisbjerg, M. R., Lund, P., Hvelplund, T.; *Effective rumen degradation of dry matter, crude protein and neutral detergent fibre in forage determined by near infrared reflectance spectroscopy*. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. **91**, 498 (2007).

<sup>49</sup> Chen, P.F., Rong, Y.P., Han, J.G., Wang, J.H., Zhang, L.D., Xu, X.J.; *Evaluation of fresh sample of alfalfa silage through near infrared reflectance Spectroscopy (NIRS)*. Spectroscopy and Spectral Analysis. **27**, 1304 (2007).

<sup>50</sup> Azzouz, T., Tauler, R.; *Application of multivariate curve resolution alternating least squares (MCR-ALS) to the quantitative analysis of pharmaceutical and agricultural samples*. Talanta, **74**, 1201 (2008).

<sup>51</sup> Petisco, C., García-Criado, B., García-Criado, L., Vázquez-de-Aldana, B.R., García-Ciudad, A.; *Quantitative analysis of chlorophyll and protein in alfalfa leaves using fibre-optic NIR spectroscopy*: Abstract of the NIR 2007. Spreading the light conference., Umea, Sweden (2007).

<sup>52</sup> National Research Council. *Urea and other non protein nitrogen compounds in animal nutrition*. National Academies Press, Washington, DC, USA (1976).

legislación de la Unión Europea<sup>53</sup>, regula los alimentos del ganado y los procedimientos de seguridad alimentaria que deben cumplir, dicha legislación controla el contenido de la urea y sus derivados considerados como aditivos para la alimentación animal. Los compuestos que aportan nitrógeno no proteico, como amoníaco, urea, biuret, gallinaza, pueden utilizarse en los forrajes en cierta cuantía como sustituto de la proteína en los rumiantes, bien sea para engorde o producción lechera. En producción animal, la urea<sup>54,55</sup> es el exponente de nitrógeno no proteico más conocido y más utilizado debido a su fácil obtención y bajo costo; es un compuesto con un contenido aproximado del 46% de nitrógeno, por lo tanto, 100 g de urea representan 287.5 g de proteína bruta para el animal. Se recomienda no incluir más del 1% de urea en la ración de rumiantes, o hasta el 25% del total de la proteína para evitar intoxicación por exceso de amoníaco en el rumen<sup>56</sup>; aunque se encuentran trabajos con niveles de incorporación de aproximadamente 3% sin que aparezcan síntomas de toxicidad<sup>57,58</sup>. La urea se suministra a la alfalfa en el ensilado, para este fin se pueden agregar entre 5 y 6 kg de urea (0.5% sobre base húmeda) por tonelada de material en el momento de llenar el silo, este procedimiento se utiliza también con el resto de los aditivos. El biuret se produce a partir de la urea por calentamiento, y contiene un 41% de nitrógeno (256 g de proteína bruta), a pesar de ser menos tóxico, es más caro y hace falta un período de adaptación, de dos semanas a dos meses, antes que se obtenga una respuesta<sup>59,60,61</sup>. La gallinaza,

---

<sup>53</sup> Comisión Europea. *Reglamento (CE) n° 1831/2003 del parlamento europeo y del consejo de 22 de septiembre de 2003 sobre los aditivos en la alimentación animal*. Diario Oficial de la Unión Europea. **L 268**, 29 (2003).

<sup>54</sup> Jarrige, R.; (Ed.). *Alimentation des bovins, ovins et caprins*. Institut de la Recherche Agronomique. Paris, France (1988).

<sup>55</sup> Agricultural Research and Food Council. *Nutritive requirements of ruminant animals: protein*. Nutrition Abstracts and Reviews. Series B. **62**, 787 (1992).

<sup>56</sup> Adamu, A. M., Russel J. R., McGilliard A. D., Trenkle A.; *Effects of added dietary urea on the utilization of maize stover silage by growing beef cattle*. Animal Feed Science and Technology. **22**, 227 (1989).

<sup>57</sup> Broderick G.A., Craig W. M., Ricker D.B.; *Use of nitrogen from ammoniated alfalfa hay, urea, soybean meal, and animal protein meal by lactating cows*. Journal of Dairy Science. **76**, 2266 (1993).

<sup>58</sup> Lines L., Weiss W.; *Use of nitrogen from ammoniated alfalfa hay, urea, soybean meal, and animal protein meal by lactating cows*. Journal of Dairy Science. **79**, 1992 (1996).

<sup>59</sup> Vanzant, E.S, Cochran, R.C; *Performance and forage utilization by beef cattle receiving increasing amounts of alfalfa hay as a supplement to low-quality, tall grass-prairie forage*. Journal of Animal Science. **72**, 1059 (1994).

<sup>60</sup> National Research Council. *Nutrient requirements of beef cattle*. Seventh edition, National Academy of Sciences, Washington D.C., USA. (1996).

<sup>61</sup> Loest, C. A., Titgemeyer, E. C., Drouillard, J. S., Lambert, B. D., Trater, A. M.; *Urea and biuret as nonprotein nitrogen sources in cooked molasses blocks for steers fed prairie hay*. Animal Feed Science and Technology. **94**, 115 (2001).

residuo aviar, tratado adecuadamente pueden ser utilizados como fuente de nutrientes (proteínas, grasas, minerales, etc) en la alimentación animal; en el caso de las alfalfa se añaden como excretas secas teniendo en cuenta los riesgos de una posible contaminación de bacterias y/o hongos, del exceso de minerales como el cobre y la posible presencia de medicamentos. Esto hace que el uso de la gallinaza se convierta en una amplia tarea para que sea confiable<sup>62</sup>. La gallinaza contiene N total con un valor medio en las excretas secas de 19.3 mg/g, dependiendo del alimento que ingieran las aves; se utiliza como suplemento proteico en forrajes, como la alfalfa para rumiantes<sup>60,63,64,65</sup> y por el contenido en P como fuente mineral<sup>66</sup>. Los antecedentes bibliográficos anteriores describen los efectos sobre los animales y la determinación de los contenidos de N, P, fibra, materia seca, energía metabolizable, etc mediante métodos químicos húmedos de referencia cuando se añaden los aditivos que aportan nitrógeno no proteico a forrajes y alfalfa.

En el caso de la composición mineral, la determinación mediante espectroscopía NIR se puede realizar debido a su asociación bien sea a moléculas orgánicas o inorgánicas, especialmente acuocomplejos<sup>67,68,69,70</sup>. Algunas de las asociaciones de elementos como Ca con pectinas<sup>71</sup>, P formando parte de fitatos solubles e insolubles, fosfolípidos, fosfoproteínas y ácidos nucleicos<sup>72</sup>, Mg asociado a la clorofila<sup>72</sup> o K a ácidos orgánicos como el málico<sup>68</sup>, pueden ser ejemplo de las formas en las que

---

<sup>62</sup> Webb, K.E., Fontenot, J. P.; *Medicinal drug residues in broiler litter and tissues from cattle fed litter*. Journal of Animal Science. **41**, 1212 (1975).

<sup>63</sup> Fontenot, J. P., Webb K.E. Jr.; *Poultry wastes as feedstuffs for ruminants*. American Societies for Experimental Biology. **33**, 1936 (1974).

<sup>64</sup> Thakur, J.P., Srivastava, A.K., Verma Gupta B.S.; *Note on utilization of poultry excreta as a protein source in diets of growing lambs and kids*. Indian Journal of Animal Science. **52**, 1260 (1982).

<sup>65</sup> Murthy, K. S., Reddy, M. R., Reddy, G. V. N.; *Utilization of cage layer droppings and poultry litter as feed supplements for lambs and kids*. Small Ruminant Research. **16**, 221 (1995).

<sup>66</sup> Barnett G. M.; *Phosphorus forms in animal manure*. Bioresource Technology. **49**, 139. (1994).

<sup>67</sup> Shenk, J.S., Westerhaus, M.O., Hoover, M.R.; *Analysis of forages by infrared reflectance*. Journal of Dairy Science. **62**, 807 (1979).

<sup>68</sup> Clark, D.H., Cary, E.E., Mayland, H.F.; *Mineral analysis of forages with near infrared reflectance spectroscopy*. Agronomy Journal. **79**, 485 (1987).

<sup>69</sup> Clark, D.H., Cary, E.E., Mayland, H.F.; *Analysis of trace elements in forages by near infrared reflectance spectroscopy*. Agronomy Journal. **81**, 91 (1989).

<sup>70</sup> Givens, D.I., Deaville, E.R.; *The current and future role of near infrared reflectance spectroscopy in animal nutrition: a review*. Australian Journal of Agricultural Research. **50**, 1131(1999).

<sup>71</sup> Carpita, N.C., Gibeaut, D.M.; *Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth*. The Plant Journal. **3**, 1 (1993).

<sup>72</sup> Spears, J.W.; *Minerals in forages*. In *Forage quality evaluation and utilization*. Fahey, G.C., Mosser, L.E., Mertens, D.R., Collins M.; (Eds.). American Society of Agronomy, Madison, USA (1994).

podemos encontrar a estos elementos en las plantas. La medida indirecta de la composición mineral, teniendo en cuenta que la cantidad de estos elementos varía de acuerdo a la madurez de las plantas, de la parte de la misma, temperatura de la zona donde se ubica el cultivo, cantidad de abono suministrado al cultivo, fertilidad del suelo y características físicas del mismo<sup>73</sup>, hace que sea complejo la obtención de los modelos de calibración.

Se han realizado determinaciones de composición mineral en forrajes mediante espectroscopía NIR<sup>68,69,74</sup>, o en partes concretas de los mismos como pueden ser la hojas o tallos<sup>75</sup>, poniendo de manifiesto que la composición botánica del conjunto de muestras afecta a la precisión y a la exactitud de los resultados, obteniéndose valores más favorables cuando se actúa sobre muestras sencillas de un sólo componente botánico<sup>76,77,78</sup>. Los estudios descritos no hacen uso de la sonda de fibra óptica de reflectancia remota para la determinación de composición mineral.

La alfalfa es una buena fuente de vitaminas<sup>3</sup>, y más concretamente de vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles). Los componentes mayoritarios son cuatro derivados metilados del tocol, denominados  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -tocoferol, siendo el  $\alpha$ - el que presenta una actividad vitamínica muy superior al resto<sup>79</sup>. Debido a la existencia de tres centros quirales (2, 4' y 8') pueden existir 8 diastereoisómeros, aunque en las plantas, al producirse una síntesis enantiomérica específica, se generan únicamente las formas *RRR*. Los derivados insaturados,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -tocotrienoles, pueden presentar

---

<sup>73</sup> MacPherson, A.; *Trace minerals status of forages*. In: Givens, D.I., Owen, E., Axford, R.F.E., Omedi, H.M.(Eds.), *Forage evaluation in ruminant nutrition*, CABI Publishing, Wallingford, England (2000).

<sup>74</sup> Cozzolino, D., Moron, A.; *Exploring the use of near infrared spectroscopy (NIRS) to predict trace minerals in legumes*. *Animal Feed Science and Technology*. **111**, 161 (2004).

<sup>75</sup> Halgerson, J.L., Sheaffer, C.C., Martin, N. P., Peterson PR., Weston, S.J.; *Near-infrared reflectance spectroscopy prediction of leaf and mineral concentrations in alfalfa*; *Agronomy Journal*. **96**, 344 (2004).

<sup>76</sup> García-Ciudad, A., García Criado, B., Pérez-Corona, M.E., Vázquez de Aldana, B.R., Ruano-Ramos, A.M.; *Application of near-infrared reflectance spectroscopy to chemical analysis of heterogeneous and botanically complex grassland samples*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **63**, 419 (1993).

<sup>77</sup> Ruano-Ramos, A., García-Ciudad, A., García-Criado, B.; *Near infrared spectroscopy prediction of mineral content in botanical fractions from semi-arid grasslands*; *Animal Feed Science and Technology*. **77**, 331 (1999).

<sup>78</sup> Petisco, C., García-Criado, B., Vázquez-de-Aldana, B.R., Zabalgogazcoa, I., Mediavilla, S., García-Ciudad, A.; *Use of near-infrared reflectance spectroscopy in predicting nitrogen, phosphorus and calcium contents in heterogeneous woody plant species* *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **382**, 458 (2005).

<sup>79</sup> Lang, J.K., Schillaci, M., Irvin, B.; *Vitamin E*. In: De Leenheer, A.P.; Lambert, W.E., Neils, H.J. (Eds.); *Modern chromatographic analysis of vitamins*. (2<sup>nd</sup> Edition) Marcel Dekker, New York, USA (1992).

isomería *E/Z* en dos dobles enlaces, aunque en la naturaleza solamente se encuentra la forma *E* (figura 8).

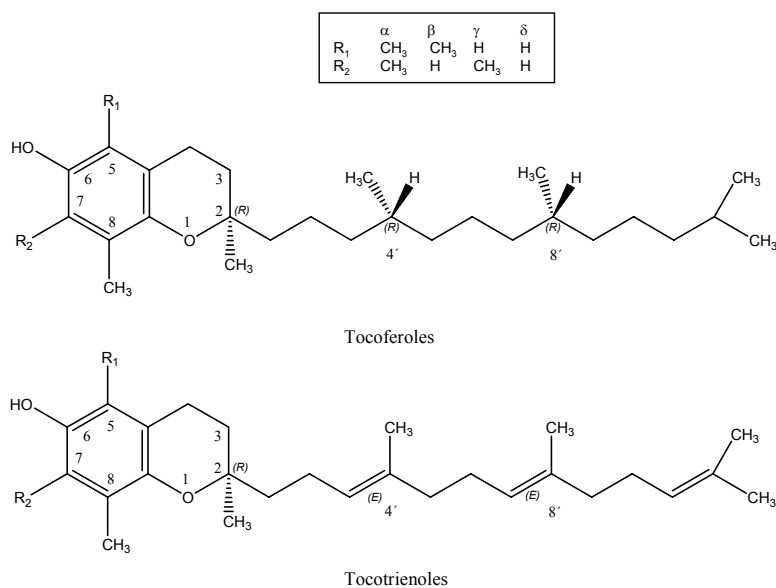


Figura 8. Estructura de los tocoferoles y tocotrienoles.

La vitamina E es el antioxidante natural más eficaz para prevenir la oxidación de las grasas, y es este carácter antioxidante el que marca las propiedades fisiológicas y su comportamiento fisicoquímico<sup>80</sup>.

La cromatografía es el método de análisis más empleado<sup>79,81</sup>, y más concretamente la cromatografía líquida en fase normal o inversa. En fase normal se pueden separar los isómeros β- y γ-tocoferol, aunque los tiempos de retención son poco reproducibles, se necesitan tiempos más largos para el equilibrado de la columna y se produce un mayor consumo de productos tóxicos en la fase móvil. Esto hace que la elección preferida sea la fase inversa, teniendo que cuantificar conjuntamente los dos isómeros posicionales

<sup>80</sup> Adrian, J., Potus, J., Poiffait, A., Dauviller, P.; *Análisis nutricional de los alimentos*. Editorial Acribia, Zaragoza, España (2000).

<sup>81</sup> Ruperez, F. J., Martín, D., Herrera, E.; Barbas, C.; *Chromatographic analysis of α-tocopherol and related compounds in various matrices*. Journal of Chromatography A. **935**, 45 (2001).



anteriormente indicados<sup>81</sup>, si bien en la mayoría de los casos el isómero predominante es el  $\gamma$ -tocoferol<sup>82</sup>.

En alimentos y muestras biológicas los tocoferoles y tocotrienoles se encuentran en baja concentración y en presencia de otros muchos analitos que pueden ser interferentes, como pueden ser ácidos grasos, triglicéridos, fosfolípidos, esteroides, proteínas, hidratos de carbono..., necesitando un tratamiento previo al análisis. La mayoría de los métodos que permiten la determinación de la vitamina E implican una saponificación de la matriz, con objeto de romper las estructuras a las que pueden estar unidos tocoferoles y tocotrienoles y eliminar proteínas e hidratos de carbono, en presencia de antioxidantes como el pirogalol o el ácido ascórbico para evitar la oxidación de tocoferoles y tocotrienoles, seguida de una extracción de la fracción insaponificable donde se encuentra la vitamina E<sup>79,81</sup>.

La espectroscopía NIR se ha utilizado para la determinación de vitamina E en calabaza, usando como referencia un método fluorimétrico<sup>83</sup>, y en premezclas de vitaminas<sup>84</sup>. La determinación de  $\alpha$ -tocoferol se ha realizado en aceite de palma, dopado<sup>85</sup> previamente, en aceites vegetales comestibles después de realizar una extracción con etanol<sup>86</sup> o en pipas de girasol donde se evalúan conjuntamente todos los isómeros<sup>87</sup>. La determinación del de  $\alpha$ -tocoferol en hojas de haya también ha sido objeto de estudio<sup>88</sup>.

---

<sup>82</sup> Delgado-Zamarreño, M. M., Bustamante-Rangel, M., Sanchez-Perez, A., Carabias-Martinez, R.; *Pressurized liquid extraction prior to liquid chromatography with electrochemical detection for the analysis of vitamin E isomers in seeds and nuts*. Journal of Chromatography A. **1056**, 249 (2004).

<sup>83</sup> Jin, T., Wu, Z., Liu, L., Li, X.; *NIR spectroscopy analysis of  $\beta$ -carotene and vitamin E in pumpkin*. Acta Horticulturae. **483**, 275 (1999).

<sup>84</sup> Shi, Y., Xu, G., Shen, X., Xu, Z.; *Quantitative determination of vitamin E by near-infrared dispersion spectrometry*. **28**, 587 (2000).

<sup>85</sup> Man, Y. B. C., Ammawath, W., Mirghani, M. E. S.; *Determining alpha-tocopherol in refined bleached and deodorized palm olein by Fourier transform infrared spectroscopy*. Food Chemistry. **90**, 323 (2005).

<sup>86</sup> Szlyk, E., Szydłwska-Czerniak, A., Kowalczyk-Marzec, A.; *NIR spectroscopy and partial least-squares regression for determination of natural alpha-tocopherol in vegetable oils*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **53**, 6980 (2005).

<sup>87</sup> Gotor, A. A., Farkas, E., Berger, M., Labalette, F., Centis, S., Dayde, J., Calmon, A.; *Determination of tocopherols and phytosterols in sunflower seeds by NIR spectrometry*. European Journal of Lipid Science and Technology. **109**, 525 (2007).

<sup>88</sup> Gäb, M., Hoffmann, K., Lobe, M., Metzger, R., van Ooyen, S., Elbers, G., Kollner, B.; *NIR-spectroscopic investigation of foliage of ozone-stressed Fagus sylvatica trees*. Journal of Forest Research. **11**, 69 (2006).

La utilización de sondas de fibra óptica de reflectancia remota es menos frecuente, se ha determinado el contenido de  $\alpha$ -, ( $\beta + \gamma$ )- y  $\delta$ -tocoferol en piensos<sup>89</sup>. No se han encontrado referencias en las que se realice la determinación de tocoferoles en forrajes mediante espectroscopía NIR.

## II.5 Quimiometría

La quimiometría es una disciplina que utiliza las matemáticas, la estadística y la lógica formal para diseñar o seleccionar los procedimientos óptimos de experimentación, proporcionar la máxima información analizando los datos y sistemas químicos<sup>90</sup>.

En este apartado resaltaremos los aspectos de interés en este sentido en el análisis cualitativo y cuantitativo empleado en esta memoria.

En la espectroscopía NIR se obtiene una señal de conjunto que contiene toda la información física y química de la muestra y para obtener la respuesta buscada es necesaria la aplicación de diversas técnicas quimiométricas que sean capaces de extraer dicha información.

Atendiendo al tipo de información que se necesite obtener, respuesta categórica o de escala, se dividen en métodos cualitativos o cuantitativos.

Los cualitativos, métodos de reconocimiento de pautas, se pueden dividir en métodos supervisados o no supervisados, dependiendo de si se conoce o no *a priori*, si el objeto pertenece a un clase determinada. Los métodos no supervisados buscan agrupamientos en un espacio n-dimensional sin conocer las clases a las que pertenece el objeto; sin embargo en los supervisados se tiene un conocimiento previo de la clases y se decide a cual de ellas pertenece un determinado objeto<sup>91,92</sup>.

---

<sup>89</sup> González-Martín, I., Bustamante-Rangel, M., González-Cabrera, J.M., Delgado-Zamarreño, M.; *Near infrared spectroscopy (NIRS) reflectance technology for determination of tocopherols in animal feeds*. Analytica Chimica Acta. **558**, 132 (2006).

<sup>90</sup> Massart D.L., Vandeginste B.G.M., Buydens L.M.C., De Jong S., Lewi P.J., Smeyers-Verbeke J.; *Handbook of chemometrics and qualimetrics: Part A*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands (1997).

<sup>91</sup> Vandeginste B.G.M., Massart D.L., Buydens L.M.C., De Jong S., Lewi P.J., Smeyers-Verbeke J.; *Handbook of chemometrics and qualimetrics: Part B*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands (1998).

<sup>92</sup> Brereton, R. G.; *Chemometrics: data analysis for the laboratory and chemical plant - the solutions*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England (2003).

En el caso de los métodos cuantitativos, podemos hacer una primera división entre métodos univariantes o multivariantes. En espectroscopía NIR se utilizan los métodos multivariantes debido al gran número de variables de las que se dispone. Dentro de estos métodos multivariantes se distinguen entre modelos lineales y no lineales dependiendo de la función matemática. Los modelos lineales han sido los más empleados. Si se opera con las variables originales se utiliza la regresión lineal múltiple, y cuando se trabaja con unas variables reducidas, se usa la regresión por componentes principales o la regresión por mínimos cuadrados parciales<sup>91,92</sup>.

El procedimiento general de los estudios NIR implica una serie de etapas: toma de muestra, registro de los espectros NIR, obtención de valores de referencia, pretratamiento de los espectros, desarrollo de los modelos, validación interna y externa de los mismos. La estrategia a seguir variará dependiendo del tipo de respuesta buscada.

Se resaltan aquí los métodos utilizados en esta memoria comenzando con una serie de pretratamientos espectrales cuya finalidad es eliminar o reducir los efectos que enmascaran de alguna forma la señal apropiada para el propósito analítico.

### II.5.1 Pretratamientos espectrales utilizados

Los principales problemas que presentan los espectros NIR se encuentran asociados a la dispersión de la luz (*scattering*), originada por las características físicas de la muestra (como puede ser el tamaño de partícula, forma o compactación) a factores externos como la temperatura o humedad, y aspectos relacionados con la medida instrumental, unido a la forma de los espectros NIR con bandas muy anchas que se solapan<sup>93</sup>.

A continuación se describen los pretratamientos utilizados:

*Promediado de espectros*: con esta estrategia se pretende reducir el ruido aleatorio, y por tanto aumentar la relación señal/ruido.

*Corrección del efecto multiplicativo de la dispersión MSC (Multiplicative Scatter Correction)*: los efectos de la dispersión de la luz se asocian principalmente a factores físicos como puede ser el tamaño de partícula. Estos efectos pueden ser aditivos o

---

<sup>93</sup> Williams, P.C.; *Variables affecting near infrared reflectance spectroscopic analysis*. In: Williams, Ph., Norris, K.; *Near infrared technology in the agricultural and food industries*. American Association of Cereal Chemists, Minnesota, USA (1987).

multiplicativos, afectando a la relación del espectro con las propiedades químicas de la muestra. Mediante este tratamiento se pretende evitar que los efectos de la dispersión se impongan a las propiedades químicas de la muestra. La corrección se efectúa utilizando un espectro ideal, que suele ser el espectro medio del conjunto de muestras. Se realiza una regresión lineal por mínimos cuadrados entre los datos a cada longitud de onda del espectro original y los datos del espectro medio (o de referencia) para cada espectro a cada longitud de onda,  $X_{\text{Log}(1/R),i}$  y  $\bar{X}_{\text{Log}(1/R),i}$  respectivamente, obteniendo una recta para cada i-espectro.

$$X_{\text{Log}(1/R),i} = a_i + b_i \bar{X}_{\text{Log}(1/R),i} + e_i$$

Para cada espectro se obtiene el parámetro  $a_i$ , ordenada en el origen que representa los efectos aditivos y la pendiente  $b_i$  que representa los efectos multiplicativos, y un término residual,  $e_i$ .

La corrección de los efectos aditivos (visible si representamos la recta que define cada espectro en variaciones verticales de las mismas dentro del conjunto) se realiza mediante la sustracción del término  $a_i$  a cada valor del espectro original.

$$X_{\text{Log}(1/R),i \text{ aditivo}} = X_{\text{Log}(1/R),i} - a_i$$

La corrección de los efectos multiplicativos (visible si representamos la recta que define cada espectro en variaciones de pendiente de las mismas dentro del conjunto) se realiza dividiendo por la pendiente  $b_i$  cada valor del espectro original.

$$X_{\text{Log}(1/R),i \text{ multiplicativo}} = \frac{X_{\text{Log}(1/R),i}}{b_i}$$

Si queremos corregir los dos efectos (aditivos y multiplicativos) aplicaremos la corrección completa:

$$X_{\text{Log}(1/R),i \text{ MSC}} = \frac{X_{\text{Log}(1/R),i} - a_i}{b_i}$$

En general, esta corrección mejora la linealidad de los espectros y conserva la información química a la vez que se minimizan las diferencias entre los espectros<sup>94,95,96</sup>; presenta el inconveniente de que es necesario realizar de nuevo los cálculos cuando se hace algún cambio en el conjunto de muestras; recalculando el espectro medio y por consiguiente todos los parámetros.

*Tipificación de la absorbancia SNV (Standard Normal Variate)*: al igual que el anterior tratamiento, intenta minimizar la dispersión debida principalmente a factores físicos, como puede ser el tamaño de partícula. Este tratamiento se aplica individualmente a cada espectro y por tanto no necesita el cálculo de un espectro medio o de referencia, ni rehacer los cálculos si se elimina alguna muestra del conjunto inicial. Existe una relación lineal entre este tratamiento y MSC, haciendo que los resultados ofrecidos por ambos métodos sean similares<sup>97,98</sup>.

En este método se realiza el cálculo del valor medio y la desviación estándar de los valores  $\text{Log}(1/R)$  a todas las longitudes de onda de cada  $i$ -espectro,  $\bar{X}_{\text{Log}(1/R),i}$  y  $\sigma_{\text{Log}(1/R),i}$  respectivamente. Los nuevos datos para cada  $i$ -espectro se obtienen aplicando la siguiente transformación sobre cada dato a todas las longitudes de onda de cada  $i$ -espectro,  $X_{\text{Log}(1/R),i}$ :

$$X_{\text{Log}(1/R),i_{SNV}} = \frac{X_{\text{Log}(1/R),i} - \bar{X}_{\text{Log}(1/R),i}}{\sigma_{\text{Log}(1/R),i}}$$

<sup>94</sup> Martens H., Jensen S.A., Geladi P.; *Multivariate linearity transformation for near infrared reflectance spectra of meat. application spectroscopy* Proceedings of the Nordic Symposium on Applied Statistics, Stokkand Forlag Publishers, Stavanger, Norway (1983).

<sup>95</sup> Geladi, P., MacDougall, D., Martens, H.; *Linearization and scatter-correction for near-infrared reflectance spectra of meat*. Applied Spectroscopy. **39**, 491 (1985).

<sup>96</sup> Fernández-Cabanás, V. M., Garrido-Varo, A., Olmo, J. G., Pedro, E. D., Dardenne, P.; *Optimisation of the spectral pre-treatments used for Iberian pig fat NIR calibrations*. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems. **87**, 104 (2007).

<sup>97</sup> Barnes, R.J., Dhanoa, M.S., Lister, S.J.; *Standard normal variate transformation and de-trending in diffuse reflectance spectra*. Applied Spectroscopy. **43**, 722 (1989).

<sup>98</sup> Helland, I. S., Næs, T., Isaksson, T.; *Related versions of the multiplicative scatter correction method for preprocessing spectroscopic data*. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems. **29**, 233 (1995).

Después de este tratamiento cada *i*-espectro tiene una desviación estándar igual a uno y una media igual a cero, siendo una distribución normal estandarizada, independiente de la escala original.

Una variante de este método, que es la utilizada en esta memoria, excluye el centrado de los datos, proporcionado por tanto unos *i*-espectros con una desviación estándar igual a uno y una media, que en este caso, no debe de ser cero, produciéndose así un autoescalado de cada *i*-espectro; obteniendo una distribución normal. La transformación realizada es la siguiente:

$$X_{Log(1/R),i_{SNV}} = \frac{X_{Log(1/R),i}}{\sigma_{Log(1/R),i}}$$

*Corrección de la tendencia DT (Detrend)*: este tratamiento se aplica de forma individual a cada espectro e intenta minimizar la curvatura de la línea base que surge como consecuencia del diferente tamaño de partícula y del distinto grado de compactación en su empaquetamiento. El procedimiento consiste en ajustar cada espectro mediante mínimos cuadrados a una función cuadrática, donde la variable dependiente sea el dato a cada longitud de onda en cada *i*-espectro  $X_{Log(1/R),i}$  y las independientes, las longitudes de onda  $W$ . De esta manera se obtienen los coeficientes  $A$ ,  $B$  y  $C$ , y un término residual,  $e_i$ , pudiendo calcular los valores a cada longitud de onda de cada *i*-espectro  $\hat{X}_{Log(1/R),i}$  según la ecuación:

$$\hat{X}_{Log(1/R),i} = A + B \cdot W + C \cdot W^2 + e_i$$

La corrección se consigue sustrayendo este valor al dato original:

$$X_{Log(1/R),i_{DT}} = X_{Log(1/R),i} - \hat{X}_{Log(1/R),i}$$

Cada *i*-espectro después de esta corrección tiene una media igual a cero y una desviación estándar distinta a la unidad<sup>97,96</sup>.

A continuación y a modo de ejemplo se muestran los espectros originales de 10 muestras de alfalfa triturada y los espectros después de aplicar las correcciones a las que se ha hecho referencia.

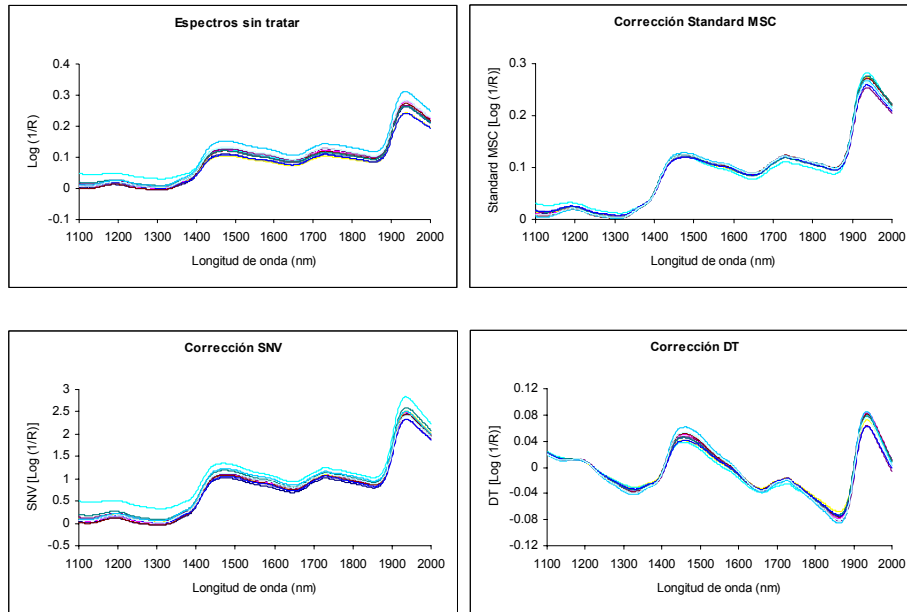


Figura 9. Espectros de 10 muestras de alfalfa triturada y correcciones por diferentes métodos.

*Derivadas:* son una herramienta muy utilizada en el procesado de los espectros NIR porque permiten disminuir sus problemas más característicos: bandas solapadas y variaciones en la línea base ocasionadas por características físicas de las muestras, como pueden ser el tamaño de partícula, empaquetamiento de muestras sólidas y otra serie de factores relacionados con las muestras y su presentación. El método para el cálculo de las derivadas emplea el método *gap* o segmento, utilizando la información de un segmento localizado en el espectro para calcular la derivada. Previamente se puede aplicar un suavizado sustituyendo los datos de un segmento por un valor promedio. La utilización de la primera derivada, pendiente de la curva espectral, elimina los términos constantes a todas las longitudes de onda, por lo que corrige desplazamientos de la línea base. La segunda derivada corrige el cambio de pendiente de la curva espectral, y además, corrige los términos que varían de forma lineal con la longitud de onda. No suelen utilizarse derivadas superiores a la segunda ya que suponen un aumento del ruido

en las medidas espectrales<sup>99</sup>. La notación utilizada son 4 dígitos como  $(a, b, c, d)$ , siendo  $a$ , el orden de derivada,  $b$ , el número de puntos en los cuales se realiza la derivada,  $c$  el número de puntos en los cuales se realiza el primer suavizado y  $d$ , el número de puntos en los cuales se realiza el segundo suavizado. En este método de derivadas y suavizado se introduce una variable que es el segmento en el cual se realizan estas correcciones. Un segmento demasiado pequeño puede aumentar el ruido espectral, mientras que uno demasiado grande puede hacer que no se represente el comportamiento del espectro en el resultado o eliminar información importante<sup>10</sup>.

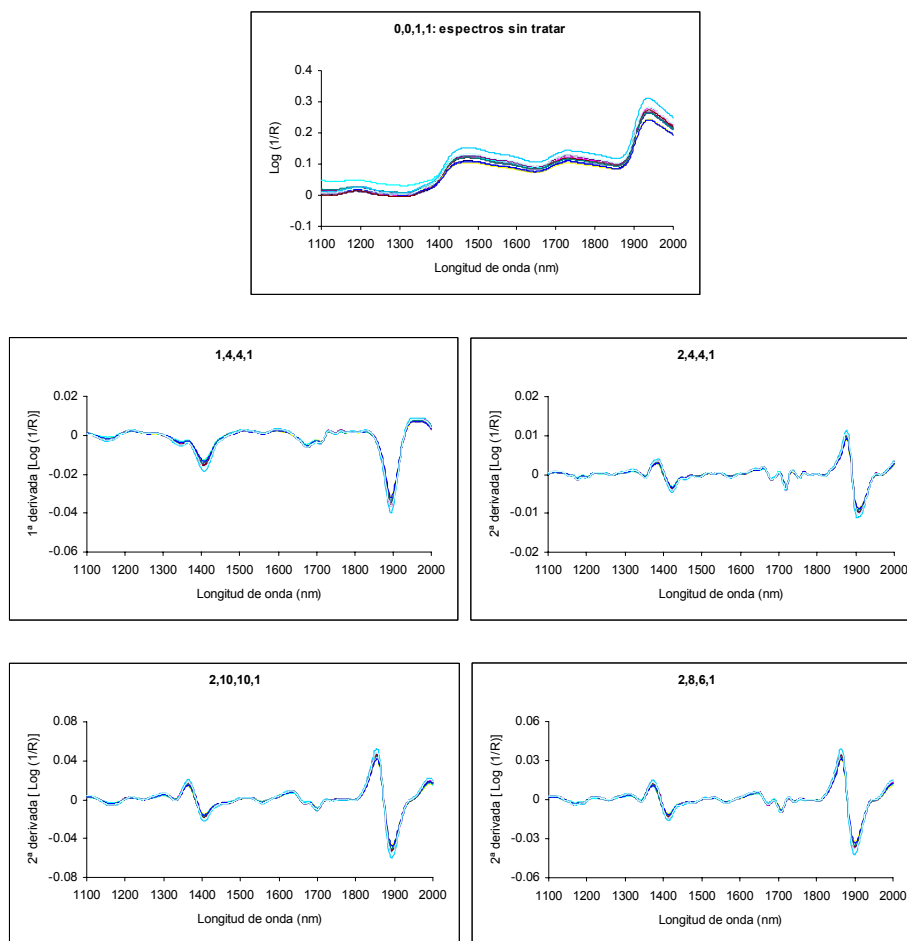


Figura 10. Espectros de 10 muestras de alfalfa; diferentes suavizados y derivadas.

<sup>99</sup> Norris, K.H., Williams, P.C; *Optimization of mathematical treatments of raw near-infrared signal in the measurement of protein in hard red spring wheat: I. Influence of particle size*. Cereal Chemistry. **61**, 158 (1984).



En la figura 10 se pueden observar las diferentes derivadas y suavizados aplicados a un conjunto de 10 muestras de alfalfa trituradas, así como el conjunto de datos originales (0, 0, 1, 1).

La combinación de los pretratamientos Standard MSC, SNV y DT con posteriores suavizados y derivadas, ofrece un amplio abanico para intentar eliminar o reducir los efectos que enmascaran de alguna forma la señal apropiada para el propósito analítico<sup>99</sup>.

## II.5.2 Análisis cualitativos utilizados

### II.5.2.1 Análisis discriminante basado en regresión por mínimos cuadrados parciales DPLS

Este método de reconocimiento de pautas prefijadas se fundamenta en la realización de una regresión por mínimos cuadrados parciales sobre unas variables categóricas denominadas *dummy*. El método de regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS) se describirá más detalladamente en el apartado de métodos cuantitativos, si bien es necesario hacer una breve referencia<sup>100</sup>.

Básicamente, un método PLS trata de concentrar la información relevante contenida en las variables medidas, en un número menor de variables sin pérdida de información relevante; en la construcción de estas nuevas variables se tiene en cuenta el dato de referencia. La regresión se realiza con estas nuevas variables, simplificando el modelo de calibración y la interpretación de los resultados. Dependiendo si el modelo se realiza para un sólo analito o dato de referencia o para varios a la vez, tendremos las modalidades de PLS 1 y PLS 2 respectivamente<sup>91,92</sup>.

Puesto que en el desarrollo del modelo se conoce *a priori* el grupo al cual pertenecen las muestras, se organizan archivos que contengan los espectros de todas las muestras pertenecientes a una misma clase, tantos como clases existan. Automáticamente se genera una matriz temporal con las muestras de todas las clases y unas nuevas variables *dummy*, tantas como clases existan. Se indica en cada variable la pertenencia o no de una muestra a un determinado grupo mediante unos o ceros respectivamente, realizando una regresión PLS 2 con la matriz de estas nuevas variables *dummy* y los datos espectrales de las muestras. Un caso especial es cuando sólo de

---

<sup>100</sup> Stahle, L., Wold, S.; *Partial least square analysis with cross-validation for the two-class problem: a Monte Carlo study*. Journal of Chemometrics. **1**, 185 (1987).

dispone de dos clases, aunque el algoritmo empleado sigue siendo PLS 2 (al encontrarse las variables *dummy* totalmente correlacionadas) es equivalente a utilizar un algoritmo PLS 1.

Para fijar el número de nuevas variables, factores PLS, y evaluar el modelo se tiene en cuenta la validación cruzada. El número de factores PLS es siempre superior al que cabe esperar en un PLS con fines cuantitativos. Otros parámetros como el RSQ (coeficiente de correlación múltiple), SEC (error estándar de calibración) y SECV (error estándar de validación cruzada) proporcionan información a cerca de la bondad del modelo, todos estos términos se explican con mas detalle en la parte de análisis cuantitativo. En la siguiente figura se muestra esquemáticamente el proceso de obtención del modelo en el caso de tres muestras y tres clases diferentes<sup>10,91,92</sup>.

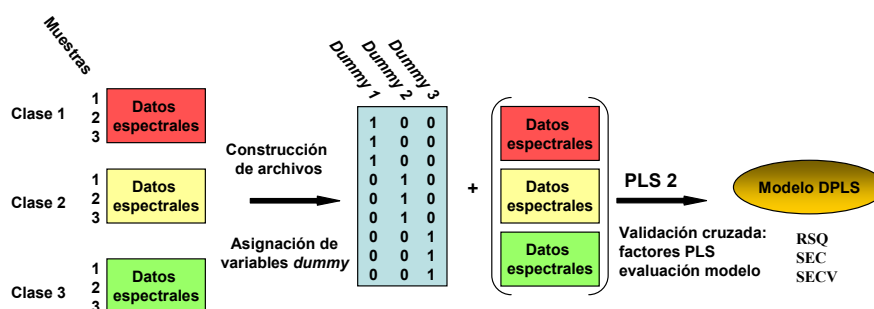


Figura 11. Esquema de obtención de modelos DPLS.

Una vez obtenido el modelo se predice el valor de cada variable *dummy* para cada muestra, realizando posteriormente un cambio en estos valores predichos sumando una unidad. Por tanto si se obtiene un valor de 2 la muestra estará perfectamente clasificada en el grupo de la variable *dummy* con ese valor, por el contrario, muestras con valores inferiores 1.5 no se podrían clasificar en la clase cuya variable *dummy* tiene ese valor; siendo por tanto el valor 1.5 el punto de corte de pertenencia a una determinada clase. El porcentaje de muestras correctamente clasificadas en las clases a las que pertenecen indica la bondad del modelo desarrollado<sup>10</sup>.

Si la predicción se realiza sobre las muestras que han servido para desarrollar el modelo estaremos realizando la validación interna del mismo, por el contrario, si las

muestras son distintas a las utilizadas en la obtención del modelo realizando una validación externa.

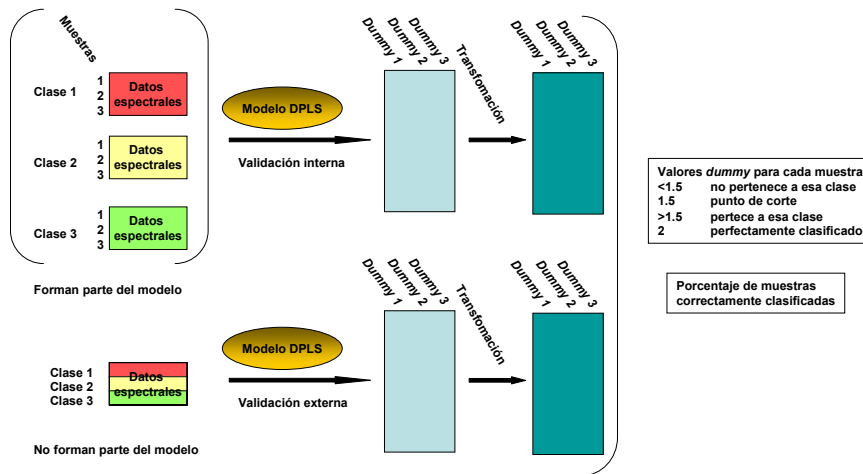


Figura 12. Validación interna y externa de modelos DPLS.

En esta figura se puede apreciar de forma esquemática el proceso de validación interna y externa del modelo DPLS.

### II.5.2.2 Análisis de componentes principales PCA

El análisis de componentes principales es un método de reconocimiento de pautas no prefijadas, habitual en análisis multivariante, cuyo objetivo es reducir el número de variables iniciales, sin perder información y así poder observar estructuras y tendencias en las muestras.

El PCA<sup>101</sup>, de forma muy básica, consiste en:

- Estimar la dimensionalidad real de los datos de las muestras estudiadas; y reducir esta dimensionalidad manteniendo la información relevante del sistema.
- Calcular un nuevo sistema de coordenadas, para lo que se buscan las direcciones que expliquen la máxima variabilidad en los datos de las muestras. Estos nuevos ejes se denominan componentes principales (PCs). Así el primer

<sup>101</sup> Breton, R.G.; *Chemometrics: applications of mathematics and chemometrics, illustrated by case studies*. Elsevier. Amsterdam, The Netherlands (1992).

componente principal es la dirección que explica la máxima variabilidad de los datos de las muestras; el segundo, se escoge que sea perpendicular al primero, y que explique la máxima variabilidad de los datos de las muestras una vez restada la explicada por el primer componente principal y así sucesivamente. Para fijar el número de componentes principales se utilizan reglas o criterios, en nuestro caso los criterios son: variabilidad espectral explicada superior a un 95%, variabilidad espectral explicada constante y desviación estándar de las puntuaciones o *scores* de las muestras constante.

- Definir estos nuevos ejes matemáticamente, mediante los *loadings*, cargas o pesos que son los cosenos de los ángulos que forman cada uno de estos nuevos ejes con los antiguos, y los *scores* o puntuaciones que son las coordenadas en estos nuevos ejes. De tal forma que:

$$\begin{aligned} \text{Espectro de la muestra} &= (\text{score } 1) (\text{loading } 1) + (\text{score } 2) (\text{loading } 2) \\ &+ \dots + \text{ruido espectral } (E \sim \text{residual}) \end{aligned}$$

Los componentes principales se pueden interpretar geoméricamente<sup>102</sup> de tal forma que el espectro medido a J longitudes de onda, constituye un conjunto de J variables que puede ser descrito como un vector. Se puede construir un espacio de J dimensiones, de tal manera, que cada dimensión corresponda a una de las longitudes de onda, y se pueda representar el mismo objeto como un punto en ese nuevo espacio. Si tenemos M muestras, se pueden representar como M puntos en el espacio de J dimensiones. El objetivo del PCA es hallar las direcciones en que están agrupados los M puntos de los objetos en el espacio de J dimensiones, y reducir el sistema inicial J dimensional a uno A dimensional, con  $A < J$  manteniendo la información relevante del sistema. Geométricamente es un cambio de ejes, representando esas muestras en un sistema de coordenadas con un número inferior de ejes al utilizado inicialmente.

---

<sup>102</sup> Brereton, R.G.; *Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry*. Analyst. **125**, 2125 (2000).

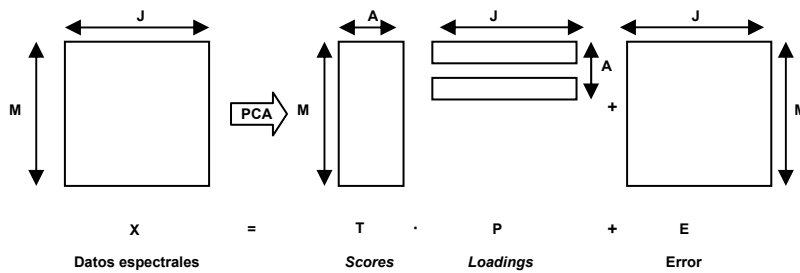


Figura 13. Descomposición de un conjunto de espectros mediante análisis de componentes principales.

Otra propiedad muy importante de los PCs es la ortogonalidad. El método busca las direcciones ortogonales que expliquen la máxima variabilidad de los datos de las muestras, utilizando estas direcciones como nuevos ejes de coordenadas o PCs.

Resumiendo, PCA se utiliza para reducir el número de variables originales correlacionadas, a un número de variables no correlacionadas en un nuevo sistema de ejes ortogonales denominados PCs.

El método para el procesado de datos o escalado será un centrado de datos, el valor medio corresponde al centro del modelo y los valores de todas las variables se refieren a ese centro.

La detección de espectros *outliers* o espectros fuera de la población se lleva a cabo utilizando la distancia de Mahalanobis (H). Se establece la diferencia espectral de una muestra respecto a la media espectral del conjunto de muestras (H), tomando como valor límite  $H = 3$ , de forma que aquellos espectros cuya distancia H sea superior a 3.0 se desechan<sup>10</sup>. En la figura 14 podemos observar de forma esquemática la forma de proceder al realizar un análisis de componentes principales previa realización de diferentes pretratamientos. La elección del número de componentes principales, construcción del nuevo espacio espectral, detección de *outliers* y devolución del conjunto de datos espectrales originales sin los *outliers* es parte del proceso. En este nuevo archivo las muestras con los datos espectrales originales se ordenan de acuerdo con la distancia de Mahalanobis (H) obtenida anteriormente, esto resulta muy útil en procesos posteriores a la hora de construir los grupos de validación cruzada, de manera que los subgrupos resulten homogéneos. También mediante este proceso de análisis de

componentes principales se puede observar qué muestras resultan espectralmente diferentes, sin rebasar el valor de  $H = 3$ , con objeto de decidir su inclusión en el conjunto de calibración.

Mediante este análisis de componentes principales se puede determinar si una nueva muestra está dentro del espacio determinado por el conjunto de calibración cuantitativa mediante la distancia de Mahalanobis (H) con valor límite de 3, antes de realizar una medida cuantitativa. Aquellas muestras que no pertenezcan al espacio espectral no deben ser predichas y se debe de realizar un análisis de referencia y guardar el espectro para una posible ampliación del modelo. Durante el análisis de muestras es importante registrar la distancia de Mahalanobis a muestra vecina (NH), aquellas cuyo valor de NH sea superior a 0.6 pueden resultar interesantes con objeto de mejorar el modelo<sup>10</sup>.

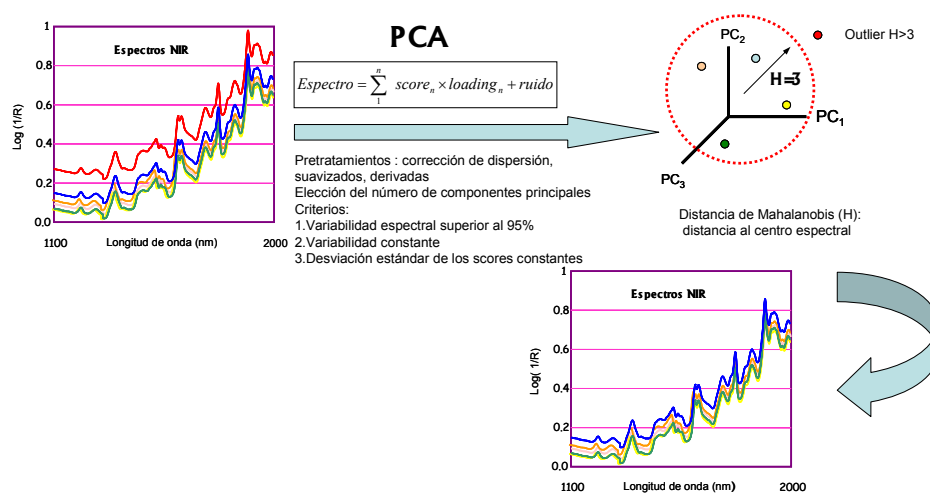


Figura 14. Análisis de componentes principales.

## II.5.3 Análisis cuantitativos utilizados

### II.5.3.1 Regresión por mínimos cuadrados parciales modificados MPLS

Se basa en que la información relevante contenida en las variables medidas se puede concentrar en un número menor de variables sin pérdida de información relevante. La regresión se realiza con estas nuevas variables, no con los datos originales, simplificando el modelo de calibración y la interpretación de los resultados<sup>101</sup>.

El método PLS de calibración fue introducido en 1975, presentado como una modificación del algoritmo de NIPALS, para hallar componentes principales<sup>103</sup>. Es útil para resolver problemas de calibración que contienen un número elevado de variables y relativamente pocas muestras, como es el caso de la espectroscopia NIR, basándose en una reducción de variables. Estas nuevas variables, denominadas variables latentes, factores o componentes, son combinación lineal de las variables originales.

Durante la etapa de calibración, el algoritmo PLS utiliza tanto la información contenida en la matriz de los datos espectroscópicos (matriz X), como la información contenida en la matriz de datos de referencia (matriz Y); teniendo en cuenta ambas informaciones, el método reduce el impacto de grandes pero irrelevantes variaciones en la matriz X en el calibrado, se busca además la máxima variabilidad en la matriz X y la mayor correlación con la matriz Y<sup>104</sup>. Además PLS realiza la regresión en un espacio ortogonal, evitando los problemas derivados de la colinealidad entre las variables, el centrado de los datos se realiza en las matrices X e Y.

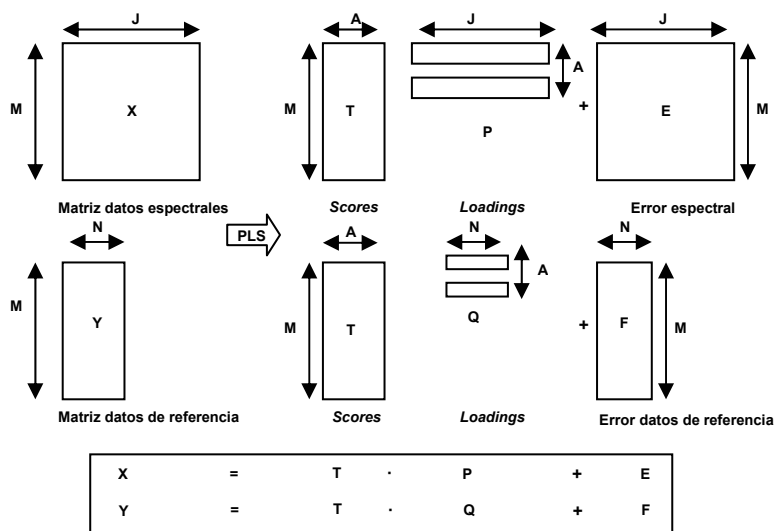


Figura 15. Esquema general de obtención de modelos PLS.

<sup>103</sup> Wold, H; *Soft modelling by latent variables; the non-linear partial least squares approach*, in Perspectives in Probability and Statistics, Papers in Honour of M.S. Bartlett, Gani, J. (Eds.). Academic Press, London, England (1975).

<sup>104</sup> Höskuldsson, A.; *Prediction methods in science and technology*. Thor Publishing, København, Denmark (1996).

En la figura 15 se observa la descomposición de la matriz espectral y la que contiene los parámetros a modelar ( $X$  e  $Y$ ) mediante PLS, siendo  $T$ , matriz de los *scores*, el nexo común entre ambas. Las matrices  $P$  y  $Q$  representan los *loadings*, mientras que las matrices  $E$  y  $F$  representan los errores o residuales de la descomposición de las diferentes matrices. El número de muestras corresponde a  $M$ ;  $A$  es el número de variables latentes obtenidas y  $N$  indica el número de parámetros a modelar<sup>91,92</sup>.

En la matriz  $Y$ , el número de columnas ( $N$ ) representa el número de parámetros a modelar, si  $N = 1$  se estaría modelando para un único parámetro, dando lugar al denominado PLS 1. Sin embargo si  $N$  toma un valor distinto a la unidad se estarían modelando varios parámetros de forma simultánea, dando lugar al denominado PLS 2.

En esta memoria se ha elegido el método MPLS, (*Modified Partial Least Squares*) un PLS modificado, la modificación reside en que los residuales NIR a cada longitud de onda (obtenidos después de que se calcula cada factor, variable latente o componente) se estandarizan (es decir se dividen por la desviación estándar de los residuales a cada longitud de onda) antes de calcular el siguiente factor o variable latente; lo que hace a este algoritmo más estable y preciso que un PLS normal<sup>10</sup>. Al modelar uno a uno los parámetros se trata de una modificación de un algoritmo PLS 1.

El objetivo de la calibración es obtener unos parámetros que permitan calcular la concentración en futuras muestras, de forma que, el residual (diferencia entre el valor de referencia y el predicho) de los datos calculados sea el menor posible. Teniendo en cuenta esto se evaluará la capacidad de predicción del modelo. Se intenta que los primeros factores o variables latentes contengan la mayor información para la predicción de las muestras. La elección del número de factores o variables latentes se puede realizar de diversas formas; una de las más extendidas es mediante la validación cruzada, procedimiento por el que el conjunto original se divide varios grupos de forma que se utiliza un grupo para comprobar los resultados (validar) y el resto para construir el modelo, de forma que cada vez se deje un grupo fuera, el proceso se repite tantas veces como subgrupos se formen. De esta manera se evitan los sobreajustes, atendiendo al valor del error estándar de validación cruzada (SECV) que de forma aproximada se puede decir que es equivalente al error estándar de predicción (SEP) de 10 muestras elegidas al azar<sup>10,91,92</sup>.



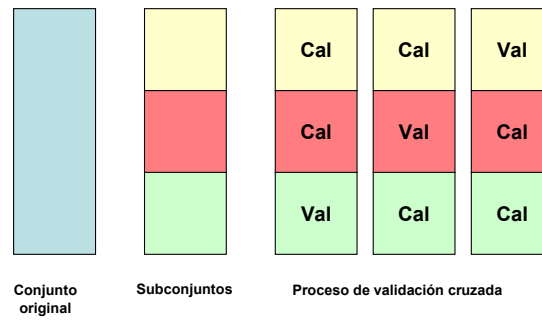


Figura 16. Esquema del proceso de validación cruzada.

En la figura 16 se puede observar de forma esquemática el proceso de validación cruzada: generación de subgrupos y paso de todos ellos por los conjuntos de calibración y validación.

En el proceso de elección del número de factores o variables latentes se comienza por establecer un SECV mínimo y a partir de este se calcula el máximo SECV aceptable (5% superior al mínimo). Se identificará el SECV que con el menor número de factores o variables latentes sea inferior al máximo SECV aceptable, eligiéndose ese número de factores o variables latentes para desarrollar el modelo.

Durante este proceso también son detectadas muestras con altos residuales, diferencias entre el valor de referencia y el predicho. Se utiliza el criterio T, de forma que aquellas muestras cuyo residual dividido por el SECV del proceso supere el valor de 2.5 serán eliminadas del conjunto de calibración.

$$T = \frac{\text{residual}}{\text{SECV}}$$

Este procedimiento se repite dos veces para obtener finalmente el modelo<sup>10</sup>.

Algunos de los parámetros que se obtienen de la *ecuación de calibración* son:

- *RSQ*: coeficiente de correlación múltiple; se utiliza para medir el grado con el que el calibrado ajusta los datos.

$$RSQ = 1 - \left( \frac{\sum_{i=1}^N (y_{cal_i} - \hat{y}_{teo_i})^2}{\sum_{i=1}^N (\hat{y}_{teo_i} - \bar{y})^2} \right)$$

- *SEC*: error estándar de calibración.

$$SEC = \left( \frac{\sum_{i=1}^N (y_{cal_i} - \hat{y}_{teo_i})^2}{N - p - 1} \right)^{\frac{1}{2}}$$

- *BIAS*: se define como la media de los residuales, siendo éstos la diferencia entre el valor del laboratorio ( $y_{cal_i}$ ) y el valor predicho ( $\hat{y}_{teo_i}$ ).

$$residual_{ij} = (y_{cal_i} - \hat{y}_{teo_i})$$

$$BIAS = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (y_{cal_i} - \hat{y}_{teo_i})$$

- *SECV*: error estándar de validación cruzada.

$$SECV = \left( \frac{\sum_{i=1}^N (y_{cal_i} - \hat{y}_{teo_i} - BIAS)^2}{N - 1} \right)^{\frac{1}{2}}$$

- *Rango de aplicabilidad*: valores máximo y mínimo del parámetro de referencia para los cuales se puede utilizar la ecuación.

En estas ecuaciones  $y_{cal_i}$  e  $\hat{y}_{teo_i}$  son respectivamente, los datos calculados y teóricos para cada una de las  $i$ -muestras,  $\bar{y}$  es el valor medio de las datos calculadas,  $N$  es el número de muestras utilizadas en el calibrado, y  $p$  es el número de factores de la regresión.

Una vez obtenido el modelo se procede a la *validación interna* mediante la predicción de los valores del parámetro de referencia en las mismas muestras que finalmente forman parte del modelo. Algunos de los parámetros que se utilizan para estimar la bondad del modelo son:

- *RSQ*: obtenido al realizar una regresión entre los valores de referencia y los predichos mediante espectroscopía NIR.
- *SEP*: error estándar de predicción.

$$SEP = \left( \frac{\sum_{i=1}^N (y_{cal_i} - \hat{y}_{teo_i})^2}{N} \right)^{\frac{1}{2}}$$

- *SEP(C)*: error corregido por el BIAS.

$$SEP(C) = \left( \frac{\sum_{i=1}^N (y_{cal_i} - \hat{y}_{teo_i} - BIAS)^2}{N - 1} \right)^{\frac{1}{2}}$$

En estas ecuaciones  $y_{cal_i}$  e  $\hat{y}_{teo_i}$  son respectivamente, los datos calculados y teóricos para cada una de las  $i$ -muestras y  $N$  es el número de muestras utilizadas para realizar la validación interna.

- *RPD*: capacidad de predicción del modelo (*ratio performance deviation*).

$$RPD = \frac{SD_{ref}}{SEP}$$

Se trata de la relación entre la desviación estándar de los datos obtenido mediante el análisis de referencia y el error estándar de predicción de los mismos. Este valor idealmente debe ser superior a 2.5, si bien en los casos en los que  $SD_{ref}$  es menor que la unidad puede no llegarse a ese valor ideal<sup>105</sup>.

Además, para comprobar la robustez del modelo de calibración se realiza una *validación externa*, aplicando las ecuaciones a un conjunto de muestras que no pertenecen al colectivo de calibración. Algunos de los parámetros que se evalúan son:

- Media de los residuales.
- Porcentaje de error respecto al valor de referencia.
- *RMSE*: error cuadrático medio (*root mean standard error*).

$$RMSE = \left( \frac{\sum_{i=1}^N (y_{cal_i} - \hat{y}_{teo_i})^2}{N} \right)^{\frac{1}{2}}$$

En esta ecuación  $y_{cal_i}$  e  $\hat{y}_{teo_i}$  son respectivamente, los datos calculados y teóricos para cada una de las  $i$ -muestras y  $N$  es el número de muestras utilizadas para realizar la validación externa. La fórmula es la misma que se emplea en validación interna (para el SEP), pero aplicada a muestras que no pertenecen al colectivo de calibración.

- Test t de student para valores apareados: mediante este test se comprueba si los valores obtenidos por los diferentes métodos (método de referencia y espectroscopía NIR) proporcionan valores significativamente iguales o no, en nuestro caso se utiliza un con un nivel de confianza del 95% ( $p = 0.05$ ).

<sup>105</sup> Williams, P.C., Sobering, D.C.; *The future waves*. Near Infrared Spectroscopy. **1**, 25 (1993).

## **III Experimental**

### **III.1 Etapas de trabajo en estudios NIR**

**III.1.1 Uso de la espectroscopía NIR en análisis cualitativo**

**III.1.2 Uso de la espectroscopía NIR en análisis cuantitativo**

### **III.2 Muestras**

### **III.3 Registro de los espectros NIR**



### III.1 Etapas de trabajo en estudios NIR

En esta memoria se reflejan estudios cualitativos y cuantitativos utilizando la espectroscopía NIR. La metodología depende del tipo de estudio realizado, por lo que se describe de forma breve las etapas en cada caso.

#### III.1.1 Uso de la espectroscopía NIR en análisis cualitativo

Las etapas se pueden resumir en:

- Toma y tratamiento de muestra.
- Registro de los espectros NIR de las muestras.
- Elección del método de reconocimiento de pautas prefijadas o no prefijadas.

En este trabajo se utiliza el análisis de componentes principales (PCA) como método de pautas no prefijadas y el análisis discriminante basado en regresión por mínimos cuadrados parciales (DPLS) como método de reconocimiento de pautas prefijadas. Dependiendo de si se trata de un método de reconocimiento de pautas prefijadas o no la metodología cambia, por lo que se separan ambos casos.

- Reconocimiento de pautas no prefijadas. Análisis de componentes principales.
  - Realización de pretratamientos espectrales.
  - Análisis de componentes principales.
  - Respuesta sobre la estructura del conjunto.
- Reconocimiento de pautas prefijadas. Análisis discriminante basado en regresión por mínimos cuadrados parciales.
  - Asignación de clase a las muestras.
  - Análisis discriminante basado en regresión por mínimos cuadrados parciales.
  - Validación interna del modelo DPLS.
  - Validación externa del modelo DPLS.

En la figura 17 se puede observar de forma esquemática el procedimiento descrito.

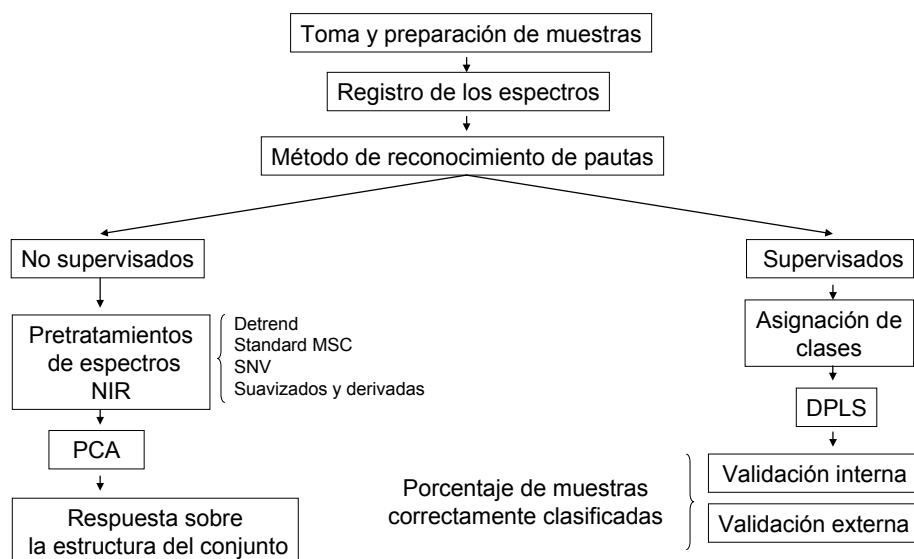


Figura 17. Esquema de las etapas de trabajo en estudios cualitativos usando la espectroscopía NIR.

### III.1.2 Uso de la espectroscopía NIR en análisis cuantitativo

Las etapas se pueden resumir en:

- Toma y tratamiento de muestra.
- Registro de los espectros NIR de las muestras.
- Análisis de referencia.
- Realización de pretratamientos espectrales.
- Análisis de componentes principales.
- Obtención del modelo de calibración mediante la aplicación del algoritmo de mínimos cuadrados parciales modificados (MPLS).
- Validación interna del modelo MPLS.
- Validación externa del modelo MPLS.



En la figura 18 se puede observar de forma esquemática el procedimiento descrito.

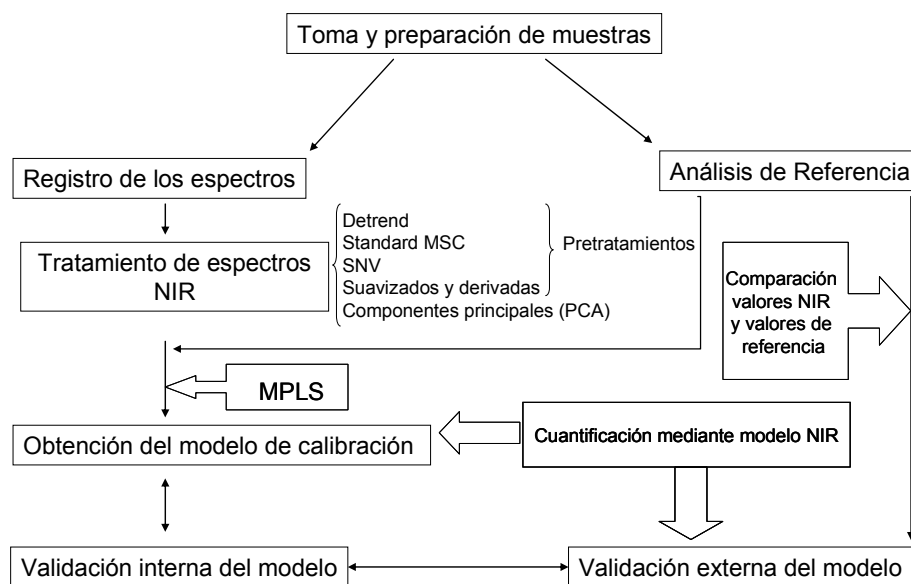


Figura 18. Esquema de las etapas de trabajo en estudios cuantitativos usando la espectroscopía NIR.

### III.2 Muestras

Las muestras de alfalfa utilizadas en esta memoria fueron proporcionadas por la empresa Aquimisa S.L, situada en C/Hoces de Duratón, Parc. 71, Polig. El Montalvo II. 37008 (Salamanca) en el intervalo de tiempo comprendido entre los años 2004 y 2006. Las muestras se suministraban en dos formas de presentación: muestras de alfalfa empacada y muestras trituradas.

### III.3 Registro de los espectros NIR

Se registran los espectros NIR utilizando un equipo Foss NIRSystem 5000 con sonda de fibra óptica de reflectancia remota de tipo Bundle (haz) regular 210/210. Los registros se realizan por aplicación directa de la sonda (que dispone de una ventana de cuarzo de 5cm x 5cm, detector de reflectancia y como referencia utiliza una placa cerámica) sobre las muestras. La sonda se une al equipo mediante una conexión de 1.5 metros de fibra óptica, como se muestra en la figura 19. El software que se utiliza para

la adquisición de datos por el equipo y para el tratamiento de los mismos es el programa WinISI versión 1.50.



Figura 19. Equipo NIRSystem 5000 con sonda de fibra óptica.

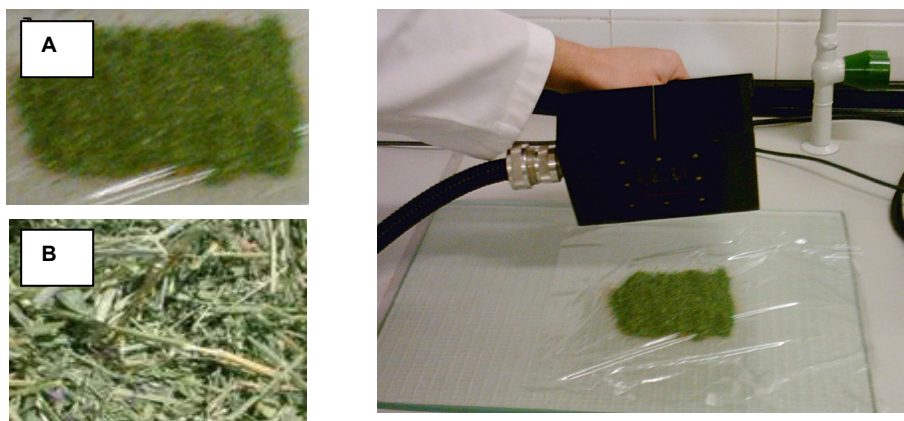
Dependiendo del tipo de presentación de la muestra la forma de registro se modifica ligeramente por lo que se describen ambos casos de forma separada.

*Alfalfa triturada:* se aplica la sonda directamente sobre la muestra extendida sobre un plástico como se muestra en la figura 20, Se llevan a cabo tres registros de la misma muestra, tomando el valor medio de los tres. Posteriormente se devuelve la muestra al vial de plástico limpiando la ventana de la sonda con la ayuda de un pincel y/o papel.

*Alfalfa empacada:* se aplica la sonda directamente sobre la muestra mezclada manualmente y extendida en un plástico como se muestra en la figura 20. Se lleva a cabo un primer registro de la muestra, se limpia la ventana de la sonda con la ayuda de un pincel y/o papel, se mezcla la muestra manualmente otra vez y se realiza un segundo registro de la muestra. El espectro de la muestra es media de los dos espectros registrados. Posteriormente se devuelve la muestra al vial de plástico limpiando la ventana de la sonda con la ayuda de un pincel y/o papel.

El objeto de realizar dos medidas mezclando la muestra de alfalfa se debe a que dentro de estas muestras hay más heterogeneidad, con esto se intenta que el registro sea

más representativo de toda la muestra, ya que al no estar triturado existen zonas con más ramas que hojas y viceversa.



*Figura 20. Muestras de alfalfa triturada (A) y empacada (B). Registro de espectros NIR de muestras de alfalfa.*



## **IV Resultados**

### **IV.1 Urea, biuret y gallinaza**

**IV.1.1 Detección de urea, biuret y gallinaza en muestras de alfalfa**

**IV.1.2 Cuantificación de urea, biuret y gallinaza en muestras de alfalfa**

### **IV.2 Proteína y humedad**

**IV.2.1 Modelos iniciales (campaña 2004). Alfalfa triturada y empacada**

**IV.2.2 Ampliación y desarrollo de nuevos modelos a lo largo de los años 2004-2005-2006. Alfalfa triturada**

### **IV.3 Determinación de Ca, K, P, Fe, Mn, Na y Zn**

### **IV.4 Determinación de tocoferoles en alfalfa**



#### **IV.1 Urea, biuret y gallinaza**

El objetivo de este capítulo es detectar y cuantificar urea, biuret y gallinaza en muestras de alfalfa triturada, que como se ha indicado anteriormente, se añaden para aumentar el porcentaje de proteína en las alfalfas.

Para el desarrollo de este trabajo se dispone de 75 muestras de alfalfa de origen conocido recolectadas durante los años 2004, 2005 y 2006, con una composición en proteína bruta comprendida entre el 13.06% y 21.04%, y un valor medio y desviación estándar de 18.84% y 1.50% respectivamente. Los valores de proteína se obtienen por la aplicación a muestras de alfalfa de modelos NIR desarrollados previamente para este parámetro tal y como se indicará más adelante (apartado IV.2).

Con objeto de disponer de muestras con los diferentes aditivos se toma una alícuota de cada una de las 75 muestras de alfalfa trituradas de composición conocida y se dopa mediante pesada, con urea, biuret y gallinaza, de forma que para la experiencia se cuenta con 75 muestras de alfalfa sin dopar, 75 muestras dopadas con urea, 75 muestras dopadas con biuret y 75 muestras dopadas con gallinaza.

La urea y el biuret (Scharlau, reactivos grado ACS) se añaden directamente a las muestras de alfalfa, mientras que la gallinaza (procedente de una explotación avícola) se tritura previamente. Los aditivos y las muestras de alfalfa se mezclan cuidadosamente, no presentando anomalías observables después del dopado. En el caso de la urea y el biuret, los niveles de enriquecimiento empleados están comprendidos entre 0.01 y 10.00% en peso con un mínimo de 5 muestras por nivel. En el caso de la gallinaza el nivel de enriquecimiento está comprendido entre 1.00 y 25.00 % con un mínimo de 12 muestras por nivel. En la tabla 3 se describen los niveles de dopado para cada uno de los aditivos.

Tabla 3. Muestras de alfalfa dopada.

Aditivo	Margen de dopado (% en peso)	Niveles de dopado (% en peso)
Urea	0.01-10.00	0.01; 0.10; 0.20; 0.50; 1.00; 2.00; 3.00; 4.00; 5.00; 5.50; 7.00; 8.50; 10.00
Biuret	0.01-10.00	0.01; 0.10; 0.20; 0.50; 1.00; 2.00; 3.00; 4.00; 5.00; 5.50; 7.00; 8.50; 10.00
Gallinaza	1.00-25.00	1.00; 5.00; 10.00; 15.00; 20.00; 25.00

En la figura 21 se puede observar los espectros de una muestra sin dopar, así como la misma muestra dopada con un 1% de cada aditivo.

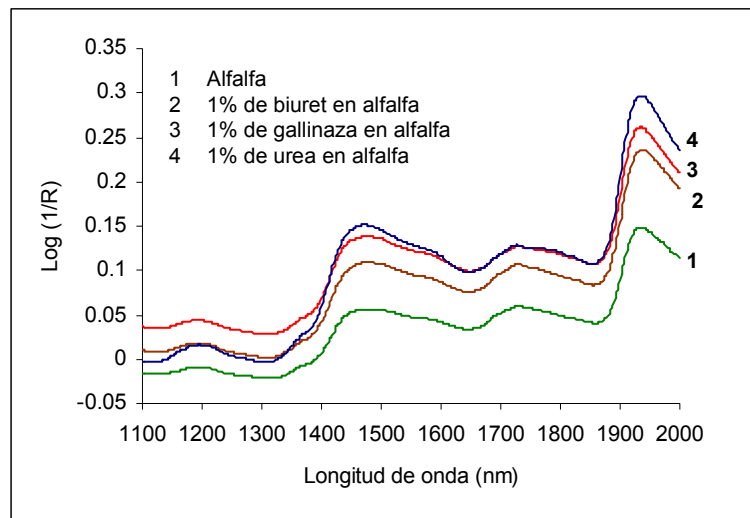


Figura 21. Espectros de la alfalfa sin aditivos y en presencia de los diferentes aditivos.



En la figura 22 se señalan los espectros de una muestra de alfalfa y de los correspondientes dopantes: urea, biuret y gallinaza separadamente.

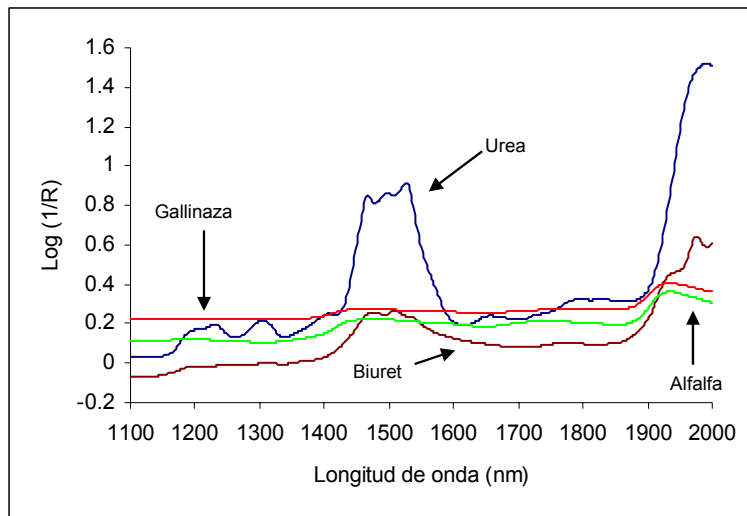


Figura 22. Espectros de una muestra de alfalfa y de cada uno de los diferentes aditivos.

Como se ha indicado en la metodología, el total de muestras se divide en dos partes, un conjunto de calibración (65 muestras) y uno de validación (10 muestras); tanto en las muestras sin dopar como en las dopadas. En la tabla 4 se resumen algunos descriptores estadísticos de las muestras del conjunto de calibración o entrenamiento.

Tabla 4. Muestras de alfalfa triturada dopada. Descriptores estadísticos de las muestras del conjunto de calibración o entrenamiento.

Aditivo	N	Margen de dopado	Media	SD
		(% en peso)		
Urea	65	0.01-10.00	3.39	3.12
Biuret	65	0.01-10.00	3.39	3.12
Gallinaza	65	1.00-25.00	12.63	8.42

#### IV.1.1 Detección de urea, biuret y gallinaza en muestras de alfalfa

Con objeto de poder clasificar correctamente las muestras en el grupo al que pertenecen y detectar la presencia de cada uno de los aditivos estudiados, se utiliza el método de reconocimiento de pautas prefijadas DPLS (página 41).

Para obtener los modelos mediante el algoritmo DPLS se utiliza la información espectral NIR de todas las muestras recogidas en la tabla 4, que constituyen el conjunto de entrenamiento, en este caso sin realizar ningún pretratamiento de los datos espectrales.

Los modelos DPLS desarrollados son cuatro, uno para cada aditivo, con las clases presencia/ausencia y un modelo global en el cual se incluyen los tres aditivos estudiados con las clases presencia/ausencia para cada uno de ellos. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5, donde se describen algunos de los parámetros de mayor interés en los modelos generados. El número de factores PLS necesarios para desarrollar el modelo DPLS como se ha indicado anteriormente (página 41) es siempre superior al que cabe esperar en un PLS con fines cuantitativos. Los datos correspondientes al rango (en unidades *dummy*), desviación estándar, SEC y SECV se refieren a las variables *dummy* utilizadas en este proceso.

Tabla 5. Presencia de aditivos en alfalfa. Ecuaciones de discriminación.

Aditivo	N	SD	Rango	RSQ	SEC	SECV	Grup. cross-val.	Nº fac. PLS
<b>Urea</b>	130	0.50	0.0-1.50	0.755	0.25	0.33	6	17
<b>Biuret</b>	130	0.50	0.0-1.50	0.953	0.11	0.18	6	22
<b>Gallinaza</b>	130	0.50	0.0-1.50	0.934	0.13	0.20	6	19
<b>Global</b>	260	0.43	0.0-1.30	0.793	0.20	0.24	4	25

*Validación interna:* para este propósito se emplean las mismas muestras que se han utilizado para generar los modelos. Los grupos de validación cruzada son 6 para la discriminación de urea, biuret y gallinaza y 4 en el modelo global. El porcentaje de muestras correctamente clasificadas por los modelos se recoge en la tabla 6.

*Validación externa:* se utilizan muestras que no han sido empleadas en el desarrollo de los modelos anteriores. En este caso se dispone de 10 muestras con presencia de cada uno de los aditivos (30 muestras) y otras 10 sin ninguno de ellos. El porcentaje de muestras correctamente clasificadas por los modelos desarrollados se exponen en la tabla 6.

Tabla 6. Análisis clasificatorio. Muestras correctamente clasificadas (%).

Aditivo	Validación Interna		Validación Externa		
	Presencia	Ausencia	Presencia	Ausencia	
<b>Urea</b>	96.9	95.4	90.0	80.0	
<b>Biuret</b>	100	100	100	90.0	
<b>Gallinaza</b>	100	100	100	100	
<b>Global</b>	Urea	93.8	93.8	Urea	90.0
	Biuret	100		Biuret	100
	Gallinaza	100		Gallinaza	100
					80.0

Los resultados obtenidos indican que se puede detectar la presencia de estos aditivos en muestras de alfalfa con un alto porcentaje de muestras clasificadas correctamente. En los modelos individuales el porcentaje medio de muestras correctamente clasificadas con aditivos es del 98.7% en validación interna y de un 93.3% en externa. Los resultados para el modelo global indican, también, un alto porcentaje de muestras correctamente clasificadas con aditivos, 96.9% en validación interna y 92.5% en validación externa, con resultados algo más bajos que los obtenidos para cada aditivo de forma individual.

Las muestras con aditivos mal clasificadas corresponden siempre al aditivo urea; en los modelos individuales fueron: dos muestras con un 1% de urea en validación interna y una muestra del 0.1% de urea en la validación externa. En el modelo global las muestras con aditivos mal clasificadas fueron: dos muestras con un 1% y otras dos de

un 0.5% de urea, y en validación externa una muestra con el 0.5% de urea, sin mostrar tendencias (valores bajos o altos).

Los modelos generados se pueden aplicar en la detección de aditivos en alfalfas desconocidas siguiendo dos formas de actuación:

- De manera sistemática antes de realizar el análisis de proteína de las muestras.
- Cuando los valores de proteína sean anómalos, mediante espectroscopía NIR se pueden detectar muestras que están fuera de la aplicabilidad de las ecuaciones, o bien al realizar un análisis de componentes principales previo a la determinación de proteína, si su distancia de Mahalanobis (H) es superior a 3.

Una vez que un aditivo se detecta se puede pasar a la evaluación del mismo mediante modelos cuantitativo desarrollados para tal efecto.

#### **IV.1.2 Cuantificación de urea, biuret y gallinaza en muestras de alfalfa**

El desarrollo de los modelos cuantitativos se realiza mediante el método de regresión por mínimos cuadrados parciales modificados, MPLS (página 46).

Para obtener los modelos para cada aditivo mediante MPLS se utiliza la información espectral y los datos de referencia correspondientes a los porcentajes de los aditivos (urea, biuret y gallinaza). Las muestras que se utilizan son las de la tabla 4 (página 65), que constituyen el denominado conjunto de calibración.

Previamente se procede a realizar un *análisis de componentes principales PCA* (página 43), con los datos espectrales de las muestras del conjunto de calibración. A estos datos espectrales se aplican los diferentes pretratamientos matemáticos (corrección de la dispersión mediante Standard MSC, SNV, Detrend, derivadas de diferente orden, con diferentes *gaps* y suavizados), que combinados nos proporcionan 20 archivos diferentes para cada aditivo. La elección del número de componentes principales, construcción del nuevo espacio espectral, detección de *outliers* (espectros fuera de la población tomando como valor límite  $H=3$ ) y devolución del conjunto de datos espectrales originales sin los *outliers* espectrales es parte del proceso. Posteriormente sobre estos 20 archivos se realizan 20 pretratamientos diferentes sobre los datos

espectrales por cada archivo, obteniendo 400 modelos diferentes para cada aditivo al aplicar la regresión MPLS, utilizando los datos de referencia para su desarrollo. Al final se elige de entre los 400 modelos para cada aditivo, aquel que mejores estadísticos muestre como modelo final.

Durante el proceso de validación cruzada se identifican los *outlier* que presentan altos residuales teniendo en cuenta el criterio T (página 49), eliminando aquellas muestras que en las que T sea superior a 2.5. De todos los modelos generados, se elige el mejor, teniendo en cuenta los parámetros RSQ, SEC, SECV y RPD (páginas 50 y 52). A continuación se indican solamente los tratamientos en el modelo elegido para cada aditivo.

En la tabla 7 se muestran los pretratamientos espectrales, el número de componentes principales utilizados, y la variabilidad espectral explicada, siempre superior a un 99%, en el *análisis de componentes principales PCA*.

Tabla 7. *Análisis de componentes principales. Urea, biuret y gallinaza en alfalfa.*

<b>Aditivo</b>	<b>Pretratamiento</b>		<b>N° de componentes principales</b>	<b>Variabilidad explicada (%)</b>
<b>Urea</b>	Standard MSC	2,8,6,1	6	99.42
<b>Biuret</b>	Standard MSC	2,8,6,1	6	99.45
<b>Gallinaza</b>	Ninguno	1,4,4,1	5	99.71

Las muestras eliminadas mediante el criterio H han sido dos en el caso del biuret y la gallinaza y ninguna cuando el aditivo es urea.

Los parámetros estadísticos de los *modelos MPLS* elegidos como óptimos, que permiten la cuantificación de urea, biuret y gallinaza en muestras de alfalfa se muestran en la tabla 8, indicando en esta el número de muestras que finalmente forman los modelos, una vez eliminadas las muestras que incumplen el criterio H y el criterio T. Las muestras eliminadas por este último criterio son 7 para la urea, 5 para el biuret y 4 para la gallinaza. En dicha tabla se incluye el número de grupos de validación cruzada, número de factores PLS, RSQ, rango de aplicabilidad, desviación estándar, error de calibración y error de validación cruzada, así como el pretratamiento utilizado.

Tabla 8. Estadísticos de los modelos de calibración MPLS para urea, biuret y gallinaza en alfalfa.

	Aditivos		
	Urea	Biuret	Gallinaza
<b>N</b>	58	58	59
<b>Pretratamiento</b>	SNV 2,4,4,1	Ninguno 2,8,6,1	Detrend 1,4,4,1
<b>SD (% en peso)</b>	2.97	3.22	8.19
<b>Rango (% en peso)</b>	0.00-11.90	0.00-12.99	0.00-38.08
<b>RSQ</b>	0.990	0.991	0.925
<b>SEC (% en peso)</b>	0.29	0.31	2.24
<b>SECV (% en peso)</b>	0.59	0.45	3.21
<b>N° fact. PLS</b>	7	8	6
<b>Grupos Cross- val.</b>	6	6	6

Mediante el proceso de *validación interna* se obtienen los parámetros de predicción como SEP, BIAS y SEP (C) (página 51). Al representar los valores de referencia frente a los predichos por NIR se obtienen los gráficos de validación interna para cada uno de los aditivos: urea biuret y gallinaza (figuras 23, 24 y 25). Los resultados indican que es posible la cuantificación de cada uno de los tres aditivos con errores de predicción (SEP) de 0.27%; 0.29%; y 2.06% para urea, biuret y gallinaza en alfalfa respectivamente.

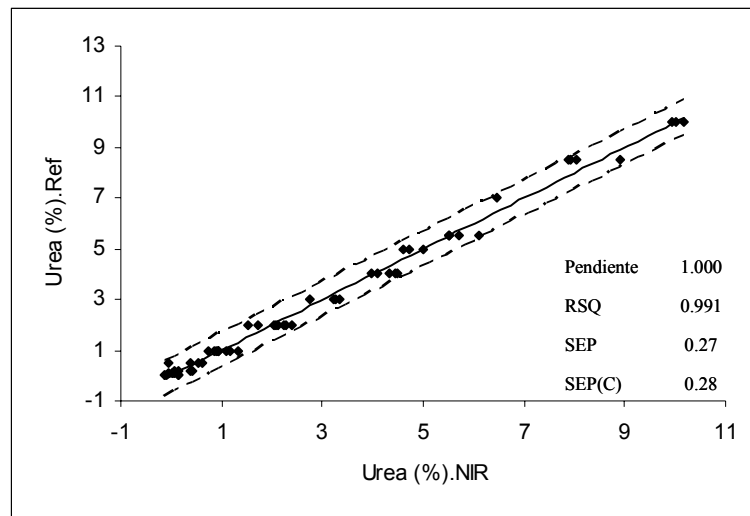


Figura 23. Comparación de los valores de referencia con los valores predichos por el modelo MPLS en NIR para la determinación de urea en alfalfa. Validación interna.

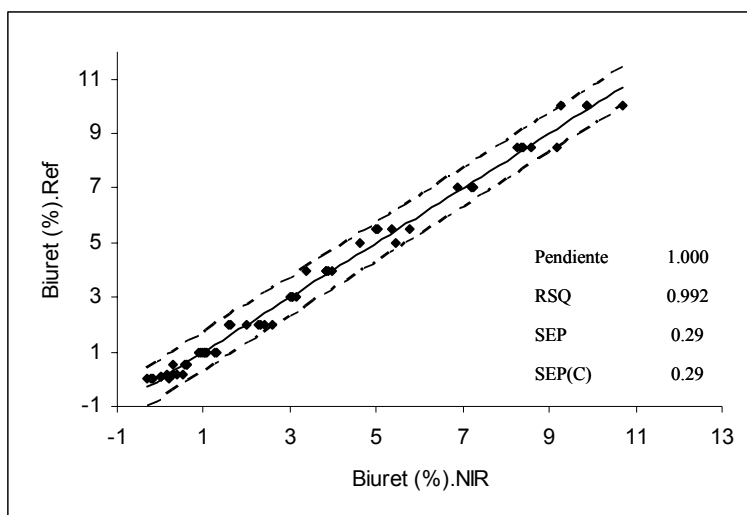


Figura 24. Comparación de los valores de referencia con los valores predichos por el modelo MPLS en NIR para la determinación de biuret en alfalfa. Validación interna.

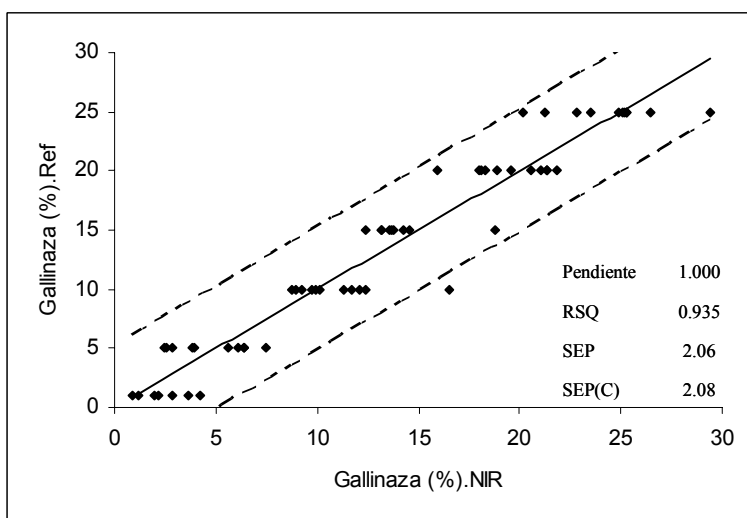


Figura 25. Comparación de los valores de referencia con los valores predichos por el modelo MPLS en NIR para la determinación de gallinaza. Validación interna.

La capacidad de predicción de los modelos se evalúa con el parámetro RPD (página 52), siendo en todos los casos superior a 2.5 (considerado como óptimo), los valores obtenidos para el RPD de 11.0, 11.1 y 4.0 para urea, biuret y gallinaza nos indican que los modelos desarrollados pueden ser aplicados a muestras desconocidas.

Para comprobar la bondad de los modelos de calibración se realiza una *validación externa* con un conjunto de 10 muestras de alfalfa triturada dopada con urea, biuret y gallinaza, que no pertenecen al colectivo de calibración, y que presentan un rango de concentración de los diferentes aditivos dentro de la aplicabilidad de las ecuaciones obtenidas (tabla 8). De estas muestras se conocen los valores de referencia (tabla 9).

*Tabla 9. Muestras de alfalfa triturada dopada. Descriptores estadísticos de las muestras del conjunto de validación externa.*

Aditivo	N	Mínimo	Máximo	Media	SD
		(% en peso)			
Urea	10	0.01	10.00	2.88	3.42
Biuret	10	0.01	10.00	2.88	3.42
Gallinaza	10	1.00	25.00	12.20	8.26

Los resultados proporcionados por la metodología NIR y los obtenidos por dopado de las muestras de alfalfa con urea, biuret y gallinaza se comparan utilizando el test t de Student para valores apareados. Los niveles de confianza alcanzados aplicando dicho test se recogen en la tabla 10. El nivel de confianza, para estos parámetros, es mayor que 0.05 (elegido como el mínimo); lo que indica que no hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos por ambos métodos. En la tabla 10 también se recogen otros dos parámetros como son el RMSE (página 52) y la media de los residuales, indicadores del error que se puede cometer al predecir muestras desconocidas.

*Tabla 10. Validación externa. Cuantificación de urea, biuret y gallinaza en alfalfa.*

Aditivos	p (nivel de confianza)	Media de los residuales	RMSE
		(% en peso)	
Urea	0.42	0.78	1.17
Biuret	0.65	0.54	0.76
Gallinaza	0.33	4.64	6.31



## IV.2 Proteína y humedad

Se acomete en esta sección la determinación algunos parámetros mayoritarios (proteína y humedad) en muestras de alfalfa bajo las formas de presentación más habituales (alfalfa triturada y empacada) y a lo largo de diferentes campañas agrícolas.

Se considera que la proteína bruta es un buen indicador del valor energético de la alfalfa, y conjuntamente con la humedad, son los dos parámetros que más influyen en el valor de este producto en el mercado.

La cuantificación de proteína y humedad en muestras de alfalfa con distintas formas de presentación (triturada y empacada) surge como consecuencia del interés de la empresa Aquimisa S.L. de utilizar la tecnología NIR como método de rutina para estos parámetros en su laboratorio (ver Anexo 2).

Los *datos de referencia* para el desarrollo de los modelos de cuantificación para proteína y humedad de este capítulo se realizan en la empresa Aquimisa S.L. (laboratorio acreditado para ensayos en productos agroalimentarios con número 221/LE451) siguiendo los procedimientos que a continuación se detallan:

*Humedad*<sup>106</sup>: el contenido en agua de un producto se define convencionalmente como la pérdida de masa que experimenta en condiciones determinadas.

El producto se seca a vacío ( $\leq 100$  mm Hg) a 95° C - 100° C, durante 5 h, se deja enfriar en un desecador y se pesa. El contenido en agua en la muestra se calcula por diferencia de masas de la muestra húmeda y seca y se expresa en porcentaje de humedad.

*Proteína*<sup>107</sup>: se lleva a cabo por el método Kjeldahl, la muestra conteniendo nitrógeno orgánico se ataca por ácido sulfúrico concentrado, mineralizando el nitrógeno hasta iones amonio. La digestión se acelera con un catalizador compuesto de sulfato de cobre y selenio. Los iones amonio en medio fuertemente básico se destilan como amoníaco, que se recoge sobre ácido bórico, originando una cantidad equivalente de borato, el cual se valora directamente con ácido clorhídrico.

---

<sup>106</sup> AOAC 963.22. *Moisture*. Association of Official Analytical Chemists Methods of Analysis. AOAC International. **60**, 322 (1997).

<sup>107</sup> AOAC 984.13. *Protein*. Association of Official Analytical Chemists Methods of Analysis. AOAC International. **67**, 869 (1984).

La determinación de estos dos parámetros se desarrolla en varias etapas. En un estudio inicial se construyen los modelos con muestras de alfalfa que pertenecen al año 2004, disponiendo de dos formas de presentación, triturada y empacada. En los estudios posteriores se incorporan muestras de alfalfa al modelo inicial de alfalfas trituradas correspondientes a la cosecha del 2005 con objeto de optimizarlo como método de rutina en el laboratorio (a partir de Julio de 2005), además de generar modelos únicamente con las muestras de la campaña del 2005.

#### IV.2.1 Modelos iniciales (campaña 2004). Alfalfa triturada y empacada

Se lleva a cabo el estudio sobre 65 muestras de alfalfa triturada y 55 muestras de alfalfa empacada. Los contenidos de humedad y proteína en el conjunto de calibración se realizan siempre por duplicado, se expresan en % en peso y los resultados obtenidos para las distintas formas de presentación de la muestra se resumen en la tabla 11.

*Tabla 11. Proteína y humedad en muestras de alfalfa triturada y empacada. Descriptores estadísticos de las muestras del conjunto de calibración. Campaña 2004.*

	Componente	N	Mínimo	Máximo	Media	SD
			(% en peso)			
Triturada	Proteína	65	15.81	23.07	19.50	1.63
	Humedad	65	6.53	10.66	8.60	1.17
Empacada	Proteína	55	17.21	23.08	19.95	1.45
	Humedad	55	6.73	10.66	8.68	1.09

Los valores de proteína y humedad están dentro del rango habitual para este tipo de muestras; los valores obtenidos en alfalfa triturada y empacada en ambos casos son muy similares.

El conjunto de espectros adquiridos con tecnología NIR y sonda de fibra óptica para las muestras de alfalfa triturada y empacada, se muestra en las figuras 26 y 27 respectivamente.

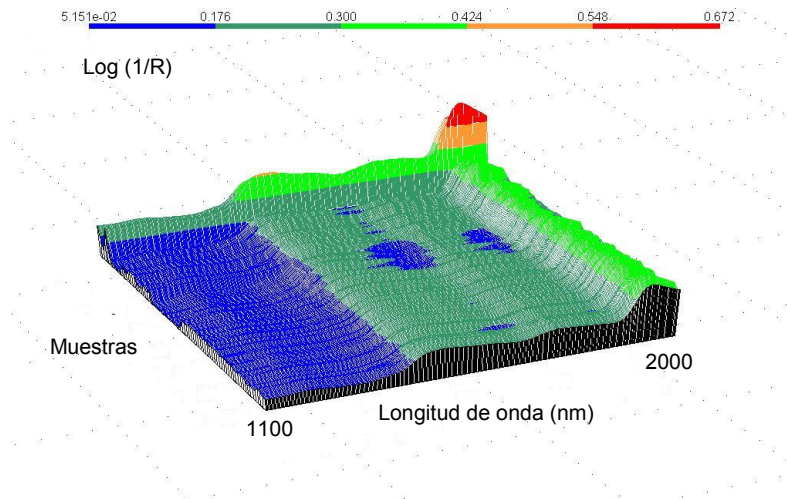


Figura 26. Espectros NIR de 65 muestras de alfalfa triturada.

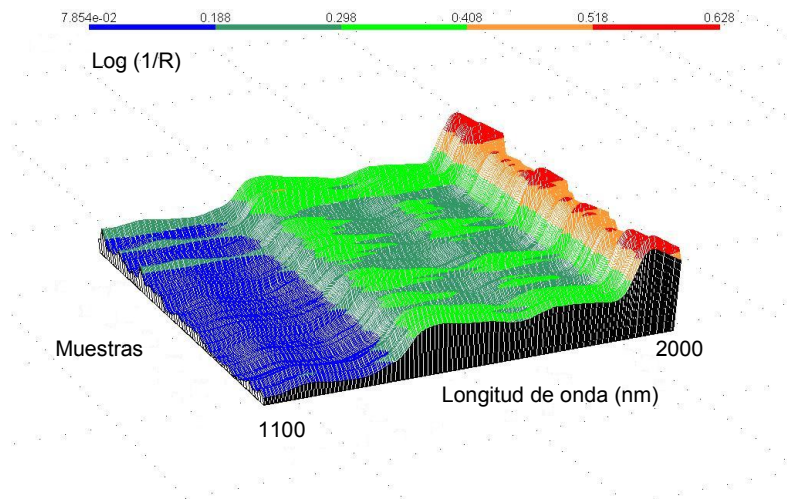


Figura 27. Espectros NIR de 55 muestras de alfalfa empacada.

La morfología de los espectros de alfalfa triturada y empacada es diferente tal y como se puede apreciar en las figuras 26, 27 y 28, debido en gran parte a la falta de homogeneidad de las muestras empacadas, aspecto reflejado en los espectros de las mismas.

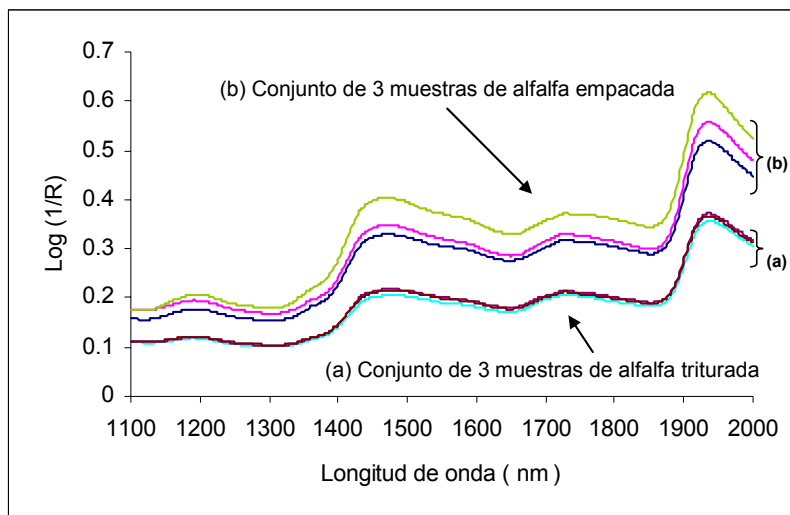


Figura 28. Espectros NIR de 3 muestras de (a) alfalfa triturada y (b) alfalfa empacada.

Sobre el conjunto de espectros obtenidos se realizan los tratamientos matemáticos correspondientes al *análisis de componentes principales PCA* (página 43). Combinando los diferentes pretatamientos matemáticos (corrección de dispersión mediante Standard MSC, Detrend, SNV, derivadas de diferente orden, diferentes segmentos y suavizados) dan lugar a 20 archivos diferentes para cada parámetro a estimar. La elección del número de componentes principales utilizados se hace teniendo en cuenta por un lado, que la variabilidad espectral explicada sea superior al 95%, que la variabilidad sea constante y que la desviación estándar de las puntuaciones (*scores*) de las muestras también lo sea.

Teniendo en cuenta la distancia de Mahalanobis ( $H$ ), la detección de espectros anómalos se realiza con el criterio estadístico  $H > 3$ , retornando al conjunto de datos espectrales originales después de eliminar los *outliers* espectrales en esta etapa. Posteriormente se realiza la regresión MPLS eligiendo el modelo más óptimo entre los 400 desarrollados atendiendo a los mejores parámetros estadísticos (RSQ, SEC, SECV, RPD (páginas 50 y 52)). En esta etapa se eliminan los *outliers* que en la validación cruzada presenten altos residuales ( $T > 2.5$ ).

A continuación se indican solamente los tratamientos elegidos para cada parámetro (proteína y humedad) en las dos formas de presentación.

En la tabla 12 se muestran los pretratamientos espectrales, el número de componentes principales utilizados y la variabilidad espectral explicada (siempre superior a un 99%), en el *análisis de componentes principales PCA*.

Tabla 12. *Análisis de componentes principales. Proteína y humedad en alfalfa triturada y empacada. Campaña 2004.*

	Componente	Pretratamiento		Nº de componentes principales	Variabilidad explicada (%)
Triturada	Proteína	Standard MSC	1,4,4,1	7	99.49
	Humedad	Detrend	1,4,4,1	6	99.57
Empacada	Proteína	Standard MSC	2,8,6,1	7	99.36
	Humedad	Ninguno	0,0,1,1	5	99.97

Las muestras eliminadas mediante el criterio H han sido dos en el caso de la proteína y una en el caso de la humedad en las muestras de alfalfa triturada. En el caso de las muestras empacadas se eliminan dos muestras para la humedad y ninguna para la proteína.

Los parámetros estadísticos de los *modelos MPLS* elegidos como óptimos, que permiten la cuantificación de proteína y la humedad en las muestras de alfalfa triturada y empacada, se muestran en las tablas 13 y 14, indicando como N el número de muestras que finalmente forman los modelos, una vez eliminadas las muestras que incumplen el criterio H y el criterio T. Las muestras eliminadas para el parámetro proteína por este último criterio son cuatro en muestras de alfalfa triturada y ninguna en el caso de las muestras empacadas. En el caso de la humedad se eliminan tres muestras en alfalfas trituradas y dos para las alfalfas empacadas. En dichas tablas se incluye el número de grupos de validación cruzada, número de factores PLS, RSQ, rango de aplicabilidad, desviación estándar, error de calibración y error de validación cruzada, así como el pretratamiento utilizado.

Tabla 13. Estadísticos de los modelos de calibración MPLS para proteína en alfalfa triturada y empacada. Campaña 2004.

	Proteína	
	Triturada	Empacada
<b>N</b>	59	55
<b>Pretratamiento</b>	Standard MSC 2,4,4,1	SNV 2,4,4,1
<b>SD (% en peso)</b>	1.61	1.45
<b>Rango (% en peso)</b>	14.66-24.33	15.60-24.29
<b>RSQ</b>	0.871	0.826
<b>SEC (% en peso)</b>	0.58	0.61
<b>SECV (% en peso)</b>	0.82	1.17
<b>N° fact. PLS</b>	6	7
<b>Grupos Cross- val.</b>	6	6

En los estadísticos del modelo de calibración de la proteína se aprecia una ligera mejoría en el caso de las alfalfas trituradas. Los descriptivos SEC y SECV presentan valores más bajos, y el valor de RSQ presenta un pequeño incremento en el caso de la alfalfa triturada. El rango de aplicabilidad es similar, si bien en el caso de la alfalfa triturada es algo más amplio.

Tabla 14. Estadísticos de los modelos de calibración MPLS para humedad en alfalfa triturada y empacada. Campaña 2004.

	Humedad	
	Triturada	Empacada
<b>N</b>	61	50
<b>Pretratamiento</b>	Detrend 2,4,4,1	Ninguno 0,0,1,1
<b>SD (% en peso)</b>	1.17	1.10
<b>Rango (% en peso)</b>	5.06-12.06	5.39-11.98
<b>RSQ</b>	0.981	0.935
<b>SEC (% en peso)</b>	0.16	0.28
<b>SECV (% en peso)</b>	0.41	0.32
<b>N° fact. PLS</b>	8	6
<b>Grupos Cross- val.</b>	6	6

Los valores de los descriptores estadísticos para el parámetro humedad en muestras trituradas y empacadas tienen un comportamiento semejante al de la proteína. Los modelos no están contruidos con las mismas muestras, sin embargo los parámetros presentan datos de referencia similares, dando lugar a estadísticos del modelo de calibración parecidos.

Al representar los valores de referencia frente a los predichos por NIR se obtienen los gráficos de *validación interna* para cada uno de los parámetros, proteína (figuras 29 y 30) y humedad (figuras 31 y 32), tanto en muestras trituradas como empacadas. Los resultados indican que es posible la cuantificación de proteína y humedad en muestras de alfalfa triturada con errores de predicción (SEP) de 0.54% y 0.15% para la proteína y humedad respectivamente. En el caso de la alfalfa empacada los valores del SEP son de 0.56% para la proteína y de 0.26% para la humedad. De nuevo destacar que los errores son ligeramente inferiores en el caso de la alfalfa triturada.

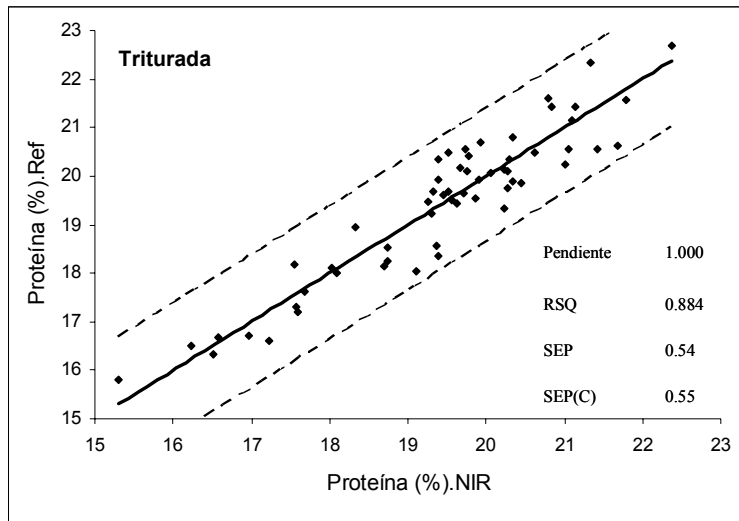


Figura 29. Comparación de los valores de referencia con los valores predichos por el modelo MPLS en NIR para la determinación proteína en alfalfa triturada. Validación interna. Campaña 2004.

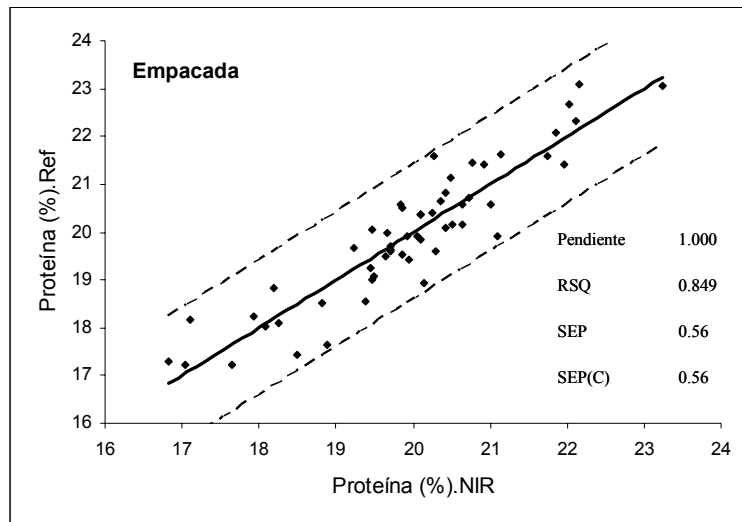


Figura 30. Comparación de los valores de referencia con los valores predichos por el modelo MPLS en NIR para la determinación proteína en alfalfa empacada. Validación interna. Campaña 2004.

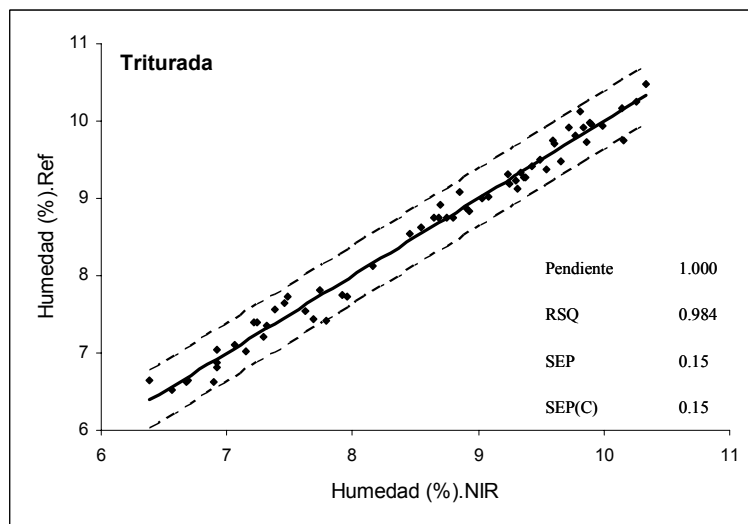


Figura 31. Comparación de los valores de referencia con los valores predichos por el modelo MPLS en NIR para la determinación humedad en alfalfa triturada. Validación interna. Campaña 2004.



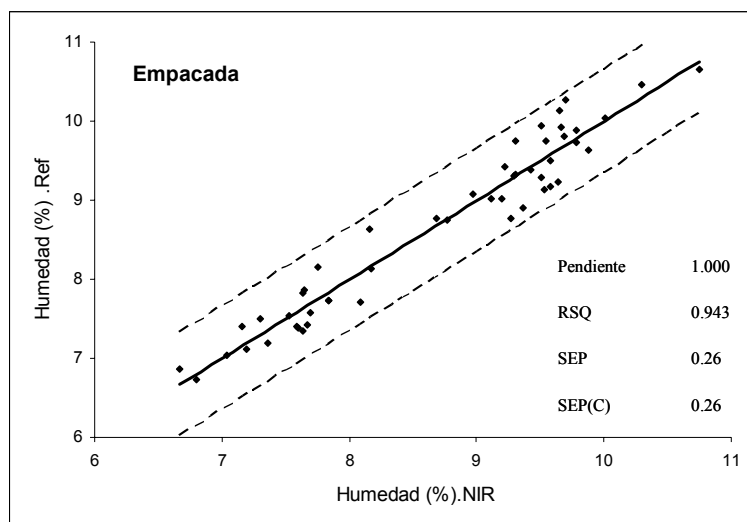


Figura 32. Comparación de los valores de referencia con los valores predichos por el modelo MPLS en NIR para la determinación humedad en alfalfa empacada. Validación interna. Campaña 2004.

Si se comparan los resultados de los parámetros proteína y humedad, se observa que los mejores son para la humedad. Esto es justificable, pues en el caso de la humedad existe una correlación en el espectro NIR con el contenido de agua a las longitudes de onda de 1190, 1450 y 1940 nm; mientras que en el caso de la proteína existe dificultad para relacionar los resultados obtenidos por métodos de análisis de referencia con los datos espectroscópicos en NIR. La determinación de proteína bruta se considera como  $\% N \times 6.25$ , pero el nitrógeno no tiene repuesta vibracional en NIR. Sin embargo, si se pueden medir en el infrarrojo cercano las vibraciones de enlaces N-H, que son parte de la molécula proteica. En definitiva el NIR y el método de referencia Kjeldhal no miden el mismo tipo de especie química y la correlación entre ambas puede ser variable en función del tipo de muestras.

La capacidad de predicción de los modelos desarrollados se evalúa con el parámetro RPD, los valores obtenidos se muestran en la tabla 15 siendo en todos los casos superior a 2.5 (considerado como óptimo), indicando que los modelos desarrollados pueden ser aplicados a muestras desconocidas.

Tabla 15. Valores de RPD para humedad y proteína en alfalfa triturada y empacada. Campaña 2004.

	Proteína		Humedad	
	Triturada	Empacada	Triturada	Empacada
RPD	2.9	2.6	7.9	4.2

A la vista de estos resultados se puede señalar que aunque todos los modelos desarrollados son aplicables a muestras desconocidas, en el caso de la alfalfa triturada la capacidad de predicción es mayor que en el caso de la alfalfa empacada y en todos los casos la capacidad de predicción de la humedad es superior al de la proteína.

Para comprobar la bondad de los modelos de calibración se realiza una *validación externa* a un conjunto de 10 muestras de alfalfa triturada y a otro conjunto de 10 muestras de alfalfa empacada, que no pertenecen al colectivo de calibración, y que presentan un rango de concentración de proteína y humedad dentro de la aplicabilidad de las ecuaciones obtenidas (tablas 13 y 14). De estas muestras se conocen los valores de referencia (tabla 16).

Los resultados proporcionados por la metodología NIR y los obtenidos por los métodos de referencia para la proteína y humedad en muestras de alfalfa triturada y empacada se comparan utilizando el test t de Student para valores apareados.

El nivel de confianza, para ambos parámetros y formas de presentación, es mayor que 0.05 (elegido como el mínimo); lo que indica que no hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos por ambos métodos. Se recogen en la tabla 17 los niveles de confianza así como los parámetros RMSE (página 52) y el porcentaje relativo entre el valor obtenido por el método NIR y por el de referencia frente al valor de referencia, indicadores del error que se puede cometer al predecir muestras desconocidas.

Tabla 16. Proteína y humedad en muestras de alfalfa triturada y empacada. Descriptores estadísticos de las muestras del conjunto de validación externa. Campaña 2004.

	Componente	N	Mínimo	Máximo	Media	SD
			(% en peso)			
Triturada	Proteína	10	15.56	21.81	19.03	1.88
	Humedad	10	6.73	11.24	8.95	1.29
Empacada	Proteína	10	17.21	21.24	19.73	1.25
	Humedad	10	7.03	11.26	9.25	1.06

Tabla 17. Validación externa. Cuantificación de proteína y humedad en muestras de alfalfa triturada y empacada. Campaña 2004.

	Componente	p (nivel de confianza)	RMSE (% en peso)	Diferencias (%)
Triturada	Proteína	0.69	1.82	8.5
	Humedad	0.07	0.87	9.4
Empacada	Proteína	0.40	1.46	6.7
	Humedad	0.49	0.33	3.1

#### IV.2.2 Ampliación y desarrollo de nuevos modelos a lo largo de los años 2004-2005-2006. Alfalfa triturada

Se describe la puesta a punto de un modelo global de calibración NIR que permita la cuantificación de los parámetros proteína y humedad en muestras de alfalfas trituradas en el laboratorio de análisis Aquimisa S.L. (Salamanca) como método de rutina a lo largo del tiempo. Se utilizan muestras de alfalfa trituradas al ser la forma habitual utilizada por la empresa en sus análisis.

Para conseguirlo se parte del modelo de calibración de la campaña del 2004 (apartado IV 4.2.1) que corresponde a muestras de alfalfa suministradas por la empresa durante los meses de octubre a noviembre y que destacan por ser muestras del final de la campaña con un porcentaje de humedad hasta el 10.66% (tabla 11).

Posteriormente se realizan dos calibraciones graduales en el año 2005, la primera correspondiente a los primeros meses de campaña (mayo y junio), denominada 2005 (I), con contenidos de humedad hasta 41.47% y la segunda con muestras de alfalfa de los meses de junio y julio, denominada 2005 (II), con contenidos de humedad hasta 18.20 %. Por último, se combinan las muestras del año 2004 con las del año 2005 (tabla 19), para dar lugar a un conjunto de calibración con la mayor variabilidad posible en el tipo de muestras de alfalfa a lo largo de una campaña habitual (de mayo a noviembre). En la tabla 18 se expone la época de recolección de las diferentes muestras de alfalfa utilizadas en la generación de los modelos a lo largo de los años.

Tabla 18. Periodo de recolección de las muestras utilizadas en cada modelo.

	<b>Modelo</b>				
	<b>2004 (inicial)</b>	<b>2005 (I)</b>	<b>2005 (II)</b>	<b>2004+2005 (I)</b>	<b>2004+2005 (II)</b>
<b>Periodo de recolección de las muestras</b>	Octubre- Noviembre de 2004	Mayo- Junio de 2005	Junio- Julio de 2005	Octubre- Noviembre de 2004. ----- Mayo-Junio de 2005	Octubre- Noviembre de 2004. ----- Junio-Julio de 2005

Tabla 19. Datos estadísticos de proteína y humedad en alfalfas trituradas de los grupos de calibración. Modelos a lo largo de los años.

Modelo	Proteína				
	N	Mínimo	Máximo	Media	SD
		(% en peso)			
2005 (I)	43	11.52	20.93	18.21	2.27
2005 (II)	57	15.40	21.00	19.22	1.55
2004+2005 (I)	108	7.90	23.07	17.71	3.49
2004+2005 (II)	134	14.7	23.07	19.19	1.73
Modelo	Humedad				
	N	Mínimo	Máximo	Media	SD
		(% en peso)			
2005 (I)	43	6.68	41.47	14.95	7.73
2005 (II)	57	7.20	18.20	10.77	2.44
2004+2005 (I)	108	6.50	22.70	10.13	3.07
2004+2005 (II)	134	6.53	28.80	10.32	3.84

Los datos del *análisis de componentes principales PCA* (página 43), se resumen en las tablas 20 y 21 para los conjuntos de la proteína y la humedad respectivamente.

*Tabla 20. Análisis de componentes principales. Proteína en alfalfa triturada. Modelos a lo largo de los años.*

	<b>Proteína</b>			
	<b>2005 (I)</b>	<b>2005 (II)</b>	<b>2004+2005 (I)</b>	<b>2004+2005 (II)</b>
<b>Pretratamiento</b>	SNV 1,4,4,1	Standard MSC 2,10,10,1	SNV 1,4,4,1	SNV 2,4,4,1
<b>N° de componentes principales</b>	4	5	7	12
<b>Variabilidad explicada (%)</b>	99.60	99.46	99.78	99.31
<b>N° de muestras eliminadas criterio H</b>	3	3	4	7

*Tabla 21. Análisis de componentes principales. Humedad en alfalfa triturada. Modelos a lo largo de los años.*

	<b>Humedad</b>			
	<b>2005 (I)</b>	<b>2005 (II)</b>	<b>2004+2005 (I)</b>	<b>2004+2005 (II)</b>
<b>Pretratamiento</b>	Standard MSC 2,4,4,1	SNV 2,4,4,1	Standard MSC 2,4,4,1	SNV 2,10,10,1
<b>N° de componentes principales</b>	4	5	9	9
<b>Variabilidad explicada (%)</b>	99.19	99.48	99.44	99.71
<b>N° de muestras eliminadas criterio H</b>	3	3	5	5

Se procede posteriormente a la obtención de los *modelos MPLS* de calibración siguiendo la metodología indicada anteriormente. Las tablas 22 y 23 reflejan el resumen de los estadísticos de los modelos elegidos como óptimos, indicando el número de

muestras que finalmente los forman (N) una vez eliminadas las muestras mediante el criterio H (anteriormente indicado) y el criterio T.

Tabla 22. Estadísticos de los modelos de calibración MPLS para proteína en alfalfa triturada. Modelos a lo largo de los años.

	<b>Proteína</b>			
	<b>2005 (I)</b>	<b>2005 (II)</b>	<b>2004+2005 (I)</b>	<b>2004+2005 (II)</b>
<b>N</b>	39	52	96	118
<b>Pretratamiento</b>	Standard MSC 2,4,4,1	SNV 2,4,4,1	Standard MSC 2,4,4,1	Ninguno 2,4,4,1
<b>SD (% en peso)</b>	2.49	1.47	2.47	1.48
<b>Rango (% en peso)</b>	8.32-23.23	14.96-23.80	10.65-25.47	14.89-23.75
<b>RSQ</b>	0.998	0.973	0.983	0.895
<b>SEC (% en peso)</b>	0.13	0.24	0.33	0.48
<b>SECV (% en peso)</b>	0.40	0.72	0.57	0.69
<b>N° fact. PLS</b>	7	7	9	8
<b>Grupos Cross- val.</b>	7	6	5	5
<b>N° de muestras eliminadas criterio T</b>	1	2	8	9

Tabla 23. Estadísticos de los modelos de calibración MPLS para humedad en alfalfa triturada. Modelos a lo largo de los años.

	<b>Humedad</b>			
	<b>2005 (I)</b>	<b>2005 (II)</b>	<b>2004+2005 (I)</b>	<b>2004+2005 (II)</b>
<b>N</b>	37	52	98	124
<b>Pretratamiento</b>	Standard MSC 2,4,4,1	Standard MSC 2,4,4,1	Standard MSC 2,4,4,1	Detrend 2,4,4,1
<b>SD (% en peso)</b>	2.68	2.17	2.58	2.54
<b>Rango (% en peso)</b>	3.57-19.65	4.05-17.04	2.18-17.63	2.21-17.45
<b>RSQ</b>	0.998	0.998	0.995	0.995
<b>SEC (% en peso)</b>	0.13	0.11	0.18	0.19
<b>SECV (% en peso)</b>	0.27	0.26	0.32	0.38
<b>N° fact. PLS</b>	6	7	9	10
<b>Grupos Cross- val.</b>	7	6	5	5
<b>N° de muestras eliminadas criterio T</b>	3	2	5	5

La razón de realizar de forma secuencial estos modelos se debe al error encontrado cuando se aplica el modelo 2004 (inicial) (11.3% en el caso de la humedad y 18.7% en el caso de la proteína) en la validación externa a muestras ciegas del año 2005, teniendo en cuenta que las muestras del 2005 si pertenecen al conjunto espectral según el análisis de componentes principales.

De entre las posibles causas, se destacan dos: el cambio de campaña agrícola a lo largo de los años, dependiente de las condiciones climáticas y la influencia de las diferentes estaciones a lo largo del año.

Al hacer un análisis de componentes principales con las muestras de los años 2004 y 2005 (sin ningún pretratamiento espectral) se observa que las muestras de las campañas 2004 y 2005 se encuentran muy separadas y aunque todas las muestras cumplen la distancia de Mahalanobis  $H=3$ , ocupan posiciones del subespacio espectral diferentes como se refleja en la figura 33, donde se representan diez muestras tomadas al azar de los conjuntos mencionados anteriormente (los dos primeros componentes explican el 99.87% de la variabilidad espectral).

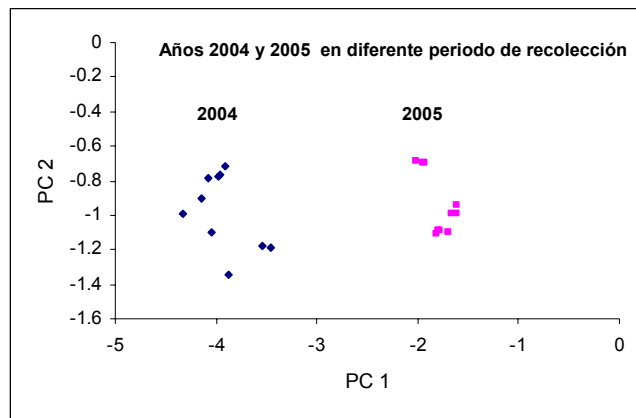


Figura 33. Representación de las puntuaciones o scores de los dos primeros componentes principales de diez muestras al azar de cada año en diferente periodo de recolección. Campaña 2004 y 2005.

Se pretende posteriormente diferenciar en la campaña del año 2005, el periodo de recolección de la alfalfa, para ello se realiza un análisis de componentes principales (sin necesitar ningún pretratamiento espectral previo) representando los dos primeros



componentes (que explican el 99.41 de la variabilidad espectral). Se observa que las muestras de la misma campaña agrícola pero de distinto periodo de recolección ocupan un lugar muy próximo dentro del subespacio espectral, tal y como se puede observar en la figura 34 (en la que se representan los *scores* de 10 muestras de cada grupo), lo que induce a pensar que dentro de las campaña 2005 no hay grandes diferencias en el periodo de recolección.

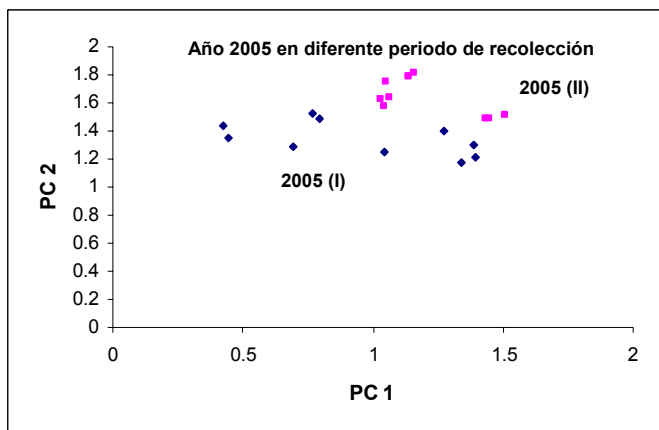


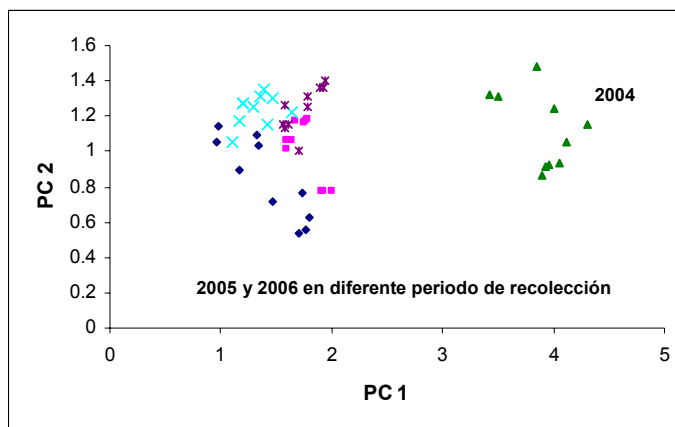
Figura 34. Representación de las puntuaciones o *scores* de los dos primeros componentes principales de diez muestras al azar de dos periodos de recolección. Campaña 2005.

A la vista de los resultados obtenidos se plantea un modelo general 2004+2005 (II) donde se refleje la máxima variabilidad de las muestras. A pesar de elevar ligeramente el valor del SECV; el espacio espectral conseguido de esta manera es mucho mayor y el modelo será aplicable a un número mayor de muestras en el análisis de rutina.

Así se hizo, y con el modelo 2004+2005 (II) de calibración desarrollado se predicen muestras de alfalfa procedentes de la empresa Aquimisa en las temporadas 2005 a partir del mes de julio (547 muestras) y posteriormente en la temporada 2006 (500 muestras).

Antes de aplicar el modelo a las muestras del periodo 2006 se realiza un planteamiento similar al anterior, aplicar un tratamiento de componentes principales (sin ningún pretratamiento espectral previo) representando los dos primeros componentes (que explican el 99.68 de la variabilidad espectral) y se observa que los *scores* de 10 muestras elegidas al azar de la campaña 2006 en cada uno de los periodos de

recolección se sitúan próximas a las del 2005, por lo que no se necesitaría en principio desarrollar un nuevo modelo o ampliar el existente, sin perjuicio de que existan muestras que queden fuera de la distancia de Mahalanobis  $H=3$  y no se puedan predecir (figura 35).



*Figura 35. Representación de las puntuaciones o scores de los dos primeros componentes principales de diez muestras al azar de las campaña agrícola 2004, 2005 y 2006.*

Hay que destacar que para contrastar los modelos desarrollados, al ser aplicados se someten a una validación externa con muestras ciegas por parte de la empresa con análisis paralelos. En la tabla 24 se puede observar el porcentaje de error obtenido al contrastar el método NIR con el método de referencia, el número de muestras utilizadas para la validación (N) y la evolución del mismo.

*Tabla 24. Validación externa con muestras ciegas por parte de la empresa de los modelos de calibración MPLS para proteína y humedad en alfalfa triturada. Modelos a lo largo de los años.*

<b>Modelo</b>	<b>Proteína</b>		<b>Humedad</b>	
	N	Error (%)	N	Error (%)
<b>2004 en muestras de 2005</b>	43	11.3	43	18.7
<b>2005 (I)</b>	35	11.5	34	11.7
<b>2005 (II)</b>	35	8.4	35	7.9
<b>2004+2005 (I)</b>	35	7.3	34	6.8
<b>2004+2005 (II)</b>	35	4.3	35	3.4
<b>2004+2005 (II) en campaña 2005</b>	48	7.4	44	6.0
<b>2004+2005 (II) en campaña 2006</b>	28	9.0	28	7.8

En la figura 36 se observa la evolución del error para cada uno de los parámetros en estudio. Se advierte como este error baja para ambos parámetros una vez establecido en rutina el modelo 2004+2005 (II) para las campañas 2005 y 2006; situándose el error por debajo de un 10%.

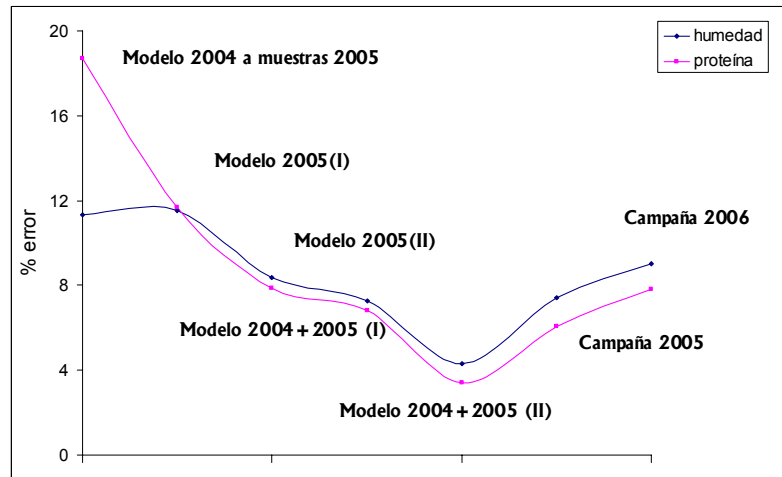


Figura 36. Representación de los errores obtenidos en la validación externa de los diferentes modelos con muestras ciegas. Modelos a lo largo de los años.

Durante estas dos campañas agrícolas, tal y como se ha señalado anteriormente, se han realizado determinaciones de proteína y humedad en 1047 muestras de alfalfa triturada en diferentes muestreos. El valor medio de cada parámetro y la evolución de proteína y humedad a lo largo de las campañas 2005 y 2006 se representan en la figura 37.

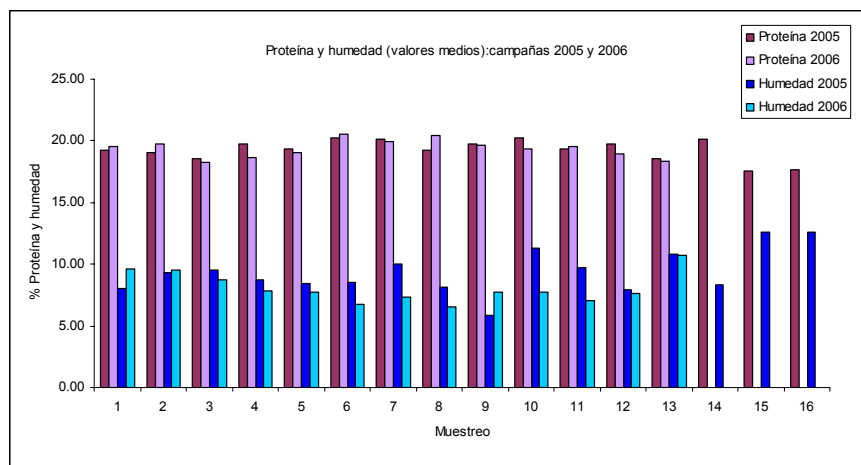


Figura 37. Valores medios de proteína y humedad en las campañas 2005 y 2006.

En la figura se aprecia como el parámetro proteína se mantiene constante en torno a un 19% (más concretamente en el año 2005 el valor medio se sitúa en un 19.29% con una desviación estándar de 0.83%, mientras que en el año 2006 el valor medio es de 19.40% y una desviación estándar de 0.71%). Mientras que el parámetro humedad presenta una mayor variabilidad, con un valor alrededor de un 8-10% (más concretamente en el año 2005 el valor medio es de un 9.37% con una desviación estándar de 1.80%, mientras que en el año 2006 el valor medio es de 8.08% con una desviación estándar de 1.24%).

A lo largo de estas dos campañas agrícolas se han encontrado muestras que no pertenecen al conjunto espectral según el análisis de componentes principales realizado previamente a la predicción de los parámetros proteína y humedad, ( $H > 3$ ), valor tomado como máximo permitido. Se comprueba posteriormente que los valores excesivamente elevados de distancia de Mahalanobis corresponden a muestras que no son de alfalfa sino a mezclas con otros cultivos. Estas muestras no se incluyen en los archivos para la ampliación de los modelos de alfalfa triturada, si bien se conservan por si en un futuro se estimase conveniente ampliar los modelos para más de un tipo de cultivo.

Además, mediante el análisis de componentes principales y la distancia de Mahalanobis a muestra vecina (NH), se identifican muestras cuyo valor de NH es superior a 0.6, que aunque si pueden ser predichas mediante los modelos desarrollados, pueden mejorar los modelos aportando mayor variabilidad espectral.

### IV.3 Determinación de Ca, K, P, Fe, Mn, Na y Zn.

En este capítulo se realiza la cuantificación algunos elementos presentes en muestras de alfalfa triturada pertenecientes a la campaña agrícola 2004, eligiendo tanto elementos mayoritarios como minoritarios.

*Las medidas químicas de referencia* se realizan a partir de las muestras de alfalfa triturada sometidas a desecación con estufa a 105 °C durante 24 horas. Una vez secas, se Trituran y se someten a mineralización en sistema de microondas, midiendo la composición en la disolución resultante mediante espectroscopía de plasma ICP-óptico.

La mineralización se lleva a cabo pesando 0.5 g de muestra seca y triturada, introduciéndola posteriormente en una cápsula de alta presión. En una primera fase se añaden 5 mL de HNO<sub>3</sub> c. y se aplica una potencia de 300 watos durante 5 minutos. Una vez fría la muestra, se añaden otros 5 mL de HNO<sub>3</sub> c. y 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, aplicando una potencia de 300 watos durante 7 minutos. La muestra se enfría a temperatura ambiente, se enrasa a 100 mL con agua destilada y se conserva a 4° C hasta su análisis.

La mineralización y las medidas mediante espectroscopía de plasma ICP-óptico se realizan en el Servicio de Análisis Químico de la Universidad de Salamanca. Los resultados obtenidos son la media de dos determinaciones y se expresan como mg kg<sup>-1</sup> de alfalfa. Los límites de detección fueron los siguientes: Ca = 12 mg kg<sup>-1</sup>; K = 22 mg kg<sup>-1</sup>; P = 28 mg kg<sup>-1</sup>; Fe = 8 mg kg<sup>-1</sup>; Mn = 10 mg kg<sup>-1</sup>; Na = 26 mg kg<sup>-1</sup>; y Zn = 10 mg kg<sup>-1</sup>. Además de los anteriores elementos se realiza análisis de Cu y Se, si bien todas las muestras presentan contenidos por debajo de los límites de detección, que en este caso eran de 16 mg kg<sup>-1</sup> para el Cu y 10 mg kg<sup>-1</sup> para el Se.

La tabla 25 recoge algunos descriptores estadísticos, y el número de muestras que forman el conjunto de calibración en cada caso.

Tabla 25. Datos estadísticos de los análisis químicos en alfalfa triturada ( $\text{mg kg}^{-1}$ ).

Elemento	N	Mínimo	Máximo	Media	SD
<b>Ca</b>	57	$8.55 \cdot 10^3$	$24.7 \cdot 10^3$	$15.6 \cdot 10^3$	$4.2 \cdot 10^3$
<b>K</b>	57	$14.9 \cdot 10^3$	$29.1 \cdot 10^3$	$22.1 \cdot 10^3$	$3.8 \cdot 10^3$
<b>P</b>	57	$1.11 \cdot 10^3$	$4.00 \cdot 10^3$	$2.46 \cdot 10^3$	824
<b>Fe</b>	55	110	$1.87 \cdot 10^3$	686	504
<b>Mn</b>	57	18	70	37	13
<b>Na</b>	57	132	$1.95 \cdot 10^3$	803	629
<b>Zn</b>	46	10	40	19	6

Se puede observar que el número de muestras es menor en los casos del Zn y Fe, en el caso del Zn se debe a que en 11 muestras no se detectó dicho elemento; en el caso del Fe, 2 muestras presentan problemas durante su análisis.

El conjunto de espectros adquiridos con tecnología NIR y sonda de fibra óptica para las muestras de alfalfa triturada se muestra en la figura 38.

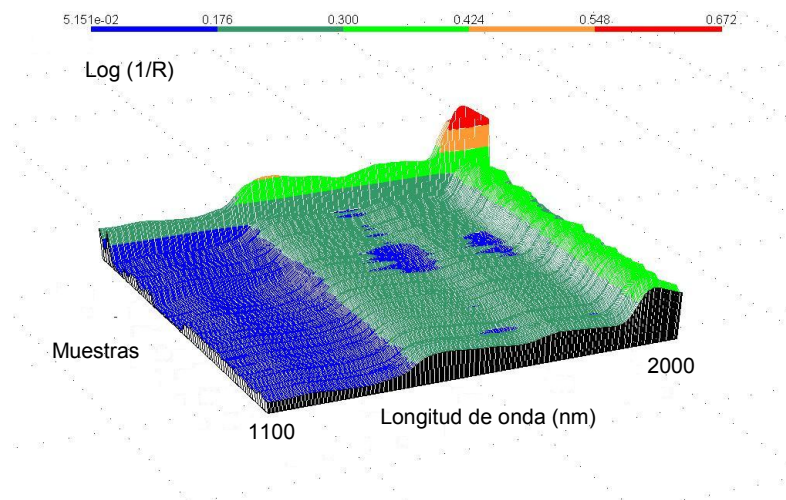


Figura 38. Espectros NIR de 57 muestras de alfalfa triturada.

De este conjunto sólo se toman los espectros de las muestras de las que se dispone de dato de referencia para formar los conjuntos de calibración, de esta manera se utilizan 55 muestras para el hierro, 46 para el cinc y las 57 para el resto de los elementos.

La elección del número de componentes principales, construcción del nuevo espacio espectral, detección de *outliers* (espectros fuera de la población tomando como valor límite  $H=3$ ) y retorno del conjunto de datos espectrales originales sin los *outliers* espectrales es parte del proceso que se lleva a cabo mediante el *análisis de componentes principales PCA* (página 43). Los resultados se muestran en la tabla 26, donde se indican los pretratamientos espectrales, el número de componentes principales utilizado, la variabilidad espectral explicada (siempre superior a un 98%) y el número de muestras eliminadas por el criterio  $H>3$ .

Tabla 26. *Análisis de componentes principales. Ca, K, P, Fe, Mn, Na y Zn en alfalfa triturada.*

<b>Elemento</b>	<b>Pretratamiento</b>	<b>Nº de componentes principales</b>	<b>Variabilidad explicada (%)</b>	<b>Muestras eliminadas criterio H</b>
<b>Ca</b>	Ninguno 0,0,1,1	5	99.96	0
<b>K</b>	Standard MSC 2,4,4,1	9	98.57	0
<b>P</b>	Detrend 0,0,1,1	6	99.90	1
<b>Fe</b>	Standard MSC 2,4,4,1	9	98.50	1
<b>Mn</b>	Detrend 0,0,1,1	6	99.90	1
<b>Na</b>	Standard MSC 2,8,6,1	7	99.17	1
<b>Zn</b>	SNV 1,4,4,1	6	99.38	0



En las tablas 27 y 28 se muestran los descriptores estadísticos y los tratamientos correspondientes a la *calibración MPLS* de cada elemento en alfalfa triturada cuyos parámetros RSQ, SEC, SECV y RPD resultan más óptimos entre los 400 modelos obtenidos para cada elemento, junto con el rango de aplicabilidad. La evaluación de los modelos mediante validación cruzada permite identificar *outlier* que presenten altos residuales de acuerdo con el criterio  $T > 2.5$ . Para el Fe y el Mn no se elimina ninguna muestra, para Ca y K se eliminan dos muestras, para P se eliminan tres muestras, y en el caso del Na y del Zn se eliminan cuatro muestras.

*Tabla 27. Estadísticos de los modelos de calibración MPLS para Ca, K, P, Fe, Mn, Na y Zn en alfalfa triturada ( $\text{mg kg}^{-1}$ ).*

<b>Elemento</b>	<b>N</b>	<b>Pretratamiento</b>	<b>RSQ</b>	<b>SEC</b>	<b>SECV</b>	<b>N° de fac. PLS</b>	<b>Grupos cross-val</b>
<b>Ca</b>	55	SNV 2,4,4,1	0.878	$1.46 \cdot 10^3$	$2.75 \cdot 10^3$	7	6
<b>K</b>	55	SNV 1,4,4,1	0.899	$1.18 \cdot 10^3$	$1.65 \cdot 10^3$	7	6
<b>P</b>	53	Standard MSC 1,4,4,1	0.909	244	340	7	6
<b>Fe</b>	54	SNV 2,4,4,1	0.948	111	237	7	6
<b>Mn</b>	56	SNV 2,4,4,1	0.843	5.4	9.6	6	6
<b>Na</b>	52	Ninguno 2,4,4,1	0.979	92.8	195	7	6
<b>Zn</b>	42	Ninguno 1,4,4,1	0.853	2.0	3.5	7	7

Tabla 28. Estadísticos de calibración obtenidos en la determinación de Ca, K, P, Fe, Mn, Na y Zn en muestras de alfalfa triturada. Valores en  $\text{mg kg}^{-1}$ .

Elemento	Pretratamiento	Mínimo	Máximo	Media	SD
<b>Ca</b>	SNV 2,4,4,1	$3.24 \cdot 10^3$	$28.4 \cdot 10^3$	$15.8 \cdot 10^3$	$4.2 \cdot 10^3$
<b>K</b>	SNV 1,4,4,1	$11.1 \cdot 10^3$	$33.4 \cdot 10^3$	$22.3 \cdot 10^3$	$3.7 \cdot 10^3$
<b>P</b>	Standard MSC 1,4,4,1	87.7	$4.94 \cdot 10^3$	$2.51 \cdot 10^3$	809
<b>Fe</b>	SNV 2,4,4,1	0	$2.13 \cdot 10^3$	664	487
<b>Mn</b>	SNV 2,4,4,1	0	78	37	14
<b>Na</b>	Ninguno 2,4,4,1	0	$2.72 \cdot 10^3$	791	642
<b>Zn</b>	Ninguno 1,4,4,1	2.9	35	19	5.3

En la figura 39 se presenta la comparación de los valores obtenidos en el laboratorio mediante el método de referencia con respecto a los que se predice mediante espectroscopía NIR para Ca, K, P, Fe, Mn, Na y Zn en muestras de alfalfa triturada. Los resultados de este proceso de validación interna nos indican que es posible la determinación de estos elementos con los errores de predicción SEP indicados en la misma figura.

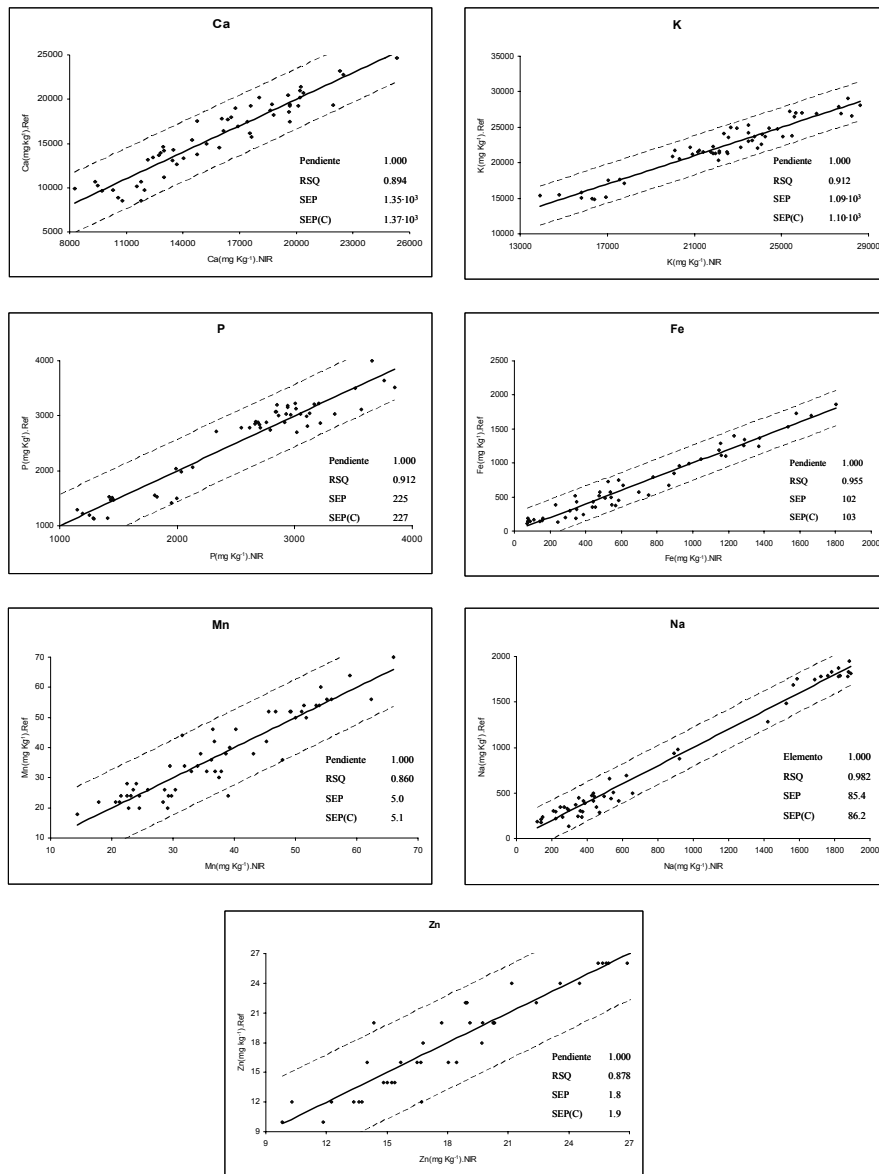


Figura 39. Comparación de los valores de referencia con los valores predichos por el modelo MPLS en NIR para la determinación de Ca, K, P, Fe, Mn, Na y Zn en muestras de alfalfa triturada. Validación interna.

La capacidad de predicción de los modelos desarrollados se evalúa con el parámetro RPD (página 52), y los resultados se muestran en la tabla 29, indicando que los modelos desarrollados pueden ser aplicados a muestras desconocidas (en todos los casos es superior a 2.5 considerado como óptimo).

Tabla 29. Valores de RPD para Ca, K, P, Fe, Mn, Na y Zn en muestras de alfalfa triturada.

	Ca	K	P	Fe	Mn	Na	Zn
RPD	3.1	3.4	3.6	4.8	2.8	7.5	2.9

Para comprobar la bondad de los modelos de calibración se realiza una *validación externa* a un conjunto de 12 muestras de alfalfa triturada, que no pertenecen al colectivo de calibración, y que presentan un rango de concentración los elementos dentro de la aplicabilidad de las ecuaciones obtenidas (tabla 28). En el caso del cinc solamente se utilizan 8 muestras que contienen este elemento de las 12 anteriormente mencionadas. De estas muestras se conocen los valores de referencia (tabla 30).

Tabla 30. Composición de las muestras del conjunto de validación externa para Ca, K, P, Fe, Mn, Na y Zn en alfalfa triturada.

	Ca	K	P	Fe	Mn	Na	Zn
Mínimo	$9.76 \cdot 10^3$	$15.9 \cdot 10^3$	$1.13 \cdot 10^3$	132	24	246	12
Máximo	$24.6 \cdot 10^3$	$23.6 \cdot 10^3$	$3.07 \cdot 10^3$	$1.24 \cdot 10^3$	64	$1.91 \cdot 10^3$	26
Media	$17.0 \cdot 10^3$	$20.1 \cdot 10^3$	$2.31 \cdot 10^3$	926	42	893	19
SD	$5.5 \cdot 10^3$	$2.5 \cdot 10^3$	667	439	16	629	5

Los resultados proporcionados por la metodología NIR y los obtenidos por los métodos de referencia para Ca, K, P, Fe, Mn, Na y Zn en muestras de alfalfa triturada se comparan utilizando el test t de Student para valores apareados.

Los niveles de confianza alcanzados aplicando dicho test se recogen en la tabla 31, siendo en todos los casos mayor que 0.05 (elegido como el mínimo); lo que indica que no hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos por ambos métodos. Se recogen en dicha tabla los parámetros RMSE (página 52) y el porcentaje relativo entre el valor obtenido por el método NIR y por el de referencia frente al valor de referencia, indicadores del error que se puede cometer al predecir muestras desconocidas. En los elementos mayoritarios (Ca, K y P) se observa que las diferencias entre los valores de referencia y los predichos mediante la espectroscopía NIR son siempre menores a un 10%, en cuanto a los minoritarios (Fe, Mn, Na y Zn) las diferencias se sitúan entre un 10.4 y un 22.7%. En el caso del hierro y del sodio estas diferencias pueden deberse a las bajas concentraciones de estos elementos asociados a compuestos orgánicos sensibles en NIR<sup>68,69,74</sup>, en el caso del cinc las diferencias pueden ser atribuibles a la proximidad de los valores obtenidos con el límite de detección del mismo.

*Tabla 31. Validación externa. Cuantificación de Ca, K, P, Fe, Mn, Na y Zn en muestras de alfalfa triturada.*

<b>Elemento</b>	<b>p (nivel de confianza)</b>	<b>RMSE (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Diferencias (%)</b>
<b>Ca</b>	0.79	1.89·10 <sup>3</sup>	7.7
<b>K</b>	0.87	887	3.4
<b>P</b>	0.14	311	9.3
<b>Fe</b>	0.83	191	20.1
<b>Mn</b>	0.78	6	10.4
<b>Na</b>	0.27	176	22.7
<b>Zn</b>	0.26	3	14.5

#### IV.4 Determinación de tocoferoles en alfalfa.

La cuantificación de tocoferoles en alfalfa en muestras de alfalfa triturada tanto frescas como deshidratadas recogidas en un periodo comprendido entre junio de 2004 y julio de 2005, es el objetivo de este capítulo.

*La medida química de referencia* se realiza utilizando un procedimiento que incluye hidrólisis alcalina y extracción del material insaponificable, previo a la separación y cuantificación mediante cromatografía líquida de alta eficacia con detección de fluorescencia.

Se pesan del orden de 2 g de alfalfa, se colocan en un erlenmeyer de 250 mL y se añaden los reactivos en el siguiente orden: 35 mL de etanol, 5 mL de una disolución acuosa de ácido ascórbico al 10%, 25 mL de agua y 10 mL de una disolución acuosa de hidróxido potásico al 60%. La mezcla se mantiene protegida de la luz y en agitación continua durante 2 horas.

Los analitos se extraen con 25 mL hexano después de agitar durante un minuto y lavar con 10 mL de agua dos veces agitando durante 30 segundos. El proceso se realiza dos veces, mezclando los extractos orgánicos. El disolvente orgánico del extracto se elimina en un rotavapor a vacío a unos 50 °C y el residuo seco se redisuelve en 25 mL de metanol. Para limpiar el extracto antes de su inyección en el sistema cromatográfico se filtra con membranas de nylon de 0.45 µm de tamaño de poro.

La determinación cromatográfica se lleva a cabo en un cromatógrafo de líquidos Agilent Technologies 1100 equipado con un sistema de desgasificación a vacío en continuo, una bomba de gradiente binaria con mezcla en alta presión y una columna C<sub>18</sub> (Luna, 250 x 4.6 mm, 5 µm, Phenomenex). Se emplea un detector de fluorescencia ( $\lambda_{em} = 296 \text{ nm} / \lambda_{ex} = 335 \text{ nm}$ ). La fase móvil utilizada es una mezcla de agua: metanol (4:96, v/v) en régimen isocrático con un caudal de 1.0 mL/min. El volumen de disolución que se inyecta es de 20 µL.

En la figura 40 se puede ver el cromatograma de un patrón de tocoferoles (a) y el correspondiente a una muestra de alfalfa (b). Los límites de detección obtenidos fueron los siguientes:  $\delta$ -tocoferol = 0.05 mg/100g;  $(\gamma+\beta)$  tocoferol = 0.05 mg/100g; y  $\alpha$ -tocoferol = 0.06 mg/100g.

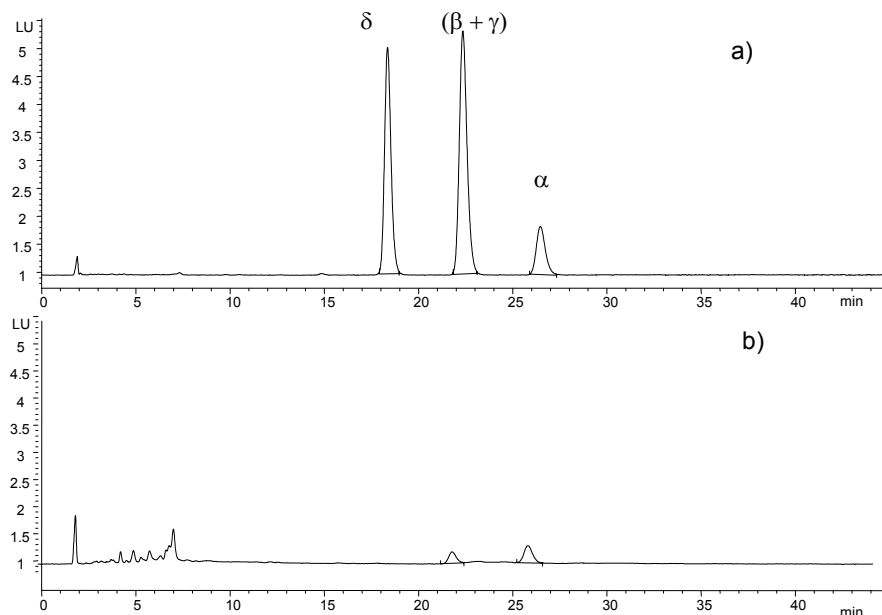


Figura 40. Cromatogramas de patrones de tocoferoles(a) y de una muestra de alfalfa (b).

Se lleva a cabo el estudio sobre 35 muestras de alfalfa deshidratada y sobre 34 muestras de alfalfa fresca. Siguiendo el procedimiento de trabajo indicado anteriormente, se realiza la determinación de  $\alpha$ - y  $(\gamma+\beta)$ -tocoferol por el método cromatográfico descrito anteriormente. El  $\delta$ -tocoferol no se detectó en ninguna de las muestras de alfalfa analizadas en este trabajo.

En la tabla 32 se recoge el contenido de  $\alpha$ -tocoferol y  $(\gamma+\beta)$ -tocoferol en las muestras de alfalfa frescas y deshidratadas obtenido mediante cromatografía líquida. Como era de esperar, el contenido de tocoferoles es menor en las muestras

deshidratadas debido a la degradación de los mismos durante el tratamiento de deshidratación.

Tabla 32. Composición química del conjunto de calibración (mg/100g).

Muestras	Componente	Mínimo	Máximo	Media	SD
Frescas	$\alpha$ -tocoferol	2.92	5.16	4.42	0.51
	$(\gamma+\beta)$ -tocoferol	0.21	0.48	0.36	0.07
Deshidratadas	$\alpha$ -tocoferol	0.55	3.73	1.86	0.67
	$(\gamma+\beta)$ -tocoferol	0.07	0.25	0.18	0.04

El conjunto de espectros adquiridos con tecnología NIR y sonda de fibra óptica para las muestras de alfalfa triturada se muestra en la figura 41.

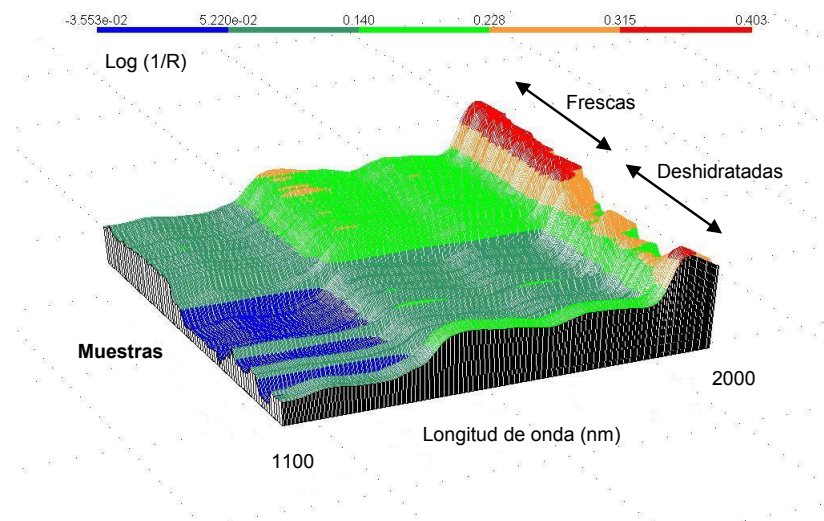


Figura 41. Espectros NIR de 69 muestras de alfalfa triturada (fresca y deshidratada).

En esta figura se puede observar la diferente morfología de los espectros de muestras de alfalfa triturada fresca y deshidratada, presentando los primeros valores de Log (1/R) superiores, atribuibles, entre otras causas, a un mayor contenido en humedad de las mismas.



A pesar de la diferencia observada en los espectros NIR entre las muestras de alfalfa fresca y deshidratada el objetivo es poder cuantificar  $\alpha$ -tocoferol y  $(\gamma+\beta)$ -tocoferol en ambas formas de presentación, por lo que se engloban las 69 muestras en el mismo conjunto.

Inicialmente con los espectros de las muestras se realiza un *análisis de componentes principales PCA* (página 43). Los espectros anómalos se detectan utilizando la distancia de Mahalanobis tomando como límite  $H=3$ . Las muestras con un valor de  $H>3$  se considera que no pertenecen a la población, con la que posteriormente se desarrollaran los modelos. En la tabla 33 se muestran los pretratamientos espectrales, el número de componentes principales utilizados y la variabilidad espectral explicada (siempre superior a un 99%). Las muestras eliminadas mediante el criterio H han sido 4 (1 muestra deshidratada y 3 muestras frescas) en el caso del  $\alpha$ -tocoferol y 5 (2 muestras deshidratada y 3 muestras frescas) en el caso de  $(\gamma+\beta)$ -tocoferol.

Tabla 33. *Análisis de componentes principales. Tocoferoles en alfalfa triturada (fresca y deshidratada).*

Componente	Pretratamiento	Nº de componentes principales	Variabilidad explicada (%)
$\alpha$ -tocoferol	Detrend 0,0,1,1	7	99.97
$(\gamma+\beta)$ -tocoferol	Ninguno 2,8,6,1	5	99.54

Una vez obtenidos los conjuntos, se realiza la *regresión MPLS*, utilizando los datos espectrales conjuntamente con los de referencia para su desarrollo. De todos los modelos desarrollados (400 modelos) para cada componente  $\alpha$ -tocoferol y  $(\gamma+\beta)$ -tocoferol se elige el que mejores resultados ofrezca.

Durante el proceso de validación cruzada se identifican los *outlier* que presentan altos residuales, teniendo en cuenta el criterio T (página 49), eliminando aquellas muestras en las que el valor de T sea superior a 2.5. Para el  $\alpha$ -tocoferol se eliminan 5 (2 muestras deshidratada y 3 muestras frescas) y en el caso del  $(\gamma+\beta)$ -tocoferol se eliminan 4 (1 muestra deshidratada y 3 muestras frescas).

De todos los modelos generados, se elige el mejor, teniendo en cuenta los parámetros RSQ, SEC, SECV y RPD (páginas 50 y 52). A continuación se expone únicamente los tratamientos elegidos para cada parámetro indicando el número de grupos de validación cruzada, número de factores PLS, RSQ, rango de aplicabilidad, desviación estándar, error de calibración y error de validación cruzada, número de muestras que forman finalmente el modelo, así como el pretratamiento espectral utilizado (tabla 34).

Tabla 34. Estadísticos de los modelos de calibración MPLS para  $\alpha$ -tocoferol y  $(\gamma+\beta)$ -tocoferol en alfalfa triturada (fresca y deshidratada).

	Tocoferoles	
	$\alpha$ -tocoferol	$(\gamma+\beta)$ -tocoferol
<b>N</b>	60	60
<b>Pretratamiento</b>	SNV 2,8,6,1	Standard MSC 2,10,10,1
<b>SD (mg/100 g)</b>	1.41	0.11
<b>Rango (% en peso)</b>	0.09-5.16	0.11-0.48
<b>RSQ</b>	0.946	0.956
<b>SEC (mg/100 g)</b>	0.34	0.02
<b>SECV (mg/100 g)</b>	0.37	0.02
<b>N° fact. PLS</b>	5	7
<b>Grupos Cross- val.</b>	6	6

Mediante el proceso de *validación interna* se obtienen los parámetros de predicción como SEP, BIAS y SEP (C) (página 51). Al representar los valores de referencia frente a los predichos por NIR se obtienen los gráficos de validación interna para  $\alpha$ -tocoferol y  $(\gamma+\beta)$ -tocoferol (figura 42). Se observa que en el caso de  $\alpha$ -tocoferol, la mayoría de los valores se agrupan en dos bloques, que corresponden a muestras frescas y deshidratadas. En el caso de  $(\gamma+\beta)$ -tocoferol los datos presentan una distribución en tres grupos, pudiendo ser este intermedio el correspondiente a muestras frescas que ya han iniciado el proceso de degradación  $(\gamma+\beta)$ -tocoferol. Los resultados indican que es posible la cuantificación de  $\alpha$ -tocoferol y  $(\gamma+\beta)$ -tocoferol en muestras de alfalfa triturada con rangos 0.09-5.16 mg/100g y 0.11-0.48 mg/100g con errores de predicción (SEP) de 0.32 mg/100 g y 0.02 mg/100 g respectivamente.

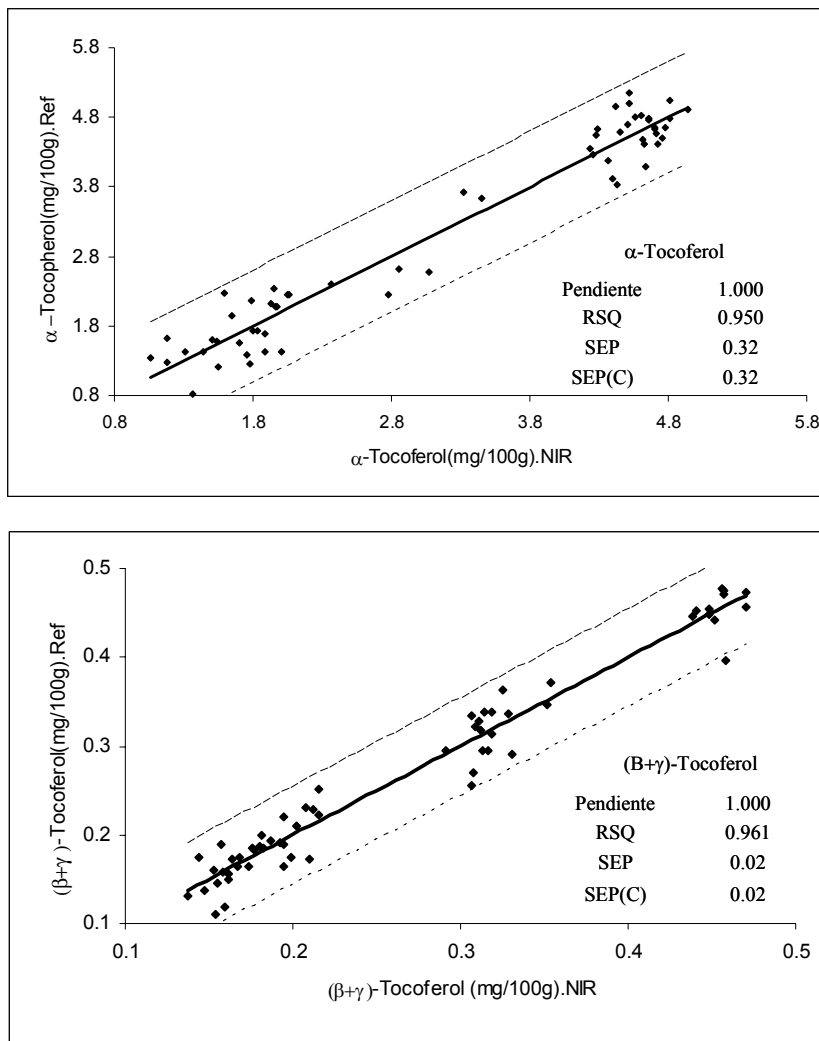


Figura 42. Comparación de los valores de referencia con los valores predichos por el modelo MPLS en NIR para la determinación de  $\alpha$ -tocoferol y  $(\gamma+\beta)$ -tocoferol en alfalfa triturada (fresca y deshidratada). Validación interna.

La capacidad de predicción de los modelos se evalúa como se ha indicado anteriormente con el parámetro RPD (página 52), los valores obtenidos para el RPD de 4.5 y 5.1 para  $\alpha$ -tocoferol y  $(\gamma+\beta)$ -tocoferol nos indican que los modelos desarrollados pueden ser aplicados a muestras desconocidas.

Para comprobar la bondad de los modelos de calibración se realiza una *validación externa* a un conjunto de 10 muestras de alfalfa triturada, 5 muestras frescas y otras 5 deshidratadas, que no pertenecen al colectivo de calibración, y que presentan un rango de concentración dentro de la aplicabilidad de las ecuaciones obtenidas (tabla 34). De estas muestras se conocen los valores de referencia, mostrándose de forma conjunta para muestras frescas y deshidratadas (tabla 35).

*Tabla 35. Descriptores estadísticos para  $\alpha$ -tocoferol y  $(\gamma+\beta)$ -tocoferol en alfalfa triturada (fresca y deshidratada). Muestras del conjunto de validación externa.*

Componente	Mínimo	Máximo	Media	SD
$\alpha$ -tocoferol (mg/100 g)	1.86	5.08	3.66	0.07
$(\gamma+\beta)$ -tocoferol (mg/100 g)	0.14	0.33	0.26	1.14

Los resultados proporcionados por la metodología NIR y los obtenidos por el método de referencia para  $\alpha$ -tocoferol y  $(\gamma+\beta)$ -tocoferol se comparan utilizando el test t de Student para valores apareados. Los niveles de confianza alcanzados aplicando dicho test se recogen en la tabla 36.

*Tabla 36. Validación externa. Cuantificación de  $\alpha$ -tocoferol y  $(\gamma+\beta)$ -tocoferol en alfalfa triturada (fresca y deshidratada).*

Componentes	P (nivel de confianza)	RMSE (mg/100 g)	Diferencias (%)
$\alpha$ -tocoferol	0.88	0.55	13.8
$(\gamma+\beta)$ -tocoferol	0.35	0.04	12.0

El nivel de confianza, para estos parámetros, es mayor que 0.05 (elegido como el mínimo); lo que indica que no hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos por ambos métodos. En dicha tabla también se recogen otros dos parámetros como son el RMSE (página 52) y el porcentaje relativo entre el valor obtenido por el método NIR y por el de referencia frente al valor de referencia, indicadores del error que se puede cometer al predecir muestras desconocidas.

## **V Conclusiones**

### **V.1 Urea, biuret y gallinaza**

**V.1.1 Detección de urea, biuret y gallinaza en muestras de alfalfa**

**V.1.2 Cuantificación de urea, biuret y gallinaza en muestras de alfalfa**

### **V.2 Proteína y humedad**

**V.2.1 Modelos iniciales (campana 2004). Alfalfa triturada y empacada**

**V.2.2 Ampliación y desarrollo de nuevos modelos a lo largo de los años 2004-2005-2006. Alfalfa triturada**

### **V.3 Determinación de Ca, K, P, Fe, Mn, Na y Zn**

### **V.4 Determinación de tocoferoles en alfalfa**



En esta memoria se ha evaluado el potencial de la espectroscopía NIR con sonda de fibra óptica de reflectancia remota aplicada directamente sobre muestras de alfalfa en la determinación de parámetros de interés.

A continuación se expone de forma más detallada las conclusiones obtenidas en los diferentes apartados de esta memoria. De los resultados experimentales obtenidos pueden formularse las conclusiones que se exponen a continuación:

## **V.1 Urea, biuret y gallinaza**

Se parte de muestras de alfalfa de origen conocido recolectadas durante los años 2004, 2005 y 2006, con unos niveles de aditivos obtenidos mediante dopado comprendidos entre 0.01 y 10.00% en peso en el caso de la urea y el biuret y entre 1.00 y 25.00 % en el caso de la gallinaza.

### **V.1.1 Detección de urea, biuret y gallinaza en muestras de alfalfa**

- Utilizando el método de reconocimiento de pautas prefijadas DPLS se desarrollan cuatro modelos, uno para cada aditivo, con las clases presencia/ausencia y un modelo global en el cual se han incluido los tres aditivos estudiados con las clases presencia/ausencia para cada uno de ellos.
- Los resultados obtenidos indican que se puede detectar la presencia de estos aditivos en muestras de alfalfa con un alto porcentaje de muestras clasificadas correctamente.
- En los modelos individuales el porcentaje medio de muestras de alfalfa con aditivos correctamente clasificadas es del 98.7% en validación interna y de un 93.3% en externa.
- Los resultados para el modelo global (con el total de muestras dopadas por separado con urea, biuret ó gallinaza) revelan que se puede predecir con un alto porcentaje de aciertos la presencia de estos aditivos en muestras de alfalfa, con un 96.9% en validación interna correctamente clasificadas y un 92.5% en validación externa.
- Los modelos generados se pueden aplicar a la detección de aditivos urea y biuret y gallinaza en muestras de alfalfa desconocidas. La detección se puede

realizar de manera sistemática antes de realizar el análisis de proteína o cuando los valores de proteína sean anómalos.

### **V.1.2 Cuantificación de urea, biuret y gallinaza en muestras de alfalfa**

- Los modelos desarrollados para cada aditivo mediante el método de regresión por mínimos cuadrados parciales modificados, MPLS, nos permiten obtener los parámetros RSQ, SEC y SECV, probando que es posible la cuantificación de urea, biuret y gallinaza en muestras de alfalfas desconocidas en los rangos recogidos para cada modelo.
- Los resultados obtenidos en el proceso de validación interna presentan errores de predicción (SEP) de 0.27%; 0.29%; y 2.06% para urea, biuret y gallinaza en alfalfa, siendo un método de análisis adecuado para la cuantificación de cada uno de los tres aditivos.
- La capacidad de predicción, RPD, de los modelos desarrollados para urea, 11.0, biuret, 11.1 y gallinaza, 4.0, son muy buenos, mostrando la capacidad de la técnica NIR en la evaluación de estos aditivos.
- Los datos obtenidos en el proceso de validación externa utilizando el test t de Student para valores apareados indican que no hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos por ambos métodos. Los valores de los parámetros RMSE y la media de los residuales (indicadores del error que se puede cometer al predecir muestras desconocidas) son satisfactorios.

## **V.2 Proteína y humedad**

Se utilizan muestras de alfalfa del año 2004 (con dos formas de presentación, triturada y empacada) y del 2005. En todos los casos se aplica el método de regresión por mínimos cuadrados parciales modificados, MPLS, para obtener un modelo global, que permita la cuantificación de los parámetros proteína y humedad.

### **V.2.1 Modelos iniciales (campaña 2004). Alfalfa triturada y empacada**

- Se calculan y evalúan los parámetros RSQ, SEC y SECV para proteína y humedad en muestras de alfalfa triturada y empacada. Los estadísticos de



calibración son ligeramente mejores en muestras trituradas frente a muestras empacadas, siendo en ambos casos óptimos.

- El proceso de validación interna corrobora la cuantificación de proteína y humedad en muestras de alfalfa triturada con errores de predicción (SEP) de 0.54% y 0.15% para la proteína y humedad respectivamente. En el caso de la alfalfa empacada los valores del SEP son de 0.56% para la proteína y de 0.26% para la humedad.
- La capacidad de predicción es óptima en muestras trituradas y empacada para ambos parámetros (proteína y humedad), siendo mayor en alfalfa triturada; y en todos los casos el valor de RPD de la humedad es superior a la proteína.
- En el proceso de validación externa y aplicando el test t de Student para valores apareados se muestra que no hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos por ambos métodos (método de referencia y método NIR). El error cuadrático medio, RMSE, inferior al 1.82% para la proteína y 0.87% para la humedad y las diferencias relativas (en %) respecto al valor de referencia subrayan el interés para predecir muestras desconocidas.

#### **V.2.2 Ampliación y desarrollo de nuevos modelos a lo largo de los años 2004-2005-2006. Alfalfa triturada**

Se describe la puesta a punto y optimización de un modelo global de calibración NIR que permite la cuantificación de los parámetros proteína y humedad en muestras de alfalfas trituradas en el laboratorio acreditado de análisis Aquimisa S.L. (Salamanca) como método de rutina a lo largo del tiempo.

- El efecto de la campaña agrícola en los modelos es muy considerable, se ha necesitado la ampliación de los modelos para reducir el error en la predicción de proteína y humedad. Dentro de cada campaña las variaciones espectrales son menos importantes como se muestra mediante el análisis de componentes principales.
- Previo a la determinación de proteína y humedad, el análisis de componentes principales ofrece información importante de cara la posibilidad de aplicación de los modelos y de su ampliación.

- El seguimiento del proceso con sus consiguientes ampliaciones se realiza mediante los parámetros estadísticos de calibración. Los modelos desarrollados se someten a una validación externa con muestras ciegas por parte de la empresa. La evolución de modelos se evalúa a través del error obtenido al contrastar el método NIR con el método de referencia.
- Una vez establecido en rutina el modelo 2004+2005 (II), en las campañas del 2005 y 2006; el error se sitúa por debajo de un 10% para los parámetros proteína y humedad.

### V.3 Determinación de Ca, K, P, Fe, Mn, Na y Zn.

Con muestras de alfalfa triturada de la campaña agrícola 2004 y el método de regresión por mínimos cuadrados parciales modificados, MPLS, se han desarrollado modelos para la determinación de los elementos Ca, K, P, Fe, Mn, Na y Zn.

- Los parámetros RSQ, SEC y SECV para los elementos Ca, K, P, Fe, Mn, Na y Zn en muestras de alfalfa triturada resultan eficaces para la cuantificación de estos elementos en muestras trituradas.
- Los resultados del proceso de validación interna indican que es posible la determinación de estos elementos con errores de predicción SEP expresados en  $\text{mg kg}^{-1}$  de  $1.35 \cdot 10^3$ ,  $1.09 \cdot 10^3$ , 225, 102, 5.0, 85.4 y 1.8 para Ca, K, P, Fe, Mn, Na y Zn respectivamente.
- La capacidad de predicción de los modelos desarrollados, están comprendidos entre 7.5 para el Na y 2.9 para el Zn, confirmando la posibilidad de aplicación de la técnica NIR desarrollada a muestras desconocidas.
- Con la validación externa se comprueba la bondad de los modelos de calibración, el test t de Student para valores apareados establece que no hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos por ambos métodos para los elementos Ca, K, P, Fe, Mn, Na y Zn. Los errores RMSE y las diferencias relativas en % respecto a los datos de referencia en la predicción de muestras desconocidas indican que los resultados son buenos.
- En la cuantificación de elementos minoritarios se comete un error superior al que se comete en los mayoritarios, como era de esperar. En el caso de Fe y Na

se debe probablemente a la baja concentración de estos elementos asociados a los compuestos orgánicos sensibles en NIR; en el caso de Zn los datos están muy próximos al límite de detección del método de referencia.

#### V.4 Determinación de tocoferoles en alfalfa.

Se dispone de muestras de alfalfa triturada tanto fresca como deshidratadas recogidas en un periodo comprendido entre junio de 2004 y julio de 2005, los resultados obtenidos en la determinación de  $\alpha$ - y ( $\gamma$ + $\beta$ )-tocoferol mediante la regresión MPLS, tomando el método HPLC como referencia se muestran a continuación.

- El contenido de  $\alpha$ - y ( $\gamma$ + $\beta$ )-tocoferol en muestras frescas es superior al encontrado en muestras deshidratadas, debido probablemente a la degradación de estas especies durante el tratamiento de deshidratación.
- Los parámetros de calibración, RSQ, SEC y SECV en la determinación de  $\alpha$ - y ( $\gamma$ + $\beta$ )-tocoferol en muestras de alfalfa triturada resultan apropiados.
- Los valores de la capacidad de predicción, en los modelos desarrollados para  $\alpha$ - y ( $\gamma$ + $\beta$ )-tocoferol (4.5 y 5.1) nos indican que la técnica NIR pueden ser aplicada para predecir tocoferoles en muestras desconocidas.
- Los resultados del proceso de validación interna señala que es posible la determinación de  $\alpha$ - y ( $\gamma$ + $\beta$ )-tocoferol en muestras de alfalfa triturada con los errores de predicción SEP de 0.32 mg/100 g y 0.02 mg/100 g para  $\alpha$ - y ( $\gamma$ + $\beta$ )-tocoferol respectivamente.
- La validación externa utilizando el test t de Student para valores apareados sugieren que no hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos por HPLC y la metodología NIR para  $\alpha$ - y ( $\gamma$ + $\beta$ )-tocoferol en muestras de alfalfa triturada. Resultados que se confirman mediante los parámetros RMSE y las diferencias relativas en % respecto a los datos de referencia.

Como conclusión final, los resultados obtenidos muestran la gran capacidad de la técnica NIR para su utilización como método de análisis en la determinación de parámetros de interés en alfalfa con las ventajas que conlleva la escasa o nula

preparación de las muestras y el consiguiente ahorro en reactivos. Todos estos factores conducen a análisis rápidos y con un bajo coste por muestra.

## **ANEXO I-Trabajos publicados**



González-Martín, I.; Hernández-Hierro, J.M.; Bustamante-Rangel, M.; Barros-Ferreiro, N. Near-infrared spectroscopy (NIRS) reflectance technology for the determination of tocopherols in alfalfa. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2006, 386, 1553-1558.





I. González-Martín · J. M. Hernández-Hierro ·  
M. Bustamante-Rangel · N. Barros-Ferreiro

## Near-infrared spectroscopy (NIRS) reflectance technology for the determination of tocopherols in alfalfa

Received: 21 March 2006 / Revised: 16 June 2006 / Accepted: 6 July 2006 / Published online: 22 September 2006  
© Springer-Verlag 2006

**Abstract** The vitamin E ( $\alpha$ - and ( $\beta$ + $\gamma$ )-tocopherol) contents present in alfalfa (fresh or dehydrated) were analysed using near-infrared spectroscopy (NIRS) technology together with a remote reflectance fibre-optic probe. The range of vitamin E was 0.55–5.16 mg/100 g for  $\alpha$ -tocopherol and 0.07–0.48 for ( $\beta$ + $\gamma$ )-tocopherol. The regression method employed was modified partial least squares (MPLS). The equations developed using the fibre-optic probe for 69 samples of alfalfa (dehydrated and fresh) to determine the content of vitamin E in feeds had multiple correlation coefficients (RSQs) and prediction corrected standard errors (SEP (C)) of 0.946 and 0.321 mg/100 g for  $\alpha$ -tocopherol and 0.956 and 0.022 mg/100 g for ( $\beta$ + $\gamma$ )-tocopherol. The predicted values of vitamin E in feeds using NIRS technology applying the fibre-optic probe directly on the sample with neither previous treatment nor manipulation are comparable to those obtained using the chemical method, which included alkaline hydrolysis and hexane extraction of the vitamin from the unsaponifiable fraction before chromatographic determination.

**Keywords** Vitamin E · Tocopherols · Near-infrared spectroscopy · Fibre-optic probe · Alfalfa · Determination

### Introduction

In animal nutrition, alfalfa is consumed in fresh, hayed or dehydrated form. The last two processes are of greatest interest in the feed industry and their properties are a function of the initial raw material. Haying involves a

longer lasting natural drying process, although it leads to greater losses of nutrient value (e.g. protein, vitamins, etc.) than dehydration [1]. Alfalfa is beginning to appear in human nutrition owing to its considerable antioxidant properties. It contains large amounts of vitamin E, which explains its importance in animal nutrition [2, 3]. Vitamin E belongs to a family of structurally related compounds, eight of which are known to occur in nature:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ -tocopherol and  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ -tocotrienol. All these vitamins share a common structure with a chromanol head and a hydrophobic tail comprising phytyl in tocopherols and isoprenyl in tocotrienols.

The 2000/45/EC directive establishes the methods of analysis for the determination of vitamin E, vitamin A and tryptophan in animal feed, mainly using chromatographic methods. The determination of vitamin E is usually carried out using liquid chromatography under normal-phase or reversed-phase conditions. The latter are preferred owing to the better reproducibility of retention times, faster equilibration, the greater robustness of stationary phases and the use of lower amounts of toxic compounds in the mobile phase. However, the  $\beta$ - and  $\gamma$ -isomers are not resolved and are quantified jointly.

In most foods and biological samples, tocopherol and tocotrienol concentrations are low and are usually found in the presence of larger amounts of other substances (triglycerides, phospholipids, sterols), which may cause interference. Sample pretreatment is a critical step in the analytical process. Manipulation is time-consuming, expensive, and it is the main source of errors and should therefore be kept to a minimum if possible. The relative amount of tocopherols in the sample to be analysed may be very low and sometimes preconcentration steps and highly sensitive methods are required. Sample treatment for vitamin E analysis often includes saponification of the sample matrix followed by extraction of vitamins from the unsaponifiable fraction [4]. Saponification is performed by heating with KOH, often in ethanol or methanol. Following saponification, the unsaponifiable components, including vitamin E, are extracted into the organic solvent [5–7]. This has been mainly employed in food and samples of animal

I. González-Martín (✉) · J. M. Hernández-Hierro ·  
M. Bustamante-Rangel · N. Barros-Ferreiro  
Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología,  
Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Salamanca,  
Plaza de la Merced s/n,  
37008 Salamanca, Spain  
e-mail: inmaglez@usal.es

origin. To avoid the oxidation of fat-soluble vitamins, some researchers have added antioxidants such as butylated hydroxytoluene (BHT), [8] ascorbic acid [9] or pyrogallol [10]. Extraction of analytes after saponification can be achieved by solid-phase extraction in continuous mode [11]. Sample preparation can also be achieved by direct extraction of the vitamins with an organic solvent such as hexane [12] or mixtures such as acetonitrile/methanol/2-propanol [13]. A sample preparation method involving direct extraction of the tocopherols through a silicone membrane coupled on-line to the chromatographic system has also been used [14]. Recently, a new method using pressurized liquid extraction has been used for the extraction of vitamin E from seeds and nuts [15].

Since near-infrared spectroscopy (NIRS) was first developed, numerous papers have demonstrated the ability of this technology to predict traditional chemical values and other parameters of nutritional interest for different feeds and forages [16]. An early paper [17] evaluating the use of NIRS for analysing mixed feeds concluded that due to the considerable heterogeneity of these samples finely ground material was essential. Most NIRS studies published on feed compositions have been performed using samples analysed after fine milling. The importance of avoiding the tedious task of milling the samples is well recognised by both traditional wet chemistry and NIRS users. Versatile NIRS analysers with different sample presentation attachments and large analysis windows, allowing the analysis of unground material, are now commercially available [18]. Using NIRS technology with a fibre-optic probe, González Martín et al. [19–22] determined fat, protein, the mineralogical composition and fatty acids by applying the probe directly onto the meat of Iberian pig carcasses. These authors have also set up a method for the determination of vitamin E in unground commercial feeds using this technology [23].

The aim of the present study was to obtain NIR calibrations for the instantaneous and simultaneous prediction of  $\alpha$ - and ( $\beta$ + $\gamma$ )-tocopherol in alfalfa, in both fresh and dehydrated samples, by using NIRS technology and a remote reflectance fibre-optic probe applied directly onto ground samples.

## Experimental

### Samples

Sixty nine samples (35 of dehydrated alfalfa and 34 of fresh alfalfa) corresponding to a year's cultivation in different geographic zones were analysed. NIR spectra were measured by applying the fibre-optic probe on ground samples, Fig. 1, (prepared as for chromatographic chemical analysis).

### Chemical analyses

To determine the vitamin E isomer contents of the reference samples, all feeds were analysed by applying the classical

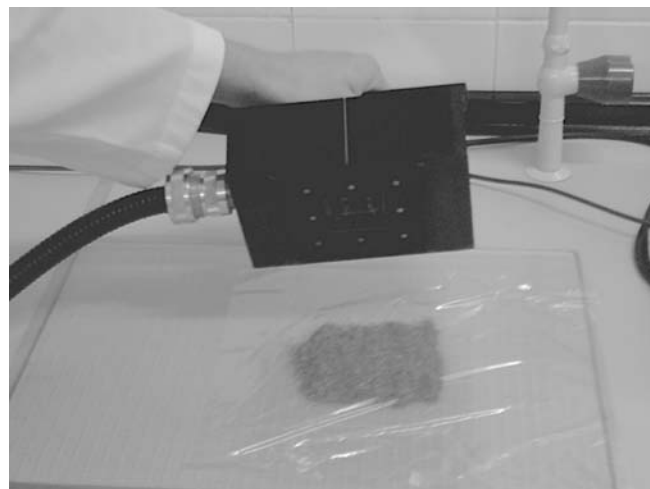


Fig. 1 Measurement of alfalfa samples with the fibre optic probe

treatment [24], including alkaline hydrolysis and extraction of tocopherols from the unsaponifiable material before separation and quantification by liquid chromatography. The ground samples (approximately 2 g) mixed with the hydrolysis reagent were stirred for 2 h at room temperature and protected from light. The composition of the hydrolysis reagent was as follows: 35 mL ethanol, 5 mL aqueous 10% ascorbic acid, 10 mL aqueous 60% KOH and 25 mL water. The analytes were then extracted with two portions of hexane (25 mL) for 1 min, and the extracts were washed with two portions (10 mL) of water for 30 s. The organic phases were removed by evaporation in a rotavapor under vacuum at 50°C and the residues were dissolved in methanol (25 mL) and filtered through 0.45- $\mu$ m nylon membranes to clean the extracts before their injection into the chromatographic system.

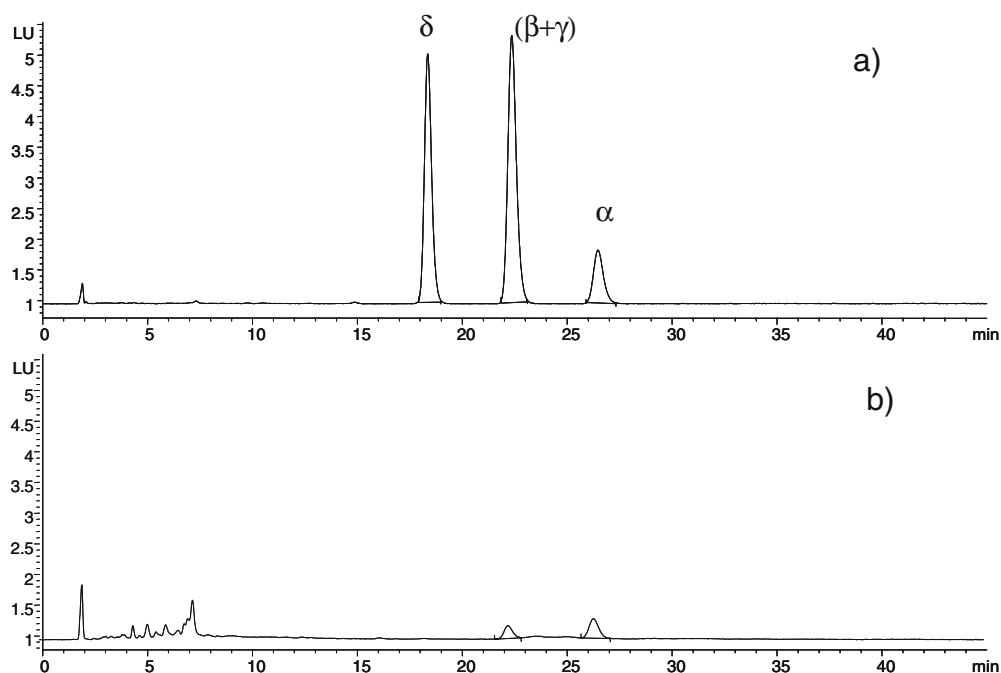
Chromatographic determination was carried out using an Agilent Technologies 1100 liquid chromatograph equipped with a continuous-mode vacuum degassing system, a binary gradient pump with high pressure mixing, and a Luna column (250 $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m) from Phenomenex. A fluorescence detector was used ( $\lambda_{\text{ex}}$ =296 nm/ $\lambda_{\text{em}}$ =335 nm). Isocratic elution was performed with a water/methanol (4:96 v/v) mobile phase with a flow rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup>.

For the analysis of vitamin E, two determinations were carried out and each sample was injected twice, taking the means. The chemical compositions are reported in mg/100 g. Figure 2 shows the chromatogram obtained for a sample of alfalfa subjected to the procedure described.

### NIR spectroscopy

A Foss NIRSystem 5000 with a standard 1.5-m 210/7210 bundle fibre-optic probe, Ref no R6539-A, was used. The probe employs a remote reflectance system and uses a ceramic plate as reference. The window is of quartz with a 5 $\times$ 5 cm surface area, measuring reflectance in the IR zone close to 1,100–2,000 nm. The spectra were recorded at intervals of 2 nm, performing 32 scans for both the

**Fig. 2** Chromatograms obtained after application of a chemical analysis method to a standard solution (a) and sample (b). For conditions, see "Experimental" section



reference and samples. To minimise sampling error, all 69 samples were analysed in triplicate. The software used was Win ISI 1.50, installed on a Hewlett-Packard Pentium III computer.

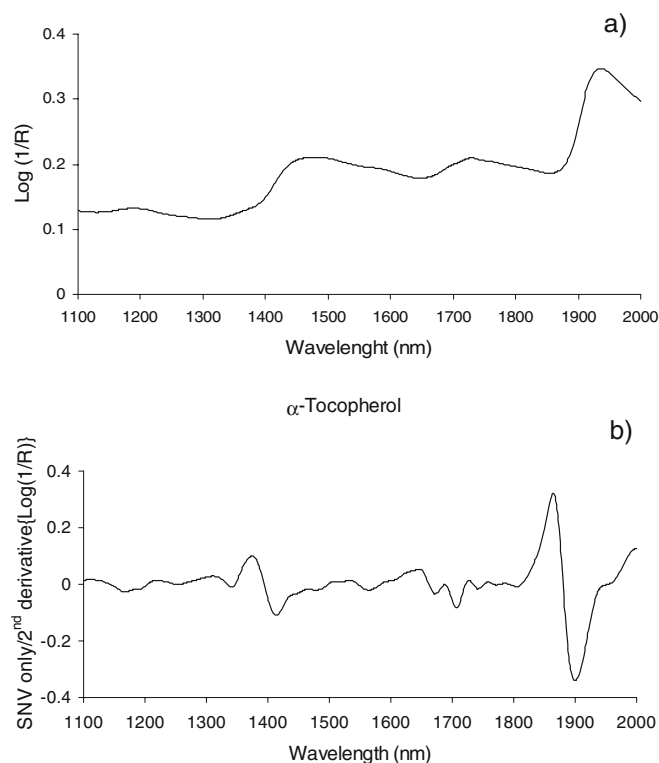
#### Statistical analyses

The modified partial least squares (MPLS) regression method was used to obtain the NIR equations for all the parameters studied. Partial least squares (PLS) regression is similar to principal component regression (PCR), but uses both reference data (chemical, physical, etc.) and spectral information to form the factors useful for fitting purposes [25]. MPLS is often more stable and accurate than the standard PLS algorithm. In MPLS, the NIR residuals at each wavelength, obtained after each factor has been calculated, are standardised (dividing by the standard deviations of the residuals at each wavelength) before calculating the next factor. When developing MPLS equations, cross-validation is recommended in order to select the optimal number of factors and to avoid overfitting [26]. For cross-validation, the calibration set is partitioned into several groups; each group is then validated using a calibration developed on the other samples. Finally, validation errors are combined into a

standard error of cross-validation (SECV) [27]; it has been reported that the SECV is the best single estimate of the prediction capability of the equation and that this statistic is similar to the average standard error of prediction (SEP) from 10 randomly chosen prediction sets. In all cases, cross-validation was performed by splitting the population into six groups. All multivariate regression equations were obtained using the standard normal variate and standard multiplicative scatter correction methods for scatter correction [28]. Moreover, two mathematical treatments were tested in the development of NIRS calibrations: 2, 8, 6, 1 ( $\alpha$ -tocopherol) and 2, 10, 10, 1 ( $\beta+\gamma$ -tocopherol), where the first digit is the number of the derivative; the second is the gap over which the derivative is calculated; the third is the number of data points in a running average or smoothing, and the fourth is the second smoothing [29]. The statistics used to select the best equations were RSQs (multiple correlation coefficients) and the standard error of cross-validation (SECV). The prediction capacity of the model obtained was evaluated with the RPD (ratio performance deviation), a capacity parameter [30] that is defined as the relationship between the standard deviation of the chemical method (SD ref) and the standard prediction error encountered in the NIR model (SEP); if the RPD value is greater than 2.5 the model is considered to be suitable.

**Table 1** Chemical composition of calibration set (mg/100 g)  $N=69$

Alfalfa	$N$	Constituent	Minimum	Maximum	Mean	SD
Fresh	34	$\alpha$ -Tocopherol	2.92	5.16	4.42	0.51
		( $\beta+\gamma$ )-Tocopherol	0.21	0.48	0.36	0.07
Dehydrated	35	$\alpha$ -Tocopherol	0.55	3.73	1.86	0.67
		( $\beta+\gamma$ )-Tocopherol	0.07	0.25	0.175	0.04



**Fig. 3** a NIR spectrum of alfalfa sample. b Corrected spectrum using 2nd derivative and SNV for  $\alpha$ -tocopherol

## Results and discussion

### Chemical analyses and spectral information

The contents of  $\alpha$ - and  $(\beta+\gamma)$ -tocopherol in alfalfas used as the calibration group are shown in Table 1. The mean, SD and range of values of chemical compositions are also included. The content in  $\alpha$ -tocopherol was between 3 and 5 mg/100 g in the fresh alfalfa samples and between 0.5 and 4 mg/100 g in the dehydrated samples; that of  $(\beta+\gamma)$ -tocopherol ranged between 0.2 and 0.5 mg/100 g in fresh alfalfa, and 0.1 and 0.2 mg/100 g in the dehydrated samples. These results confirm that the dehydration treatment involves a loss of vitamin E.

Figure 3 shows the spectrum of a sample of alfalfa obtained directly with the fibre-optic probe and one of the mathematical treatments that afforded optimum values for the calibrations of  $\alpha$ -tocopherol, using the 2nd derivative and SNV (standard normal variate). The effects of

dispersion were removed by using MSC (multiplicative scatter correction), SNV (standard normal variate), DT (DeTrend) or SNV-DT. MSC, used by Geladi et al. [31], prevents the dispersion in the samples from imposing itself on the chemical signals. Dhanoa et al. [32] indicated that SNV-DT should be introduced not only to reduce multicollinearity but also to calculate spectral differences by reducing the confounding effects of baseline shift and curvature.

### Calibration equations

To calibrate the vitamin E, we employed 60 samples of alfalfa. Calibration was carried out using NIRS technology and a remote reflectance fibre-optic probe applied directly on the sample with no previous treatment or manipulation. Furthermore, the risk of mistake with the equations under practical conditions was very low or almost nil when using the standardised  $H$  statistic (Mahalanobis distance) during routine analysis of unknown samples [25]. This tells us how different the spectrum of the unknown sample is from the average spectrum in the calibration set. Samples that exhibit an  $H$  value greater than three may be considered as not belonging to the population from which the equations were developed, and in this case the equations should not be used to make any prediction. After the number of principal components had been calculated, detection of anomalous spectra was accomplished using the Mahalanobis distance ( $H$  statistic), establishing  $H>3$  as the limit value for spectral reasons; 4 samples were removed for  $\alpha$ -tocopherol and 5 for  $(\beta+\gamma)$ -tocopherol. Calibrations were performed by modified partial least squares regression (MPLS). Using the  $T\geq 2.5$  criterion, samples that were different from the population owing to chemical criteria were removed from the set. According to this chemical criterion, 5 samples were removed from the calibration set in the case of  $\alpha$ -tocopherol and 4 in the case of  $(\beta+\gamma)$ -tocopherol.

The statistical parameters of the calibration equations for each component are shown in Table 2, indicating  $N$ , the number of samples used to obtain the calibration equation after removing the samples for spectral ( $H$  criterion) or chemical reasons ( $T$  criterion). The best of the different mathematical treatments, concentration range and standard deviations for  $\alpha$ - and  $(\beta+\gamma)$ -tocopherol are also shown. The results obtained indicate that it is possible to determine both  $\alpha$ - and  $(\beta+\gamma)$ -tocopherol in fresh and dehydrated alfalfa, with broad applicability.

**Table 2** Calibration statistical descriptors for the NIR determination of tocopherols in alfalfa

Constituent	$N$	Mathematical treatment	SD	Estimate	RSQ	SEC	SECV	CV groups
$\alpha$ -Tocopherol	60	SNV only 2,8,6,1	1.41	0.086–5.16	0.946	0.34	0.37	6
$(\beta+\gamma)$ -Tocopherol	60	Standard MSC 2,10,10,1	0.11	0.111–0.48	0.956	0.024	0.027	6

## Validation

### Internal validation (prediction)

Model evaluation was performed by cross-validation. In this method, the set of calibration samples is divided into a series of subsets: in our case 6. Of these, 5 were taken for the calibration set and one for the prediction set. The process is repeated as many times as there are sets, such that all pass through the calibration set and the prediction set. Using this process, we validated the model used and checked its prediction capacity: Fig. 4 shows the correlation of the values obtained at the laboratory with respect to those predicted by NIR with a fibre-optic probe for the vitamin E ( $\alpha$ - and ( $\beta$ + $\gamma$ )-tocopherol) present in alfalfas.

### Prediction capacity of the model

The prediction capacity of the model obtained was evaluated with the RPD (ratio performance deviation) [30], which is defined as the relationship between the standard deviation of the chemical method (SD ref) and the standard prediction error encountered in the NIR model (SEP); if the RPD value is greater than 2.5, the model is considered to be suitable. The RPD values obtained for  $\alpha$ -tocopherol and ( $\beta$ + $\gamma$ )-tocopherol (4.53 and 5.07, respec-

tively) verify accurate analysis for these components. From this information, it may be deduced that the NIRS technique, using a fibre-optic probe, is a good alternative for the determination of the content the vitamin E in alfalfa samples.

### External validation

We checked the robustness of the method by applying NIRS technology to 10 new samples (5 of fresh alfalfa and 5 dehydrated samples) that did not belong to the calibration group. The procedure was as follows: spectra were recorded in triplicate and the spectral mean was taken. Then, the calibration equations obtained during the work were applied and the predicted values were compared with those obtained later using alkaline hydrolysis and extraction from the unsaponifiable fraction before HPLC. The difference found between the HPLC reference method and the NIRS technique in the external validation was 13.8% for  $\alpha$ -tocopherol and 12% for ( $\beta$ + $\gamma$ )-tocopherol when the vitamin content range was similar to that of the samples of the calibration group.

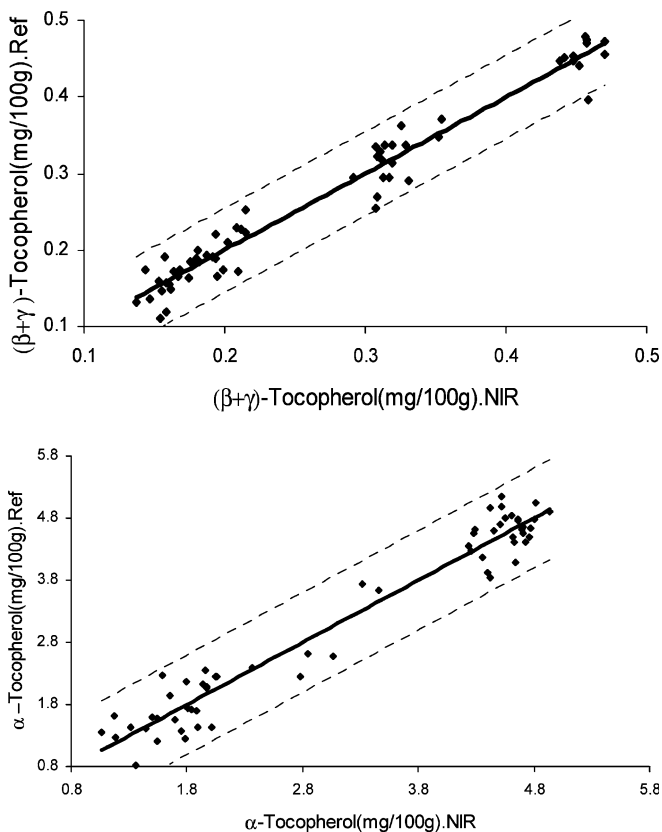
The NIRS and chemical methodologies were compared for the isomers analysed using Student's *t*-test for paired values with samples not belonging to the calibration model. The levels of significance obtained were 0.88 and 0.35 for  $\alpha$ -tocopherol and ( $\beta$ + $\gamma$ )-tocopherol, respectively. The level of significance for all tocopherols was higher than 0.05 (chosen as the minimum level of significance), i.e. there were no differences among the results obtained. It may be concluded that the different analytical methods used afford significantly similar results.

## Conclusions

The results show that the analytical method discussed, employing a fibre-optic probe and measuring the samples by direct application of the probe, is rapid and non-polluting and that it can be used to monitor vitamin E levels in alfalfa.

## References

1. Kume S, Tohamart T, Nonaka K, Oshita T, Nakui T, Ternouth JH (2001) *Anim Feed Sci Techn* 93:157–168
2. Turner KE, McClure KE, Weis WP, Borton RJ, Foster JG (2002) *J Anim Sci* 80:2513–2521
3. O'Sullivan A, Galvin K, Molones AP, Troy DJ, O'Sullivan K, Kerry JP (2003) *Meat Sci* 63:279–286
4. Leenheer AP, Lambert WE, Nelis HJ (eds) (1992) *Modern chromatographic analysis of vitamins*. Marcel Dekker, New York
5. Rupérez FJ, Martín D, Herrera E, Barbas C (2001) *J Chromatogr A* 935:45–69
6. Zonta F, Stancher B, Bielawny J (1982) *J Chromatogr* 246:105–112
7. Indyk HE (1988) *Analyst* 113:1217–1221
8. Konings EJM, Roomans HHS, Beljaars PR (1996) *J AOAC Int* 79:902–906



**Fig. 4** Comparison of reference values with the values predicted by the calibration equations for  $\alpha$ - and ( $\beta$ + $\gamma$ )-tocopherol

9. Albala-Hurtado S, Novella-Rodríguez S, Veciana-Nogues MT, Marine-Font A (1997) *J Chromatogr A* 778:243–246
10. Huo JZ, Nelis HJ, Lavens P, Zorruelos P, Leenheer AP (1996) *Anal Biochem* 242:123–128
11. Delgado-Zamarreño MM, Sánchez-Pérez A, Gómez-Pérez MC, Hernández-Méndez J (1995) *J Chromatogr* 694:399–406
12. Var der Greef J, Speek AJ, Tas AC, Schrijver J, Hoehn M, Rapp U (1986) *LC-GC* 4:636
13. Rogers EJ, Rice SM, Nicolosi RJ, Carpenter DR, McClelland CA, Romanezyk LJ (1993) *J Am Oil Chem Soc* 70:301–307
14. Delgado-Zamarreño MM, Bustamante-Rangel M, Sánchez-Pérez A, Hernández-Méndez J (2001) *J Chromatogr A* 935:77–86
15. Delgado-Zamarreño MM, Bustamante-Rangel M, Sánchez-Pérez A, Carabias-Martínez R (2004) *J Chromatogr A* 1056:249–252
16. Bertrand D, Dufour E (eds) (2000) *La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques*. Collection Sciences & Techniques Agroalimentaires TEC & DOC, Paris
17. Marten GC, Shenk JS, Barton FE II (eds) (1989) *Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). Analysis of forage quality*. USDA-ARS qgriculture. Handbook
18. Williams PK, Norris K (eds) (2001) *Near-infrared technology in the agricultural and food industries*. St. Paul, Minnesota USA
19. González-Martín I, González-Pérez C, Hernández-Méndez J, Álvarez-García N, Hernández-Andaluz JL (2001) *Anal Chim Acta* 453:281–288
20. González-Martín I, González-Pérez C, Hernández-Méndez J, Álvarez García N (2002) *Anal Chim Acta* 468:293–301
21. González-Martín I, González-Pérez C, Hernández-Méndez J, Álvarez-García N (2002) *Eurocarne* 109:99
22. González-Martín I, González-Pérez C, Hernández-Méndez J, Álvarez-García N (2003) *Meat Sci* 65:713–719
23. González-Martín I, González-Cabrera JM, Bustamante-Rangel M, Delgado-Zamarreño MM (2006) *Anal Chim Acta* 558:132–136
24. AOAC official method of analysis (eds) (1990) *Association of Official Analytical Chemists*
25. Martens H, Naes T (eds) (2001) *Multivariate calibration*. Wiley, Chichester, UK
26. Shenk JS, Westerhaus MO (eds) (1995) *Analysis of agriculture and food products by near infrared reflectance spectroscopy*. Monograph NIRSystems Inc, 12101 Tech Road, Silver Spring MD 20904 USA
27. Davies AMC, Williams P (eds) (1996) *Near infrared spectroscopy: the future waves*. Proceedings of the Seventh International Conference on Near Infrared Spectroscopy. NIR Publications, Chichester, West Sussex, UK
28. Barnes RJ, Dhanoa MS, Lister SJ (1989) *Appl Spectrosc* 43:772–777
29. Shenk JS, Westerhaus MO (eds) (1995) *Routine operation, calibration, sevelopment and network system management manual*. NIRSystems Inc, 12101 Tech Road, Silver Spring MD 20904 USA
30. Williams PC, Norris K (eds) (2001) *Near-infrared technology in the agricultural and food industries*. American Association of Cereal Chemists, St Paul Minnesota USA
31. Geladi P, Mac Dougall D, Martens H (1985) *Appl Spectrosc* 39:491–500
32. Dhanoa MS, Lister SJ, Barnes RJ (1995) *Appl Spectrosc* 49:765–772

González-Martín, I.; Hernández-Hierro, J.M.; González-Cabrera, J.M. Use of NIRS technology with a remote reflectance fibre-optic probe for predicting mineral composition (Ca, K, P, Fe, Mn, Na, Zn), protein and moisture in alfalfa. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, 387, 2199-2205.





# Use of NIRS technology with a remote reflectance fibre-optic probe for predicting mineral composition (Ca, K, P, Fe, Mn, Na, Zn), protein and moisture in alfalfa

I. González-Martín · J. M. Hernández-Hierro ·  
J. M. González-Cabrera

Received: 29 June 2006 / Revised: 6 November 2006 / Accepted: 22 November 2006 / Published online: 5 January 2007  
© Springer-Verlag 2007

**Abstract** In the present work we study the use of near-infrared spectroscopy (NIRS) technology together with a remote reflectance fibre-optic probe for the analysis of major (Ca, K, P) and minor (Fe, Mn, Na, Zn) elements, protein and moisture in alfalfa. The method allows immediate analysis of the alfalfa without prior sample treatment or destruction through direct application of the fibre-optic probe on ground samples in the case of the mineral composition and on-ground and compacted (baled) samples in the case of protein and humidity. The regression method employed was modified partial least-squares (MPLS). The calibration results obtained using samples of alfalfa allowed the determination of Ca, K, P, Fe, Mn, Na and Zn, with a standard error of prediction (SEP(C)) and a correlation coefficient (RSQ) expressed in mg/kg of alfalfa of  $1.37 \times 10^3$  and 0.878 for Ca,  $1.10 \times 10^3$  and 0.899 for K, 227 and 0.909 for P, 103 and 0.948 for Fe, 5.1 and 0.843 for Mn, 86.2 and 0.979 for Na, and of 1.9 and 0.853 for Zn, respectively. The SEP(C) and RSQ values (in %) for protein and moisture in ground samples were 0.548 and 0.871 and 0.150 and 0.981, respectively; while in the compacted samples they were 0.564 and 0.826 and 0.262 and 0.935, respectively. The prediction capacity of the model and the robustness of the method were checked in the external validation in alfalfa samples of unknown composition, and the results confirmed the suitability of the method.

**Keywords** Mineral composition · Protein · Moisture · Near infrared spectroscopy · Fibre-optic probe · Alfalfa

## Introduction

Alfalfa (*Medicago sativa*) is one of the main sources of animal feed and its high protein content together with its vitamin and mineral content mean that it is one of the most economically important forages available. The methods used for determining parameters of interest in alfalfa, such as total protein and the content of different minerals, are tedious, slow and not very economically viable for application in routine analyses [1–3]. The use of near-infrared spectroscopy (NIRS) allows analytes to be determined with little or no sample preparation. This technique has been used in forages such as alfalfa to determine their quality [4, 5], fibre and crude protein contents [6], digestibility [7], the changes that occur during silo storage [8], and after they have been subjected to a drying process [9]. NIRS has also been used to determine the different nitrogen fractions [10].

Since 1981, there have been several studies on mineral elements in plants using NIR [11]; if NIRS can be used for determining mineral concentrations this is due to the association between minerals and organic functional groups or the organic matrix [12]. The prediction of trace elements by NIRS in agricultural products has been reported even less frequently and has always been used in the context of plants. Only a few reports can be found related to the use of NIRS for macro and trace minerals, specifically in both grasses and hay samples [13], in natural grasses [14] or in botanical fractions of semi-arid grasslands [15], to predict trace minerals, Na (0.2–6.8) g/kg, Cu (5–31) mg/kg and Zn (19–417) mg/kg, in legumes [16], and to determine the

I. González-Martín (✉) · J. M. Hernández-Hierro ·  
J. M. González-Cabrera  
Departamento de Química Analítica,  
Nutrición y Bromatología, Facultad de Ciencias Químicas,  
C/ Plaza de la Merced s/n,  
37008 Salamanca, Spain  
e-mail: inmaglez@usal.es

mineral content, P (0.24–2.9) and Ca (1.0–20.1) expressed as g/kg dry matter, in woody plant species [17]. Likewise, NIRS spectroscopy has been used to determine the mineral content in soils of common elements such as Ca, Mg, Fe, Mn and K [18], the heavy elements Co, Cu, Ni, Pb, Zn and Mn [19] or possible contaminants in urban soils [20]. In alfalfa the method has been used to determine the mineral and ash contents in different parts of the plant, separating the leaves and stems [21–23], using measurements carried out in conventional cells.

With NIRS technology and a fibre-optic probe, González Martín et al. [24–26] determined fat, protein and the mineralogical composition and fatty acid contents of Iberian pig carcasses by applying the probe directly onto the meat, determining the mineral composition in commercial feeds with this technology [27].

The aim of the present work was to obtain NIR calibration equations with a remote reflectance fibre-optic probe that would allow instant determination and simultaneous prediction of moisture and total protein in ground and compacted (baled) alfalfa samples and the mineral composition of major (Ca, K and P) and minor (Fe, Mn, Na and Zn) elements in compacted alfalfa samples. Application of the fibre-optic probe directly on the samples affords faster analysis times since sample preparation is minimum or unnecessary.

## Experimental

### Samples

For the determination of protein and moisture, 55 samples of compacted alfalfa and 65 samples of ground alfalfa were used. For the determination of the mineral composition, 57 samples of ground alfalfa were used for Ca, K, P, Mn and Na, and 55 for Fe and 46 for Zn. All of them corresponded to representative crops collected over one year from different geographic zones. NIR spectra were measured by applying the fibre-optic probe directly on the samples.

### Chemical analyses

The composition in crude protein (the Kjeldahl method) and moisture of the alfalfa samples were analysed using AOAC methods (984.13 and 963.22). Determinations were carried out in duplicate and the results are expressed in % by weight. To determine the mineral composition of the reference samples, the samples were ground, homogenised and dried in an oven at 80–90 °C for 24 h. Once dry, the alfalfa samples were mineralised in a microwave system, measuring the mineral composition in the resulting solution by ICP.

Microwave digestion was accomplished in a Milestone MLD-1200 oven. A 0.5-g portion of dried ground sample was placed in a Milestone HPV 80 capsule and subjected to two steps: in the first, 5 mL of HNO<sub>3</sub> (conc.) was added, applying a power of 300 W for 5 min, while in the second step the sample was allowed to cool, after which a further 5 mL of HNO<sub>3</sub> (conc.) and 1 mL of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) were added, applying a power of 300 W for 7 min. Once the samples had cooled to room temperature, the volume was made up to 100 mL with distilled water and the samples were stored at 4 °C until analysis. The process was carried out in duplicate for each sample.

Measurements were made using ICP on a Perkin Elmer Plasma II optic ICP device. The results obtained—the means of two determinations—are expressed as ppm in solution obtained after the mineralization step (0.5 g of dry sample/100 mL), corresponding to mg/kg of fresh alfalfa.

### NIR spectroscopy

A Foss NIRSystem 5000 with a standard 1.5-m 210/7210 bundle fibre-optic probe (Ref n° R6539-A) was used. The probe employs a remote reflectance system and uses a ceramic plate as reference. The window is of quartz with a 5×5-cm surface area, measuring reflectance in the IR zone close to 1,100–2,000 nm. The spectra were recorded at intervals of 2 nm, performing 32 scans for both the reference and samples. To minimise sampling error, all the samples were analysed in triplicate. The software used was Win ISI 1.50, installed on a Hewlett–Packard Pentium III computer.

### Statistical analyses

The modified partial least-squares (MPLS) regression method was used to obtain NIR equations for all the parameters studied. Partial least-squares (PLS) regression is similar to principal component regression (PCR), but uses both reference data (chemical, physical, etc.) and spectral information to obtain the factors of use for fitting purposes [28]. MPLS is often more stable and accurate than the standard PLS algorithm. In MPLS, the NIR residuals at each wavelength, obtained after each factor has been calculated, are standardised (dividing by the standard deviations (SDs) of the residuals at each wavelength) before the next factor is calculated. When developing MPLS equations, cross-validation is recommended in order to select the optimal number of factors and avoid overfitting [29]. For cross-validation, the calibration set is partitioned into several groups; each group is then validated using a calibration developed from the other samples. Finally, validation errors are combined into a standard error of cross-validation (SECV) [30]. It has been reported that the

**Table 1** Chemical composition of calibration set (all units in %)

Sample	Component	Minimum	Maximum	Mean	SD
Unground (compacted)	Protein	17.21	23.08	19.95	1.45
	Moisture	6.73	10.66	8.68	1.09
Ground	Protein	15.81	23.07	19.50	1.63
	Moisture	6.53	10.66	8.60	1.17

SECV is the best single estimate of the prediction capability of the equation, and that this statistic is similar to the average standard error of prediction (SEP) from 10 randomly chosen prediction sets.

To optimise calibration accuracy, several scattering corrections and mathematical treatments were tested (standard normal variable (SNV), DeTrend (DT), multiplicative scatter correction (MSC), first derivative and second derivative) [31]. Moreover, different mathematical treatments were tested in the development of NIRS calibrations. Thus, in the case of the mineral composition, values of 2, 4, 4, 1 (Ca, Fe, Mn and Na) and 1, 4, 4, 1 (K, P, and Zn) were obtained, where the first digit is the number of the derivative; the second is the gap over which the derivative is calculated; the third is the number of data points in a running average or smoothing, and the fourth is the second smoothing [32]. The statistics used to select the best equations were RSQ (multiple correlation coefficients) and the standard error of cross-validation (SECV).

## Result and discussions

### Chemical analyses and spectral information

The contents of protein, moisture and mineral composition in the alfalfa samples used as the calibration group are shown in Tables 1 and 2. The mean, SD and range of values of chemical composition are also included. The protein content and moisture contents ranged between 15.8 and 23.1% and 6.5 and 10.7%, respectively, with small differences, depending on whether the sample was ground or compacted. Regarding the mineral composition, the major

(Ca, K, P) and minor (Fe, Mn, Na and Zn) elements corresponding to mg/kg of alfalfa were differentiated.

Figure 1 show the spectrum of a sample of alfalfa obtained directly with the fibre-optic probe and one of the mathematical treatments that afforded optimum values for the calibrations of protein, moisture and mineral composition.

The effects of dispersion were removed using multiplicative scatter correction (MSC), standard normal variate (SNV), DeTrend (DT) and SNV-DT. MSC, used by Geladi et al. [33], prevents the dispersion in the samples from imposing itself on the chemical signals. Dhanoa et al. [34] indicated that SNV-DT was introduced not only for the reduction of multicollinearity but also to calculate spectral differences by reducing the confounding effects of baseline shift and curvature.

### Calibration equations

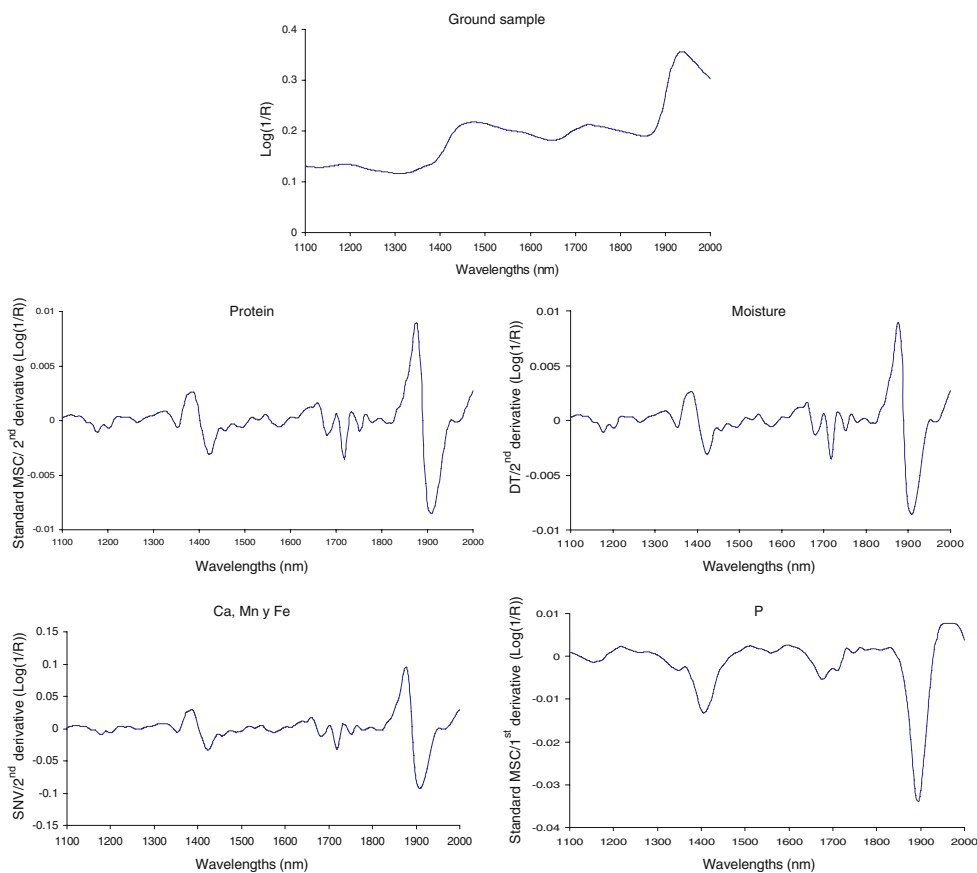
Calibration was carried out using NIRS technology and a remote reflectance fibre-optic probe applied directly on the sample with no previous treatment or manipulation. The risk of mistakes in the equations under practical conditions is very low or almost nil when using the standardised H-statistic (Mahalanobis distance) during routine analysis of unknown samples. This indicates how different the spectrum of the unknown sample is from the average spectrum in the calibration set. Samples with an H-value greater than 3 may be considered as not belonging to the population from which the equations were developed, and in this case the equations should not be used to make any prediction.

By applying principal component treatment and following the  $H > 3$  criterion, in the case of the compacted samples, 2 of them were removed for moisture and none for protein. In the case of the ground samples, 2 were removed for protein, 1 for moisture and the elements Fe, Mn and Na, while for Ca, K, P and Zn none was removed. In all cases, the spectral variability explained was 99%, in each case taking the following principal components: in the compacted samples 7 for protein and 5 for moisture; in the ground samples 7 and 6 for protein and moisture, respectively; 5 for Ca, 6 for P, Mn and Zn, 7 for Na, and 9 for K and Fe.

**Table 2** Chemical composition of calibration set (all units in ppm)

	Element	N	Minimum	Maximum	Mean	SD
Major	Ca	57	$8.55 \times 10^3$	$24.7 \times 10^3$	$15.6 \times 10^3$	$4.2 \times 10^3$
	K	57	$14.9 \times 10^3$	$29.1 \times 10^3$	$22.1 \times 10^3$	$3.8 \times 10^3$
	P	57	$1.11 \times 10^3$	$4.00 \times 10^3$	$2.46 \times 10^3$	824
Minor	Fe	55	110	$1.87 \times 10^3$	686	504
	Mn	57	18	70	37	13
	Na	57	132	$1.95 \times 10^3$	803	629
	Zn	46	10	40	19	6

**Fig. 1** Alfalfa NIR spectrum and mathematical treatments for protein, moisture and mineral content



On constructing the calibration model with the MPLS regression method, of the resulting samples those whose residuals were very high according to the  $T > 2.5$  criterion were removed. In compacted samples, 3 were removed for moisture and none for protein; in the ground samples 4 were removed for protein, 3 for moisture, and in the mineral composition 2 for Ca and K, 3 for P, 4 for Na and Zn, and none for Fe and Mn.

The statistical parameters of the calibration equations for each component are shown in Tables 3 and 4, showing  $N$ , the number of samples used to obtain the calibration equation after removing the samples for spectral (H criterion) or for chemical reasons (T criterion). The best of the different mathematical treatments, concentration range, and standard deviations for protein, moisture and major (Ca, K, P) and minor (Fe, Mn Na, Zn) element mineral composition are also shown. The results obtained indicate that it is possible to determine these parameters in alfalfa with

broad applicability. It is possible to measure the mineral composition by NIRS owing to the association between the mineral concentration and spectral features, this being due to the association between minerals and organic functional groups or the organic matrix. The near-infrared regions had considerable influence in the spectra due to the strong relationship between trace minerals and other constituents, mainly with O–H tones (water) and with C–H combination tones (organic functional groups) [35, 36].

## Validation

### Internal validation (prediction)

Model evaluation was performed by cross-validation. In this method, the set of calibration samples is divided into a series of subsets. In all cases, cross-validation was performed by splitting the population into six groups

**Table 3** Calibration statistical descriptors for the NIR determination of protein and moisture in alfalfas

Sample	Component	$N$	Mathematical treatment	SD	Estimate	RSQ	SEC	SECV	$N^\circ$ of fac. PLS	Cross-val group
Unground	Protein	55	SNV 2,4,4,1	1.45	15.60–24.29	0.826	0.605	1.17	7	6
	Moisture	50	None 0,0,1,1	1.10	5.39–11.98	0.935	0.279	0.324	6	6
Ground	Protein	59	Standard MSC 2,4,4,1	1.61	14.66–24.33	0.871	0.579	0.821	6	6
	Moisture	61	De Trend 2,4,4,1	1.17	5.06–12.06	0.981	0.161	0.405	8	6

**Table 4** Calibration statistical descriptors for the NIR determination inorganic components in alfalfas

	Element	N	Mathematical treatment	SD	Estimate	RSQ	SEC	SECV	Cross-val group
Major	Ca	55	SNV 2,4,4,1	$4.2 \times 10^3$	$3.24 \times 10^3$ – $28.4 \times 10^3$	0.878	$1.46 \times 10^3$	$2.75 \times 10^3$	6
	K	55	SNV 1,4,4,1	$3.7 \times 10^3$	$11.1 \times 10^3$ – $33.4 \times 10^3$	0.899	$1.18 \times 10^3$	$1.65 \times 10^3$	6
	P	53	Standard MSC 1,4,4,1	809	$87.7$ – $4.94 \times 10^3$	0.909	244	340	6
Minor	Fe	54	SNV 2,4,4,1	487	$0$ – $2.13 \times 10^3$	0.948	111	237	6
	Mn	56	SNV 2,4,4,1	14	$0$ – $78$	0.843	5.4	9.6	6
	Na	52	None 2,4,4,1	642	$0$ – $2.72 \times 10^3$	0.979	92.8	195	6
	Zn	42	None 1,4,4,1	5.3	$2.9$ – $35$	0.853	2.0	3.5	7

(except for Zn, for which there were 7). Of these, 5 were taken for the calibration set and one for the prediction set. The process is repeated as many times as there are sets, such that all pass through the calibration set and the prediction set. Using this process, we validated the model used and checked its prediction capacity. Figures 2 and 3 show the correlations of the values obtained at the laboratory with respect to those predicted by NIR with a fibre-optic probe for protein, moisture (in ground and compacted samples) and mineral composition in major (Ca, K, P) and minor (Fe, Mn, Na, Zn) elements in the alfalfa samples.

#### Prediction capacity of the model

The prediction capacity of the model was assessed using the ratio performance deviation (RPD) parameter defined as the relationship between the standard deviation of the chemical method (SD ref) and that of prediction in the NIR model (SEP). Regarding the RPD values, we again point out that depending on the authors, different criteria may be found.

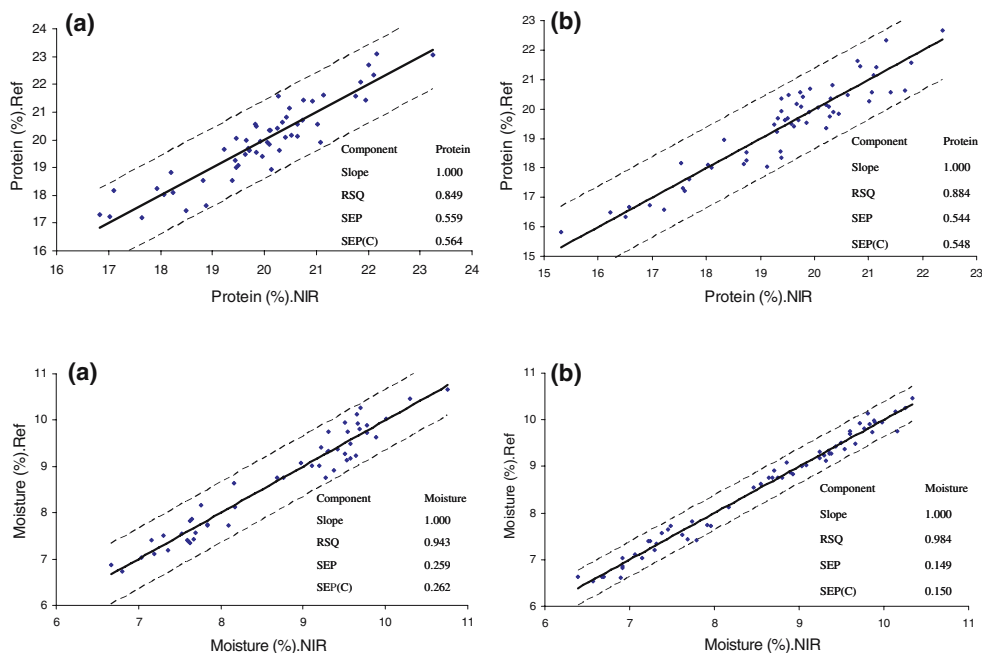
Thus, Williams et al. [37, 38] suggested that RPD should be higher than 2.5 in any equation with an acceptable predictability and RPD values of  $\geq 3$  are excellent. In those and other works, the ratio between the standard deviation of the calibration set to SECV or SEP was used as the RPD value. The RPD values obtained in compacted samples for protein and moisture (2.6 and 4.2), and in ground samples for protein and moisture (2.9 and 7.9) and for the mineral composition in Ca, K, P, Fe, Mn, Na, Zn (3.1, 3.4, 3.6, 4.8, 2.8, 7.5, 2.9) show that the NIR equations obtained can be applied to unknown samples.

From these data it may be deduced that the NIRS technique, using a fibre-optic probe, is a good alternative for the determination of protein, moisture and mineral composition of major (Ca, K, P) and minor (Fe, Mn, Na, Zn) elements in alfalfa samples.

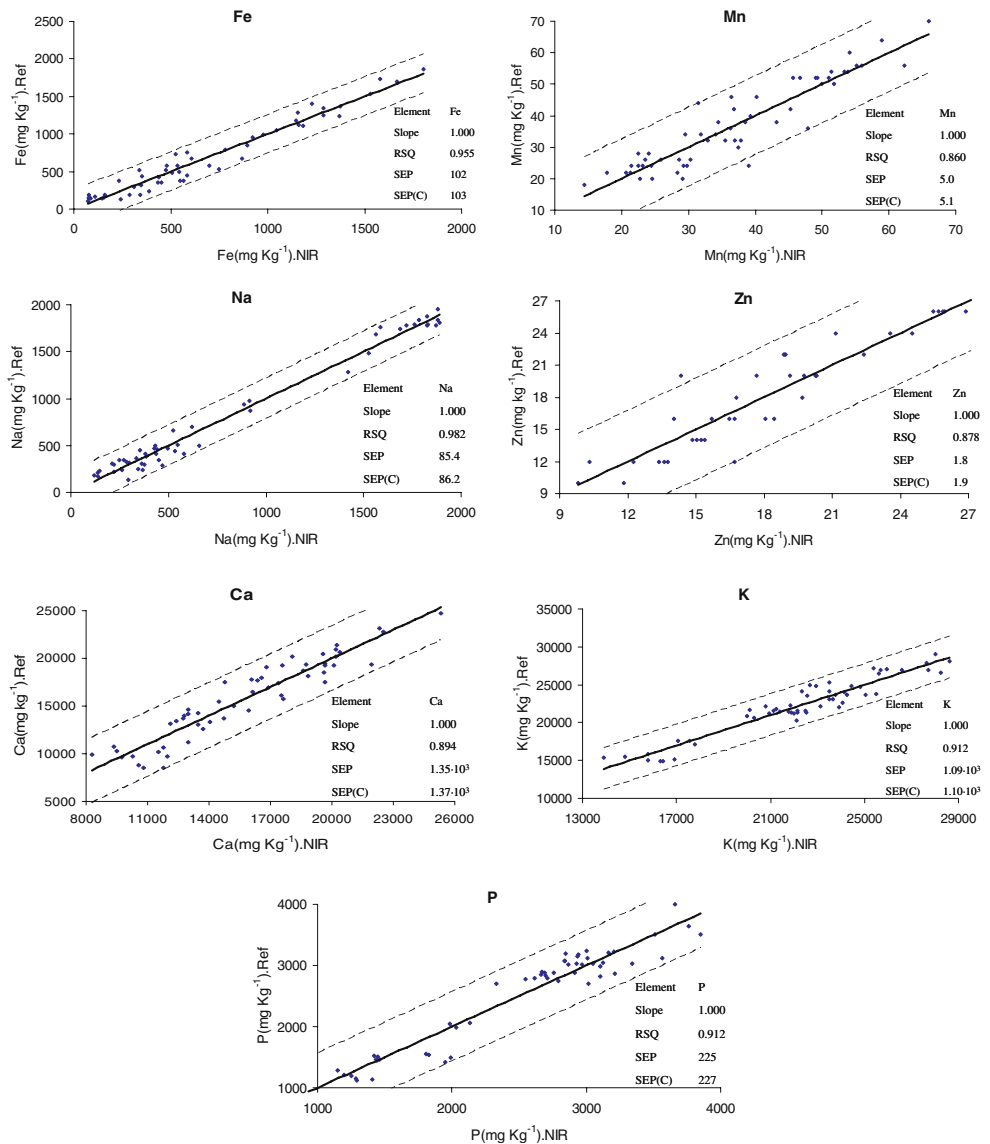
#### External Validation

We checked the robustness of the method by applying NIRS technology to 10 new samples that did not belong to

**Fig. 2** Comparison of reference values with the values predicted by the calibration equations for protein and moisture in **a** un-ground and **b** ground alfalfa



**Fig. 3** Comparison of reference values with the values predicted by the calibration equations for mineral composition in major (Ca, K, P) and minor (Fe, Mn, Na, Zn) elements in the alfalfa samples



the calibration group in the case of protein, and 12 in the case of all the minerals except Zn, for which 8 were used. The procedure was as follows: spectra were recorded in triplicate and the spectral mean was taken. The calibration equations obtained during the work were then applied and the predicted values were compared with those obtained later using the reference chemical methods (Table 5). The difference found between the reference method and the NIRS technique in the external validation was 8.5 and 9.4% for protein and moisture and less than 10% for the mineral composition in all cases, except Na (22%) and Zn (14%), for which the content range parameter was similar to that of the samples of the calibration group. Our work was validated over a whole year by comparing the results we obtained with NIR and those obtained at an accredited laboratory (Aquimisa, Spanish industrial identification

**Table 5** Differences (%) between the reference method and the NIRS method. Student's t-test for paired values between both methods

	Component	P (level of significance)	Differences (%)
Unground	Protein	0.40	6.7
	Moisture	0.49	3.1
Ground	Protein	0.69	8.5
	Moisture	0.07	9.4
Major	Ca	0.79	7.7
	K	0.87	3.4
	P	0.14	9.3
Minor	Fe	0.83	20.1
	Mn	0.78	10.4
	Na	0.27	22.7
	Zn	0.26	14.5

number CIF, B-37289923) that used reference chemical methods, with excellent results.

The NIRS methodology and chemical method were compared for the parameters analysed using the t-test corresponds to Student's t-test for paired values. In each case, the level of significance was obtained. When this value was greater than 0.05 (chosen as the minimum level of significance) the null hypothesis was accepted i.e. there were no differences among the different results. The levels of significance ranged between 0.07 for moisture in the ground samples and 0.8 for Ca, K, Fe and Mn. For all parameters the level of significance was higher than 0.05 (chosen as the minimum level of significance); i.e., there were no differences among the results obtained. It may be concluded that the different analytical methods used afford significantly similar results.

## Conclusions

The results show that the analytical method discussed, employing a fibre-optic probe with which NIR spectra were measured by applying the fibre-optic probe directly on ground samples, in direct contact with the sample, is rapid and non-contaminating. This method can be used for monitoring alfalfa quality. In summary, it may be concluded that the NIRS technique with a fibre-optic probe is suitable for the determination of protein, moisture and mineral composition in major (Ca, K, P) and minor (Fe, Mn, Na, Zn) elements in alfalfa samples.

**Acknowledgements** The authors are grateful to the Junta de Castilla y León, project SA 057A05 for the financial support.

## References

- Kume S, Toharmat T, Nonaka K, Oshita T, Nakui T, Ternouth JH (2001) *Anim Feed Sci Tech* 93:157
- Murray I, Cowe I (eds) (1996) *Recent advances in animal nutrition*. University of Nottingham Press, UK
- Coelho M, Hembry FG, Barton FE, Saxton AM (1988) *Anim Feed Sci Tech* 20:219
- Norris KH, Norris RF, Barnes RJ, Moore JE, Shenk JS (1976) *J Anim Sci* 43:889
- Shenk JS, Westerhaus MO (1995) *Forage quality evaluation and utilization*. ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI
- Barton FE, Windham WR (1988) *J Assoc Off Anal Chem* 71:1162
- Gordon FJ, Cooper KM, Park RS, Steen RW (1998) *Anim Feed Sci Tech* 70:339
- Deaville ER, Givens DI (1998) *Anim Feed Sci Tech* 72:41
- Alomar D, Fuchslocher R, Stockebrands J (1999) *Anim Feed Sci Tech* 80:309
- Valdes C, Andres S, Giráldez FJ, Garcia R, Calleja A (2006) *J Sci of Food and Agric* 86:308
- Shenk JS, Landa I, Hoover MR, Westerhaus MO (1981) *Crop Sci* 21:355
- Shenk JS, Westerhaus MO, Hoover MR (1979) *Dairy Sci* 62:807
- Clark DH, Cary EE, Mayland HF (1987) *Agron J* 79:485
- Vázquez de Aldana BR, García Criado B, García Ciudad A, Pérez Corona ME (1996) *Commun Soil Sci Plant Anal* 26:1383
- Ruano-Ramos A, García Ciudad A, García Criado B (1999) *Anim Feed Sci Tech* 77:331
- Cozzolino D, Moron A (2004) *Anim Feed Sci Tech* 111:61
- Petisto C, García-Criado B, Vázquez de Aldana BR (2005) *Anal Bioanal Chem* 382:458
- Udelhoven T, Emmerling C, Jarmer T (2003) *Plant and Soil* 251:319
- Atanassova S, Pavlov D, Todorova E, Todorova M (2004) *Near infrared spectroscopy. Proceedings of the 11th International Conference. NIR publications*
- Wu Y, Chen J, Wu X, Tian O, Ji J, Qin Z (2005) *Appl Geochem* 20:1051
- Halgerson JL, Sheaffer CC, Martin NP, Peterson PR, Weston SJ (2004) *Agron J* 96:344
- Shenk JS, Workman JJ, Westerhaus M (2001) In: Burns DA, Ciurczak E (eds) *Handbook of near infrared analysis*. Marcel Dekker, New York
- Azzouz T, Puigdoménech A, Aragay M, Tauler R (2003) *Anal Chim Acta* 484:121
- González Martín I, González Pérez C, Hernández Méndez J, Álvarez García N, Hernández Andaluz JL (2001) *Anal Chim Acta* 453:281
- González Martín I, González Pérez C, Hernández Méndez J, Álvarez García N (2002) *Anal Chim Acta* 468:2931
- González Martín I, González Pérez C, Hernández Méndez J, Álvarez García N (2003) *Meat Sci* 65:713
- González Martín I, González Pérez C, Hernández Méndez J, Álvarez García N, García Villaescusa V (2006) *Talanta* 69:711
- Martens H, Naes T (eds) (2001) *Multivariate calibration*. Wiley, Chichester
- Shenk JS, Westerhaus MO (1995) *Analysis of agriculture and food products by near infrared reflectance spectroscopy*. Monograph, NIRSystems
- Davies AMC, Williams P (eds) (1996) *Near infrared spectroscopy: the future waves. The Proceedings of the Seventh International Conference on Near Infrared Spectroscopy*. NIR Publications, Chichester, UK
- Barnes RJ, Dhanoa MS, Lister SJ (1989) *Appl Spectrosc* 43:772
- Shenk JS, Westerhaus MO (1995) *Routine operation calibration development and network system management manual*. NIRSystems Inc, Silver Spring MD 20904 USA
- Geladi P, Mac Dougall D, Martens H (1985) *Appl Spectrosc* 39 (3):491
- Dhanoa MS, Lister SJ, Barnes RJ (1995) *Appl Spectrosc* 49 (6):765
- Murray I (1986) *The NIR spectra of homologous series of organic compounds*. In: Hollo J, Kafka KF, Gonczy JL (eds) *Proceedings of the NIR/NIT International Conference*. Akademiai Kiado, Budapest, Hungary
- Garnsworthy PC, Wiseman J, Fegeros K (2000) *J Agric Sci (Camb)* 135:409
- Williams PC, Sobering DC (1993) *Near Infrared Spectr* 1:25
- Williams PC, Norris K (eds) (2001) *Near-infrared technology in the agricultural and food industries*. American Association of Cereal Chemists, St Paul, Minnesota





González-Martín, I.; Hernández-Hierro J.M. Detection and quantification of additives (urea, poultry litter, biuret) in alfalfas by NIR spectroscopy with fibre-optic probe. *Talanta*, 2008, 76, 1130-1135.





## Detection and quantification of additives (urea, biuret and poultry litter) in alfalfas by nir spectroscopy with fibre-optic probe

Inmaculada González-Martín\*, José Miguel Hernández-Hierro

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de CC, Químicas, Universidad de Salamanca, C/Plaza de la Merced s/n, 37008 Salamanca, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 31 January 2008

Received in revised form 9 May 2008

Accepted 14 May 2008

Available online 21 May 2008

#### Keywords:

Additives

Urea

Biuret

Poultry litter

Detection

Quantification

Near infrared spectroscopy

Fibre-optic probe

Alfalfa

### ABSTRACT

The additives (urea, biuret and poultry litter) present in alfalfa, which contribute non-proteic nitrogen, were analysed using near infrared spectroscopy (NIRS) technology together with a remote reflectance fibre-optic probe. We used 75 samples of known alfalfa without additives and 75 samples with each of the additives, urea (0.01–10%), biuret (0.01–10%) and poultry litter (1–25%). Using the discriminant partial least squares (DPLS) algorithm, the presence or absence of the additives urea, biuret and poultry litter is classified and predicted with a high prediction rate of 96.9%, 100% and 100%, obtaining the equations of discrimination for each additive. The regression method employed for the quantification was modified partial least squares (MPLS). The equations were developed using the fibre-optic probe to determine the content of urea, biuret and poultry litter with multiple correlation coefficients (RSQ) and prediction corrected standard errors (SEP (C)) of 0.990, 0.28% for urea, 0.991, 0.29% for biuret and 0.925, 2.08% for poultry litter. The work permits the instantaneous and simultaneous prediction and determination of urea, biuret and poultry litter in alfalfas, applying the fibre-optic directly on the ground samples of alfalfa.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Alfalfa (*Medicago sativa*) is one of the main forages produced in the Mediterranean area. The alfalfas, especially the alfalfa hay, require systematic quality control, because their nutritive value varies in relation to the quality of the initial raw material, conservation, storage (fermentation, bacterial and fungal contamination) and adulteration with ingredients such as urea, biuret and poultry litter among others [1], which are used as sources of nitrogen.

The legislation of the EU (Regulation CE, no. 1831/2003, 22 September 2003) [2] regulates the feed for cattle and the procedures of feeding safety, which must be fulfilled; this legislation controls the maximum content of urea and its derivatives considered as “nutritional” additives for animal feed and which are intentionally added to fodder. The compounds which contribute non-proteic nitrogen (NNP), such as ammoniac, urea, biuret and poultry litter, can be used in forage in a certain quantity as a substitute for protein, both in the fattening of bovines to produce meat and in the feeding of dairy cows and other animals. In the systems of animal production, urea [3,4] is the best known exponent of NNP

and is widely used due to its easy obtainment and low cost; it is a compound with an approximate content of 46% nitrogen. It is recommended that not more than 1% of urea should be included in the ration of ruminants in order to prevent the intoxication due to excess ammoniac in the rumen [5]; however, levels of incorporation of 3% have been reported, with no signs of toxicity [6,7]; the urea is added to the alfalfa in silo storage. To this end, between 5 and 6 kg of urea can be added per ton of material (i.e. 0.5–0.6% bulk weight) at the time of filling the silo; this procedure is also employed with the rest of the additives. Biuret is produced from urea by heating and contains 41% nitrogen. However, it is more expensive than urea and the animals require an adaptation period of between 2 weeks and 2 months [8–11]. The poultry litter, avian residue, adequately treated can be utilised as a source of nutrients (proteins, fats, minerals, etc.) in animal feeding. In the case of alfalfas, added as dry excreta, the risks of possible contamination with bacteria and/or fungi and the excess of minerals, such as copper, convert the use of poultry litter into an extensive task for it to be trustworthy [12]. Poultry litter contains total N (depending on the food ingested by the birds) with a mean value of 19.3 mg/g dry weight and is used as a protein supplement in forages like alfalfa for ruminants [13–15] and for the content in P as a mineral source [16].

The former bibliographical antecedents [3,5,10] describe the effects on animals and the determination of the contents of N, P,

\* Corresponding author. Tel.: +34 23 294483; fax: +34 23 294483.

E-mail address: [inmaglez@usal.es](mailto:inmaglez@usal.es) (I. González-Martín).

fibre, dry material, metabolizable energy, by wet chemical methods of reference when the additives that contribute non-protein nitrogen are added to forages including alfalfa.

The methods used for determining parameters of interest in alfalfa, such as total protein and the content in different minerals, are tedious, slow and not very economically viable for application in routine analyses [17,18]. The use of near infrared spectroscopy (NIRS) allows analytes to be determined with little or no sample preparation. This technique has been used in forages such as alfalfa to determine their quality [19,20], fibre and crude protein contents [21], digestibility [22], the changes that occur during silo storage [23], and after they have been subjected to a drying process [24]. It has also been used to determine the different nitrogen fractions [25] and mineral contents [26,27]. More recently NIRS technology with fibre-optic probe has been used [28,29], which permits the determination of vitamins, proteins, fat, humidity and mineralogical elements in alfalfa. Works that use NIRS technology to quantify the presence of additives, such as urea, biuret and poultry litter in alfalfas have not been found.

The objective of this work is the use of NIRS technology with fibre-optic probe of remote reflectance for the detection and quantification of the additives urea, biuret and poultry litter in alfalfas.

## 2. Material and methods

### 2.1. Samples

A set of 75 alfalfa samples were collected during 2004–2006. Their composition in protein varied from 13.06% and 21.04%, with a mean and standard deviation of 18.84% and 1.50%, respectively. The 75 samples of alfalfa of known origin were ground (grinder KNIFETEC 1095, FOSS Tecator, Höganäs, Sweden). An aliquot of each of the 75 original alfalfa samples was spiked with the urea, biuret and poultry litter additives, such that for the experiments, we had 75 unspiked samples, 75 spiked with urea, 75 with biuret and 75 with poultry litter. In the case of urea and biuret, the levels of enrichment employed were 0.01, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 5.5, 7.0, 8.5, 10 in percentage (weight/weight), with a minimum of five samples for each enrichment level. In the case of poultry litter, a single origin was used and the level of enrichment was between 1 and 25% by weight, with levels of 1.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0%, with a minimum of 12 samples for each level (Table 1). The urea and biuret are solids (Scharlau; Reactive degree ACS) and are mixed directly with the ground alfalfa. In the case of the poultry litter, it is ground previously and later mixed with the alfalfa. The poultry litter samples were not used as reference material; they came from a farm. The prepared samples, to the human eye, do not present any anomaly, which permits the detection of the presence of any of the additives.

### 2.2. NIR spectroscopy

A Foss NIR System 5000 with a standard 1.5-m, 210/7210 bundle fibre-optic probe, Ref no. R6539-A, was used. The probe employs a remote reflectance system and uses a ceramic plate as reference. The window is of quartz with a 5 cm × 5 cm surface area, measur-

ing reflectance in the IR zone close to 1100–2000 nm. The spectra were recorded at intervals of 2 nm, performing 32 scans for both the reference and samples. To minimise sampling error, all the samples were analysed in triplicate. The software used was Win ISI 1.50.

### 2.3. Chemometric techniques

For the qualitative analysis, a model of groups is developed and the equations of discrimination by the algorithm discriminate partial least squares (DPLS). The quantification is performed by the method of lineal multivariate lineal calibration, modified partial least squares (MPLS). For the qualitative analysis, supervised pattern recognition refers to techniques in which *a priori* knowledge about the category membership of samples is used for classification. Within the supervised methods, discriminatory analysis is based on the concept that a discriminatory function finds explicit frontiers between classes and in this way the space is divided into regions for each of the classes. It consists of two stages, the construction of the discriminatory functions and determination of the rules of classification.

To obtain the equations of discrimination, the algorithm discriminate partial least squares (DPLS) [30] was used, which is a lineal, parametric, discriminate method and permits the modelling of classes (modelling classes); it has the advantage of being able to handle collinear X-variables, missing data and noisy variables and can deal with overlapped classes. The calibration method applied to this procedure is PLS [31]. In this study for DPLS, PLS 2 was used in all cases. The PLS 2 was applied to the dummy variables (as many classes) with a value of 1 if an object was a member of a class and 0 if otherwise. To evaluate the model of discrimination, it was performed by cross-validation; this method was conducted as in normal PLS to test the accuracy of the discrimination [32,33]. The predicted values of dummy variables were transformed in the other scale, in this way; a limit to belong in a class was 1.5 as cut-off value. If the highest number is associated with the wrong group, the result is a miss. The studies using DPLS for classification are few for NIRS [34].

The quantification of the additives is performed by the modified partial least squares (MPLS) regression method. This was used to obtain the NIR equations for all the parameters studied. Partial least squares (PLS) regression is similar to principal component regression (PCR), but uses both reference data (chemical, physical, etc.) and spectral information to form the factors useful for fitting purposes [35]. MPLS is often more stable and accurate than the standard PLS algorithm. In MPLS, the NIR residuals at each wavelength, obtained after each factor has been calculated, are standardised (dividing by the standard deviations of the residuals at each wavelength) before calculating the next factor. When developing MPLS equations, cross-validation is recommended in order to select the optimal number of factors and to avoid overfitting [36]. For cross-validation, the calibration set is divided into several groups; each group is then validated using a calibration developed on the other samples. Finally, validation errors are combined into a standard error of cross-validation (SECV) [37]. It has been reported that the SECV is the best single estimate for the prediction capability of the equation, and that this statistic is similar to the average standard error of prediction (SEP) from 10 randomly chosen prediction sets [38]. The cross-validation groups used were six for urea, biuret and poultry litter. The effects of scattering were removed using multiplicative scatter correction (MSC), standard normal variate (SNV), DeTrend (DT) or SNV-DT [39,40]. Moreover, the mathematical treatments were tested in the development of the NIRS calibrations, 2,4,4,1, where the first digit is the number of the derivative, the second is the gap over which the derivative

**Table 1**  
Grouping of training and calibration samples

Components	N	Minimum	Maximum	Mean	S.D.
Urea	65	0.01	10.00	3.39	3.12
Biuret	65	0.01	10.00	3.39	3.12
Poultry litter	65	1.00	25.00	12.63	8.42

Percentage of additives added to the samples of alfalfa.

is calculated, the third is the number of data points in a running average or smoothing, and the fourth is the second smoothing [41]. The statistics used to select the best equations were RSQ (multiple correlation coefficients) and the standard error of cross-validation (SECV). Of the total of samples available in each case, 65 constitute the training or calibration group (depending on whether classification or quantification is the objective) and 10 samples are left to externally validate the models.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Spectral information

The NIR spectra were recorded applying the fibre-optic probe directly to the samples of ground alfalfa, with and without residues. In Fig. 1, the NIR spectra of the alfalfa are compared with those of the additives urea, biuret and poultry litter, and the spectra of the alfalfa with and without the presence of the additives. The NIR spectra reflect the variability of the additives and their proportion, which permits their detection and quantification.

#### 3.2. Qualitative analysis

##### 3.2.1. Classificatory analysis

Firstly the modelling of the groups was carried out using the NIR spectral data and the discriminate analysis; thus the explicit algebraic models denominated DPLS were constructed. The training samples are constituted by the alfalfa samples with and without additives, as indicated in Table 1. The results of the modelling of classes of the groups considered are presented in Table 2; we can conclude that by the NIR spectral information and the DPLS analysis we can classify and predict the presence or absence of the

additives urea, biuret and poultry litter individually or as a whole (some of the three additives simultaneously) with a high degree of efficacy.

In the models separated by each additive in internal validation, a prediction rate is obtained (mean of 98.7% and in external validation 93.3%). When all the models are used together, that is, they are classified globally, the three additives simultaneously, the prediction rate is 96.9% in internal validation and 92.5% in external validation. The poorly classified samples of the individual components are as follows: Always in the presence in internal validation, two samples with urea additive with an enrichment of 1%. In external validation: one sample with 0.1% urea additive. In the global analysis: two samples with 1% urea additive (the sample coincides with a poorly classified sample in the internal validation, individual constituent) and two urea samples enriched at 0.5%; in external validation one sample with 0.5% urea enrichment.

Therefore, it can be concluded that the DPLS method can perform the classification and predict the three additives in alfalfa (urea, biuret and poultry litter) with high prediction rates of 96.9%, 100% and 100%, indicating that it is an appropriate method of classification of additives in alfalfa with the spectral data. This demonstrates that NIR spectroscopy and discriminate DPLS analysis permit a clear differentiation between the samples with and without additives.

The use of these discriminate models can be carried out in two ways, systematically, applying it to all the samples before the quantification of protein, developed in an earlier work [29], or if in the determination of protein the values of this parameter surpass the habitual margins or the sample is eliminated because of spectral criteria,  $H > 3$ , the discriminate analysis is used to classify and predict the presence or absence of some of the additives and later quantify them.

##### 3.2.2. Equations of discrimination

The equations of discrimination are obtained by the algorithm discriminant partial least squares (DPLS) for each constituent, urea, biuret and poultry litter (with 130 samples) and the global equation (with 260 samples) for the three samples simultaneously.

In Table 3 the number of samples of each group, the interval of application in the equation of discrimination and the statistics, RSQ, SEC and SECV are presented, like the groups of cross-validation and the factors PLS (this number is greater in this method compared with normal PLS). The data are obtained without any mathematical treatment of the NIR spectra or scattering. The results obtained indicate that the discriminate functions are capable of predicting the pertinence of an object to one category or another, quantitatively, with the statistics RSQ and SECV, are good in a regression and the percentage of samples are correctly classified.

#### 3.3. Quantitative analysis: calibration equations

A PCA analysis was carried out with the 65 samples of each group of additives (urea, biuret and poultry litter). The risk of mistakes in the equations under practical conditions is very low or almost nil when using the standardised H-statistic (Mahalanobis distance) during routine analysis of unknown samples; zero samples were removed for urea, two for biuret and two for poultry litter. In all cases, the spectral variability explained was 99%, in each case taking the following principal components as 6 for urea and biuret and 5 for poultry litter.

Calibrations were performed by modified partial least squares regression (MPLS). Using the  $T \geq 2.5$  criterion, samples that were different from the population owing to chemical criteria were removed from the set. According to this chemical criterion, seven

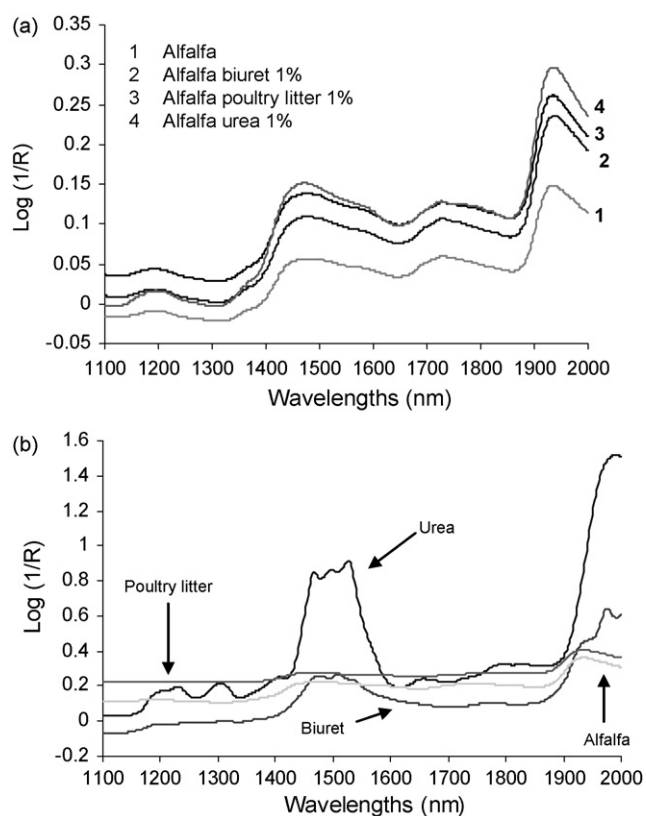


Fig. 1. (a) Spectra of the alfalfa with and without the presence of additives. (b) NIR spectra of the alfalfa with those of the additives urea, biuret and poultry litter.

**Table 2**  
Classificatory analysis: samples correctly classified (%)

Constituent	Internal validation		External validation	
	Presence	Absence	Presence	Absence
Urea	96.9	95.4	90.0	80.0
Biuret	100	100	100	90.0
Poultry litter	100	100	100	100
All the additives	Urea	93.8	Urea	90.0
	Biuret	100	Biuret	100
	Poultry litter	100	Poultry litter	80.0

samples were removed from the calibration set in the case of urea, five for biuret and four in the case of poultry litter.

The statistical parameters of the calibration equations for each additive in the alfalfa are shown in Table 4 where  $N$ , the number of samples used to obtain the calibration equation, is presented after removing the samples for spectral (H criterion) or for chemical reasons (T criterion). The best of the different mathematical treatments, concentration range, and standard deviations for the presence of urea, biuret and poultry litter in alfalfa are also shown. The results obtained indicate that it is possible to determine these parameters in alfalfa with broad applicability.

### 3.4. Validation

#### 3.4.1. Internal validation (prediction)

Model evaluation was performed by cross-validation. In this method, the set of calibration samples is divided into a series of subsets. In all cases, cross-validation was performed by splitting the population into six groups. Of these, five were taken for the calibration set and one for the prediction set. The process is repeated as many times as there are sets, so that all pass through the calibration set and the prediction set. Using this process, we validated the model used and checked its prediction capacity. Fig. 2 shows the correlations of the values obtained at the laboratory with respect to those predicted by NIR with a fibre-optic probe for urea, biuret and poultry litter in the alfalfa samples.

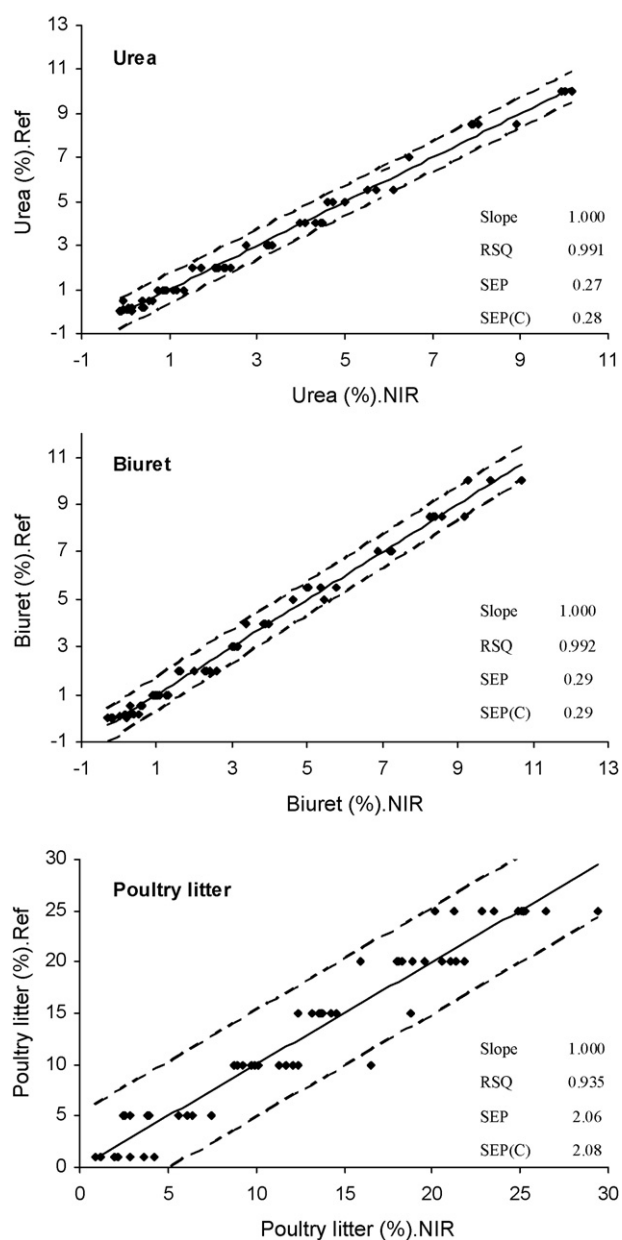
#### 3.4.2. Prediction capacity of the model

The prediction capacity of the model was assessed using the RPD (ratio performance deviation) parameter [42], defined as the relationship between the standard deviation of the chemical method (S.D. ref) and that of prediction in the NIR model (SEP). If the RPD value is greater than 2.5, it is assumed that the calibration model is adequate. The RPD values obtained in ground samples for urea, biuret and poultry litter (11.0, 11.1, 4.0) show that the NIR equations obtained can be applied to unknown samples.

From these data, it may be deduced that the NIRS technique, using a fibre-optic probe, is a good alternative for the determination of the additives urea, biuret and poultry litter in alfalfa samples.

#### 3.4.3. External validation

We checked the robustness of the method by applying NIRS technology to 10 new samples that did not belong to the calibration group. The procedure was as follows: Spectra were recorded in triplicate and the spectral mean was taken. Then, the calibration equations obtained during the work were applied and the predicted values were compared with the data on enrichment (%) of the spiked alfalfa samples. The NIRS and chemical methodologies were compared for the three additives using the Student's  $t$ -test for paired values with these samples. The levels of significance were found to be 0.42 for urea, 0.66 for biuret and 0.33 for poultry litter. The level of significance for all constituents was higher than



**Fig. 2.** Comparison of reference values with the values predicted by the calibration equations for additives urea, biuret and poultry litter in alfalfa. RSQ, multiple correlation coefficients; SEP, standard prediction error; SEP(C), standard prediction error corrected by the bias.

**Table 3**  
Presence of additives in alfalfa: equations of discrimination

Components	N	S.D.	Estimate	RSQ	SEC	SECV	Cross-validation group	No. of fac PLS
Urea	130	0.5	0.0–1.5	0.755	0.247	0.326	6	17
Biuret	130	0.5	0.0–1.5	0.953	0.108	0.179	6	22
Poultry litter	130	0.5	0.0–1.5	0.934	0.128	0.202	6	19
Global	260	0.43	0.0–1.3	0.793	0.197	0.235	4	25

N, number of samples; S.D., standard deviation; RSQ, multiple correlation coefficients; SEC, standard error of calibration; SECV, standard error of cross-validation; PLS, partial least squares.

**Table 4**  
Determination of additives in alfalfa: calibration statistical descriptors for the NIR

Components	N	Mathematical treatment	S.D.	Estimate	RSQ	SEC	SECV	No. of fac PLS	Cross-validation group	RPD
Urea	58	SNV 2,4,4,1	2.97	0.00–11.90	0.990	0.29	0.59	7	6	11.0
Biuret	58	None 2,8,6,1	3.22	0.00–12.99	0.991	0.31	0.45	8	6	11.1
Poultry litter	59	Detrend 1,4,4,1	8.19	0.00–38.08	0.925	2.24	3.21	6	6	4.0

N, number of samples; SNV, standard normal variate; S.D., standard deviation; RSQ, multiple correlation coefficients; SEC, standard error of calibration; SECV, standard error of cross-validation; PLS, partial least squares; RPD, ratio performance deviation.

**Table 5**  
Determination of additives in alfalfa: external validation of the calibration model (10 samples)

Components	P (level of significance)	Residual mean	RMSE
Urea	0.42	0.78	1.17
Biuret	0.65	0.54	0.76
Poultry litter	0.33	4.64	6.31

RMSE, root mean standard error.

0.05 (chosen as the minimum); i.e., there were no differences between the results obtained; thus it may be concluded that the method provides significantly equal data to the starting reference data. Table 5 shows the results obtained in the external validation, the means of the residuals, and the root mean standard error (RMSE) values. Our findings show that the analytical method discussed – employing a fibre-optic probe and measuring the samples by direct application of the probe – is rapid, does not require sample treatment and can be used to monitor the urea, biuret and poultry litter parameters in alfalfas.

#### 4. Conclusions

The results show that the analytical method discussed, employing a fibre-optic probe with which NIR spectra were measured by applying the fibre-optic probe directly on ground samples, in direct contact with the sample, is rapid and non-contaminant. This method can be used for monitoring alfalfa quality. In summary, it may be concluded that the NIRS technique with a fibre-optic probe is suitable for detection and quantification of additives (urea, biuret and poultry litter) in alfalfa samples, with limits of detection (the minimum amount that can be classified as positive by DPLS) of 0.01% for urea, 0.01% for biuret and 1% for poultry litter.

The work permits the instantaneous and simultaneous determination of urea, biuret and poultry litter in alfalfas, applying the fibre-optic probe directly to the samples, thereby affording faster analysis times because sample preparation is minimal or unnecessary.

#### References

[1] C. de Blas, G.G. Mateos, P.G. Rebollar, FEDNA. Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la formulación de los piensos compuestos, 2nd ed., Fundación española para el desarrollo de la nutrición animal, Madrid, España, 2003, p. 423.

[2] Regulation (EC) No. 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition, Official Journal of the European Union L 268 (2003) 29.

[3] Agricultural Research and Food Council, Protein Nutr. Abstr. Rev. Ser. B 62 (1992) 787–835.

[4] Institut de la Recherche Agronomique, Alimentation des Bovins, Ovins, et Caprins, R. Jarrige, Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, 1988.

[5] A.D. Adamu, J.R. Russell, M.C. Gilliard, A. Trenkle, Anim. Feed Sci. Technol. 22 (1989) 227.

[6] L. Lines, W. Weiss, J. Dairy Sci. 79 (1996) 1992.

[7] G.A. Broderick, W.M. Craig, D.B. Ricker, J. Dairy Sci. 76 (1993) 2266.

[8] National Academy Press, Nutrient Requirements of Beef Cattle, 7th rev. edition, National Academy Press, Washington, DC, 1996.

[9] G.A. Broderick, J.H. Kang, J. Dairy Sci. 63 (1980) 64–75.

[10] C.A. Löest, E.C. Titgemeyer, J.S. Drouillard, B.D. Lambert, A.M. Trater, Anim. Sci. Technol. 94 (2001) 115.

[11] E.S. Vanzant, R.C. Cochran, J. Anim. Sci. 72 (1994) 1059.

[12] K.E. Webb, J.P. Fontenot, J. Anim. Sci. 41 (1975) 1212.

[13] J.P. Fontenot, K.E. Webb Jr., Am. Soc. Exp. Biol. 33 (1976) 1936.

[14] National Research Council, Nutrient Requirements of Domestic Animals. Nutrient Requirements of Beef Cattle, 7th ed., National Academy of Sciences, Washington, DC, 1996.

[15] S. Thakur, J.P. Srivastava, A.K. Verma, B.S. Gupta, J. Anim. Sci. 52 (1982) 1260.

[16] G.M. Barnett, Bioresource Technol. 49 (1994) 139.

[17] S. Kume, T. Toharmat, K. Nonaka, T. Oshita, T. Nakui, J.H. Ternouth, Anim. Feed Sci. Technol. 93 (2001) 157.

[18] I. Murray, in: P. Garnsworthy (Ed.), Recent Advances in Animal Nutrition, University of Nottingham Press, UK, 1996.

[19] K.H. Norris, R.F. Barnes, J.E. Moore, J.S. Shenk, J. Anim. Sci. 43 (1976) 889.

[20] J.S. Shenk, M.O. Westerhaus, Forage Quality Evaluation and Utilization, A.S.A., C.S.S.A., S.S.S.A., Madison, WI, 1995.

[21] F.E. Barton, W.R. Windham, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71 (1988) 1162.

[22] F.J. Gordon, K.M. Cooper, R.S. Park, R.W. Steen, Anim. Feed Sci. Technol. 70 (1998) 339.

[23] E.R. Deaville, D.I. Givens, Anim. Feed Sci. Technol. 72 (1998) 41.

[24] D. Alomar, R. Fuchslocher, J. Stockebrands, Anim. Feed Sci. Technol. 80 (1999) 309.

[25] C. Valdes, S. Andres, F.J. Giráldez, R. Garcia, A. Calleja, J. Agric. Food Chem. 86 (2006) 308.

[26] J.L. Halgerson, C.C. Sheaffer, N.P. Martin, P.R. Peterson, S.J. Weston, Agron. J. 96 (2004) 344.

[27] D.H. Clark, H.F. Mayland, R.C. Lamb, Agron. J. 79 (1987) 485.

[28] I. González-Martín, J.M. Hernández-Hierro, M. Bustamante-Rangel, N. Barros-Ferreiro, Anal. Bioanal. Chem. 386 (2006) 1553.

[29] I. González-Martín, J.M. Hernández Hierro, J.M. González Cabrera, Anal. Bioanal. Chem. 387 (2007) 2199.

[30] L. Stahle, S. Wold, J. Chemometr. 1 (1987) 185.

[31] G. Vandeginste, D. Massart, L. Buydens, S. De Jong, P. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Elsevier, NY, 1988, p. 207.

[32] M. Sharaf, D. Illman, B. Kowalski, Chemometrics, Wiley/Interscience, NY, 1986, p. 228.

[33] M. Tenenhaus, La Regression PLS, Technip, Paris, 1998.

[34] L. Xie, Y. Ying, T. Ying, J. Kell, J. Food Eng. (2007) 395.

[35] H. Martens, T. Naes, Multivariate Calibration, Wiley, Chichester, 2001, p. 116.

[36] J.S. Shenk, M.O. Westerhaus, Analysis of Agriculture and Food Products by Near Infrared Reflectance Spectroscopy, NIR Systems, 1995.

- [37] A.M.C. Davies, P. Williams (Eds.), *Proceedings of the Seventh International Conference on Near Infrared Spectroscopy*, NIR Publications, Chichester, West Sussex, UK, 1996.
- [38] P.C. Williams, K. Norris, *Near Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*, American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, MN, USA, 1997.
- [39] P. Geladi, D. Mac Dougall, H. Martens, *Appl. Spectrosc.* 39 (1985) 491.
- [40] M.S. Dhanoa, S.J. Lister, R.J. Barnes, *Appl. Spectrosc.* 49 (1995) 765.
- [41] J.S. Shenk, M.O. Westerhaus, *Routine Operation, Calibration, Development and Network System Management Manual*, NIR Systems, Silver Spring, MD, USA, 1995.
- [42] P.C. Williams, D.C. Sobering, *Near Infrared Spectr.* 1 (1993) 25.



**ANEXO II-Certificado de la empresa**  
**Aquimisa**



D. Jesús María García Sánchez, actuando en calidad de gerente y como representante legal de la empresa Aquimisa, s.l. con nº de CIF B-37289923

## **EXPONE:**

Que durante las campañas de los años 2005 y 2006 se ha realizado en el Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Salamanca la determinación de proteína y humedad en 1175 muestras de alfalfa pertenecientes a la empresa Aquimisa (708 en el año 2005 y 465 en el año 2006), mediante la tecnología NIRS con sonda de fibra óptica de reflectancia remota. De acuerdo con el método desarrollado por D. José Miguel Hernández Hierro en su trabajo de tesis doctoral dirigido por la Profesora Titular de Universidad M<sup>a</sup> Inmaculada González Martín.

El procedimiento implica el uso de las ecuaciones de calibración NIRS optimizadas a lo largo del tiempo y aplicadas a muestras de alfalfa triturada de composición desconocida como método de rutina, dicho proceso ha sido realizado por D. José Miguel Hernández Hierro. Los datos de proteína y humedad se han validado y contrastado periódicamente en los laboratorios de la empresa Aquimisa mediante métodos oficiales de vía húmeda a lo largo de las dos campañas, con resultados excelentes.

Para que conste y surta los efectos oportunos firmo en Salamanca a 5 de Junio de 2007.



Fdo: Jesús María García Sánchez

