

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

FUNDAMENTOS DE LA ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CERCANO

TRABAJO ESCRITO VÍA CURSOS DE EDUCACIÓN CONTINUA

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA**

PRESENTA

Tsiu lin Olloqui Pang

MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora: Ernestina Cervera Flores

VOCAL: Profesora: Silvia de Jesús Mendoza Arellano

SECRETARIO: Profesor: Adolfo García Osuna

1er. SUPLENTE: Profesor: Ciro Eliseo Márquez Herrera

2º SUPLENTE: Profesor: Jorge Rafael Martínez Peniche

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

FACULTAD DE QUÍMICA

ASESORA DEL TEMA: Q. ERNESTINA CERVERA FLORES



SUSTENTANTE: TSIU LIN OLLOQUI PANG



AGRADECIMIENTOS

A mis padres: Josefina Pang y Enrique Olloqui, por su cariño, amor y comprensión en todo momento; los cuales siempre me han apoyado incondicionalmente, dándome los mejores consejos, la valentía y la seguridad para enfrentar cualquier obstáculo enseñándome a ser cada día mejor persona.

A mis hermanos por la compañía y apoyo que siempre me ofrecen: Khen key, Tsiu yen, Enrique y Jorge quienes me han ayudado y guiado en momentos difíciles

A mi abuelita Josefina que siempre hizo más amena mi estancia, consintiéndome en todos mis gustos y me dio la oportunidad de conocer mis raíces

A la UNAM porque en ella he podido cumplir muchos de mis sueños, como el de obtener una formación académica y conocer a grandes personas, maestros y amigos.

A los miembros de mi jurado, por su disposición y ayuda brindadas, en especial a mi asesora Q. Ernestina Cervera que siempre me guío y aconsejo con la dedicación que la caracteriza, a la maestra Silvia Mendoza y al maestro Adolfo García por todas las recomendaciones que hicieron y por el valioso tiempo que me dedicaron para mejorar.

A los mejores amigos que he podido encontrar: Juan Carlos Sánchez que siempre has estado cuando más te necesito, Paola Molina sacándome de todos los problemas, Eréndira García alentándome a seguir adelante, Carmén Alpizar regañándome cuando lo merezco, Josué del Río alegrándome cada día más, César Gómez, Alfredo Espinoza.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. TEORÍA DE LA ESPECTROSCOPIA DEL INFRARROJO CERCANO (NIR por sus siglas en inglés).....	4
2.1 Radiación electromagnética.....	4
2.2 Absorción del NIR por las moléculas.....	6
2.3 Espectroscopia vibracional en el infrarrojo cercano.....	7
2.4 Tipos de vibraciones.....	13
2.5 Reflectancia y Transmitancia en el infrarrojo cercano.....	14
2.6 Ley de Lambert y Beer.....	17
2.7 Ley de Aditividades.....	19
2.8 Instrumentación en el infrarrojo cercano.....	20
2.9 Calibración de los Equipos en NIR.....	24
2.10 Quimometría.....	25
2.11 Interpretación de Espectros.....	27
2.12 Tratamientos de datos espectrales en el NIR.....	35
2.13 Aplicaciones.....	35
3. CONCLUSIONES.....	38
4. BIBLIOGRAFÍA.....	39
5. APÉNDICE.....	42

1. INTRODUCCIÓN

La palabra “espectroscopia” deriva de la raíz latina spectrum (aparición, imagen) y la palabra griega skopia (ver). La espectroscopía se basa esencialmente en la interacción de la radiación electromagnética y la materia a ser analizada. La espectroscopia infrarroja, estudia la absorción de la radiación infrarroja por parte de las moléculas constituyentes de la materia y su relación con las vibraciones de extensión o doblamiento de los enlaces covalentes que las conforman.

La región del espectro de infrarrojo cercano fue registrada por Sir William Herschel^[1] en el año 1800 cuando realizaba mediciones de la energía solar más allá de la fracción roja del espectro visible, por lo cual a la zona del espectro electromagnético comprendida entre 780 y 1100 nm se le denominó infrarrojo de Herschel.

Abney y Festing en 1881 determinaron fotográficamente el espectro en el infrarrojo cercano (NIR por sus siglas en inglés) de varios líquidos orgánicos en el intervalo de 1000 -1200 nm, demostrando la importancia que representan los enlaces de hidrógeno en la absorción de energía en la región del infrarrojo cercano. Coblentz^[2] en 1903 construyó un espectrómetro usando un prisma de cloruro de sodio y una termopila conectados al espejo de un galvanómetro, en 1905 publicó una serie de espectros de varios compuestos orgánicos en la región de 1000 -1500 nm de longitud de onda, los espectros presentaban bandas anchas solapadas y de poca intensidad lo que dificultaba la asignación de las bandas a grupos funcionales característicos.

La espectroscopia en el infrarrojo cercano (NIR) tuvo su origen en Europa, pero su mayor desarrollo fue en los Estados Unidos de Norteamérica, en donde la tecnología permitió en la década de 1950 la construcción de espectrofotómetros; con un detector sensible que abarcaba la región de 1000 - 2500 nm de longitud de onda. A finales de los años cincuenta, se desarrollaron las primeras

aplicaciones analíticas de dicha técnica, con la determinación de humedad en proteínas y grasas de productos agrícolas.

Los avances tecnológicos y el desarrollo de la quimometría necesarios para el tratamiento de señales complejas, han hecho posible que en las dos últimas décadas se hayan desarrollado múltiples aplicaciones en diversos campos industriales: alimenticio, bioquímico, farmacéutico, petroquímico, polímeros y textil, entre otros.

En la figura 1 se muestran los períodos tecnológicos dados en el desarrollo de esta técnica

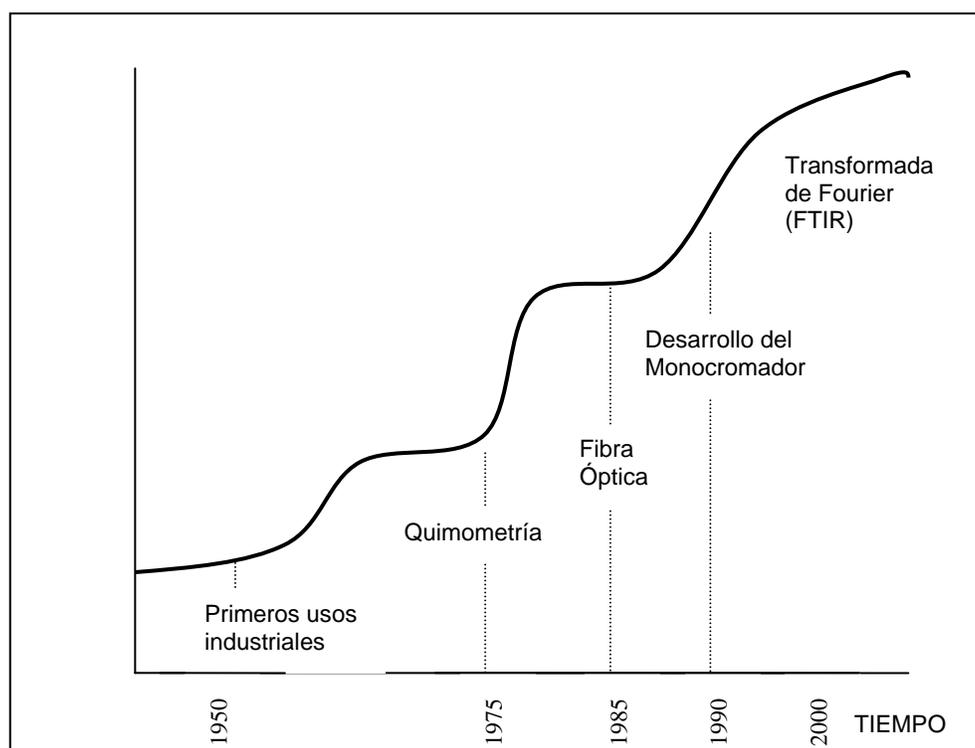


Figura 1. Periodos tecnológicos del desarrollo del NIR.

La quimometría, estudia la aplicación de las matemáticas a la química analítica. Las técnicas quimométricas en el NIR combinan la espectroscopia, la estadística y la computación para generar modelos matemáticos que relacionan la composición química (presencia de grupos químicos activos) con cambios de energía en la

región correspondiente al intervalo del infrarrojo cercano. Los avances tecnológicos y matemáticos, necesarios para el tratamiento de señales, han logrado que se desarrolle la espectroscopia en el infrarrojo cercano.

Las ventajas de la espectroscopia del infrarrojo cercano con respecto a la del infrarrojo medio o convencional son: ^[3]

- la rapidez,
- la exactitud,
- es una técnica no destructiva de la muestra,
- requiere un mínimo o ningún tratamiento de la muestra,
- no utiliza reactivos químicos ni produce residuo alguno minimizándose el daño ambiental,
- el mantenimiento del equipo es mínimo (sustitución de la lámpara al finalizar su vida útil),
- es una técnica de alta precisión que permite predecir varios factores simultáneamente,
- existen en el mercado equipos NIR portátiles que permiten analizar las muestras *in situ* por ejemplo en el campo o en invernaderos.

Cabe mencionar que en los programas de las diferentes carreras de licenciatura que se imparten en las escuelas de Química de la República Mexicana aún no se considera el estudio de esta técnica espectroscópica, pero dado a su cada vez más amplio campo de aplicación sobretodo en la Química de Alimentos, es necesario que tanto profesores, investigadores y estudiantes empiecen a conocer sus principios y múltiples aplicaciones, por lo que, para cumplir con dicho objetivo este trabajo proporciona información básica y fácil de entender que puede ayudar a la difusión de esta parte importante de la espectroscopia analítica.

2.TEORÍA DE LA ESPECTROSCOPIA DEL INFRAROJO CERCANO

2.1 Radiación electromagnética

La teoría ondulatoria dice que la radiación electromagnética, puede ser considerada como un conjunto de ondas armónicas simples, que ondulan interconectadas entre sí mediante campos eléctricos perpendiculares a la dirección de propagación y campos magnéticos con la misma frecuencia y perpendiculares al campo eléctrico, siendo éstos los que interactúan con la materia.

Un movimiento de onda armónico simple, puede ser caracterizado por la frecuencia (número de ciclos por segundo de la onda) y longitud de cada onda. La radiación electromagnética se caracteriza también por el número de onda, el cual se define como; el recíproco de la longitud de onda expresado en centímetros, que a la vez se considera como ciclos por centímetro de radiación emitida (inverso de la longitud de onda).^[1]

El espectro electromagnético está formado por diversas radiaciones con energías, frecuencias y longitudes de onda definidas, y se presenta en la figura 2.

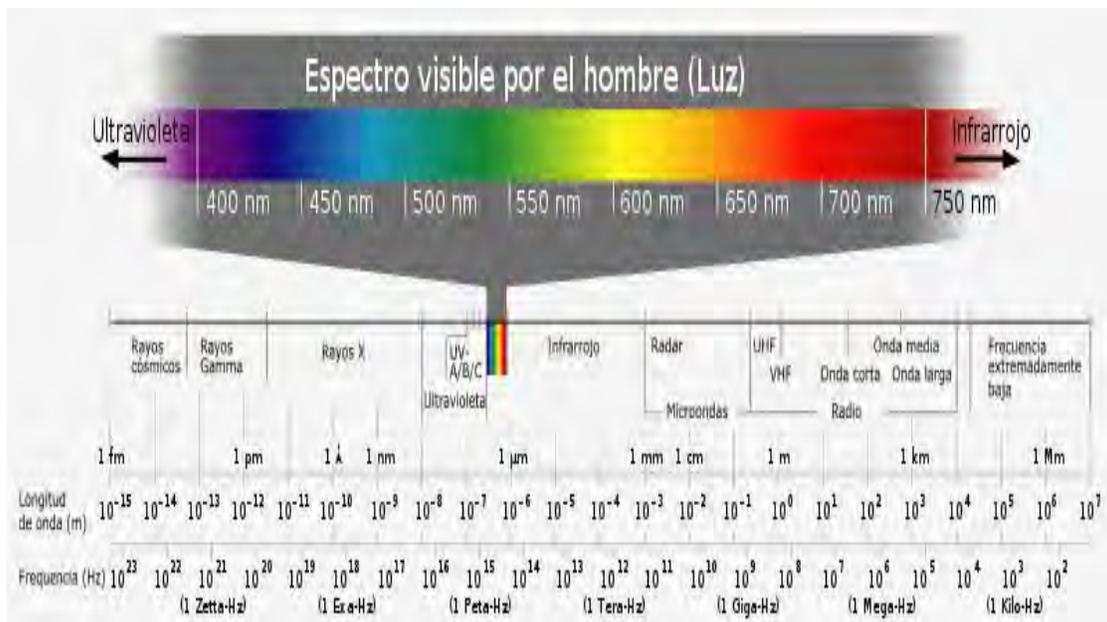


Figura 2. Espectro electromagnético.

La longitud de onda es la distancia entre dos picos, es decir entre dos crestas o dos valles consecutivos de una onda, y se indica con la letra griega λ (figura 3). La longitud de onda en el espectro del Infrarrojo cercano se mide normalmente en nanometros (nm).

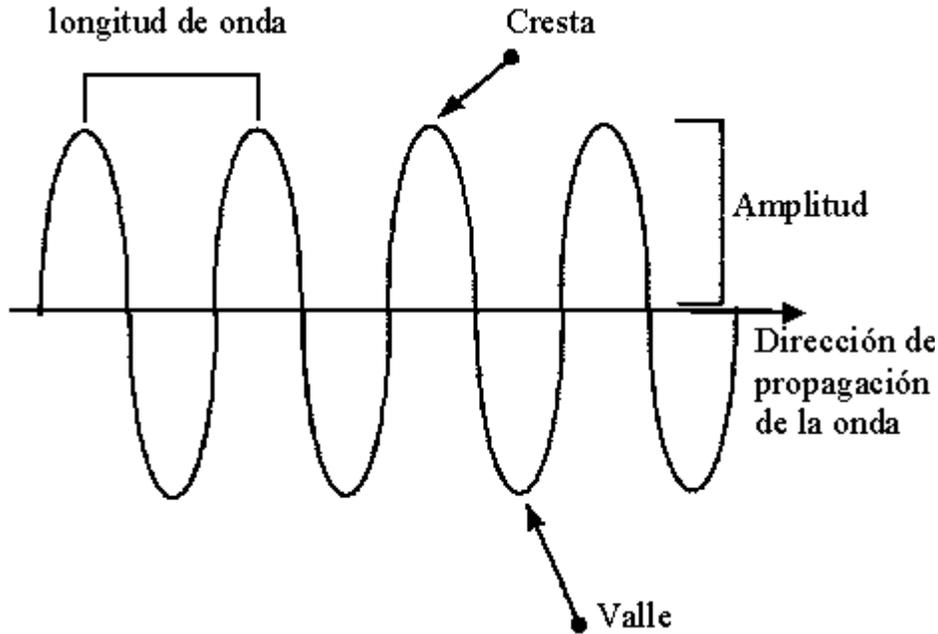


Figura 3. Características de una onda.

La región infrarroja se extiende aproximadamente desde los 780 nm (cercana a la región del espectro visible) hasta 1×10^6 nm (región de microondas), siendo subdividida en infrarrojo cercano (NIR, Near Infrared), infrarrojo medio (MIR, Middle Infrared) e infrarrojo lejano (FIR, Far Infrared). La región NIR, para Osborne está comprendida entre los 780 nm y 2500 nm^[1]. Por otra parte la región del infrarrojo cercano se puede subdividir en la NIR de longitud de onda corta (short-wave-NIR por sus siglas en inglés) ubicada entre 760 y 1100 nm también se le conoce como una región de transición entre el visible y el infrarrojo cercano, y el NIR de longitud de onda larga de 1100 a 2500 nm.^[4, 5]

2.2 Absorción del NIR por las moléculas

Para absorber radiación infrarroja una molécula debe experimentar un cambio en el momento dipolar de sus uniones químicas, como consecuencia de su movimiento de vibración o de rotación. Después de la interacción de la radiación con la materia, los enlaces covalentes por su acción vibratoria de extensión y de desdoblamiento, absorben selectivamente la radiación infrarroja de acuerdo a la frecuencia vibratoria específica de las moléculas, es decir, ocurre un acoplamiento de iguales frecuencias produciendo cambios en el estado energético de éstas, el registro de estos cambios proporcionan información de los grupos funcionales presentes.^[6]

Las uniones específicas entre los átomos vibran a una cierta frecuencia, y cada tipo de estas uniones químicas dentro de una muestra absorberán radiación del infrarrojo cercano de una longitud de onda específica, mientras todas las demás longitudes de onda son reflejadas (figura 4).

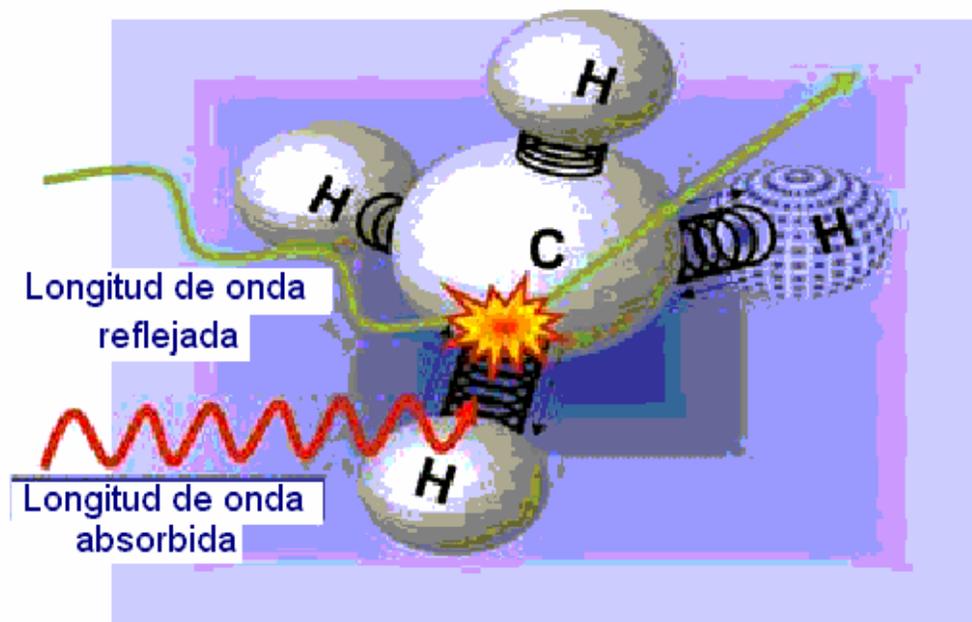


Figura 4. Vibración entre los enlaces de carbono e hidrógeno, donde absorbe ondas de NIR de una longitud de onda particular y refleja el resto de las ondas.

En el infrarrojo cercano, las muestras tienen una baja absorción comparado con otras regiones del infrarrojo. Las reacciones vibratorias moleculares ocurridas en

el infrarrojo cercano, corresponden principalmente a moléculas asociadas al átomo de hidrógeno, como pueden ser uniones C–H, O–H, N–H y S–H.^[2] Todos los enlaces de origen orgánico presentan bandas de absorción en la región del infrarrojo cercano, mientras que los minerales pueden sólo ser detectados en complejos orgánicos o quelados, e indirectamente por su efecto sobre enlaces de hidrógeno.^[1]

En la siguiente tabla se definen los efectos de la incidencia de la radiación infrarroja con la materia:

REGIÓN	TRANSICIÓN CARACTERÍSTICA	LONGITUD DE ONDA (nm)	NÚMERO DE ONDA (cm^{-1})
Infrarrojo cercano (NIR)	Sobretonos y combinación	700-2500	14300 – 4000
Infrarrojo medio (MIR)	Vibraciones fundamentales	2500 – 5×10^4	4000 – 200
Infrarrojo lejano (FIR)	Rotaciones moleculares	$5 \times 10^4 - 10^6$	200 – 10

Tabla 1. Efectos de la incidencia de la radiación infrarroja con la materia^[1].

2.3 Espectroscopia vibracional en el infrarrojo cercano

Para cada molécula existen niveles de energía vibracional y cuando la radiación infrarroja incide sobre la materia se producen transiciones entre estos niveles.

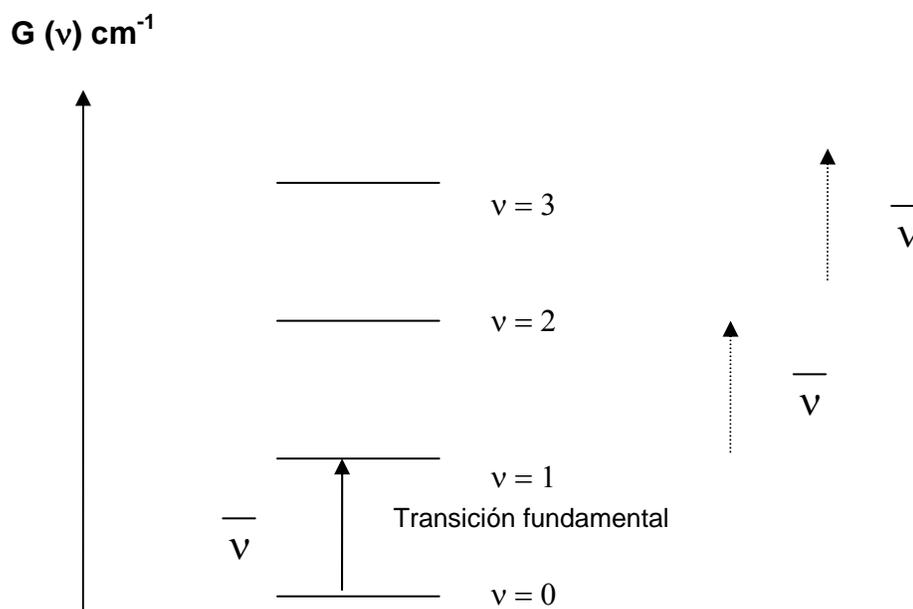


Figura 5. Niveles de energía vibracional.

Dos leyes básicas explican la espectroscopia vibracional: La ley de Hooke y el Principio de Franck Codon^[7].

La ley de Hooke, describe la relación entre la frecuencia (ν) de vibración y un simple oscilador armónico de dos cuerpos cuyas masas sean m_1 y m_2 :

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k (m_1 m_2)}{(m_1 + m_2)}} \dots (i)$$

Cuando dos átomos se acercan surge una repulsión entre los dos núcleos que actúa en la misma dirección que la fuerza del enlace (k), por lo que la energía potencial aumenta rápidamente que lo que predice el modelo armónico. Las curvas que describen la evolución de la energía vibracional tienen una forma no armónica. Las curvas armónicas y no armónicas son casi iguales a energías bajas, por lo que las moléculas sólo se comportan armónicamente cerca de la posición de equilibrio.

Cuando la energía cinética de una unión química vibrando es muy grande se puede decir que ese átomo absorberá la radiación infrarroja al mismo tiempo, pero cuando la energía cinética de las uniones químicas vibrando es pequeña la transición para pasar del nivel vibracional cero al nivel vibracional uno puede ocurrir antes de que todos los átomos que forman la unión química lleguen a su estado basal, esto provoca la no armonicidad de los niveles cuánticos vibracionales. Cuando una unión química vibrando a una cierta frecuencia absorbe radiación infrarroja pasa al primer nivel cuántico vibracional, y un número escaso de moléculas pueden sufrir transiciones para pasar a un segundo o tercer nivel cuántico vibracional provocando los llamados sobretonos.

Las características de vibración de una molécula biatómica se pueden aproximar al oscilador armónico simple. Sin embargo, resulta incompleto para describir las vibraciones entre otras uniones químicas.

En el modelo no armónico los niveles energéticos no están igualmente espaciados (figura 6), a niveles de energía más altos, la energía entre niveles consecutivos es menor. Las transiciones energéticas cambian permitiéndose así $v = +2, +3, \dots$, por lo que además de observar la banda fundamental $v = +1$ pueden observarse los sobretonos.

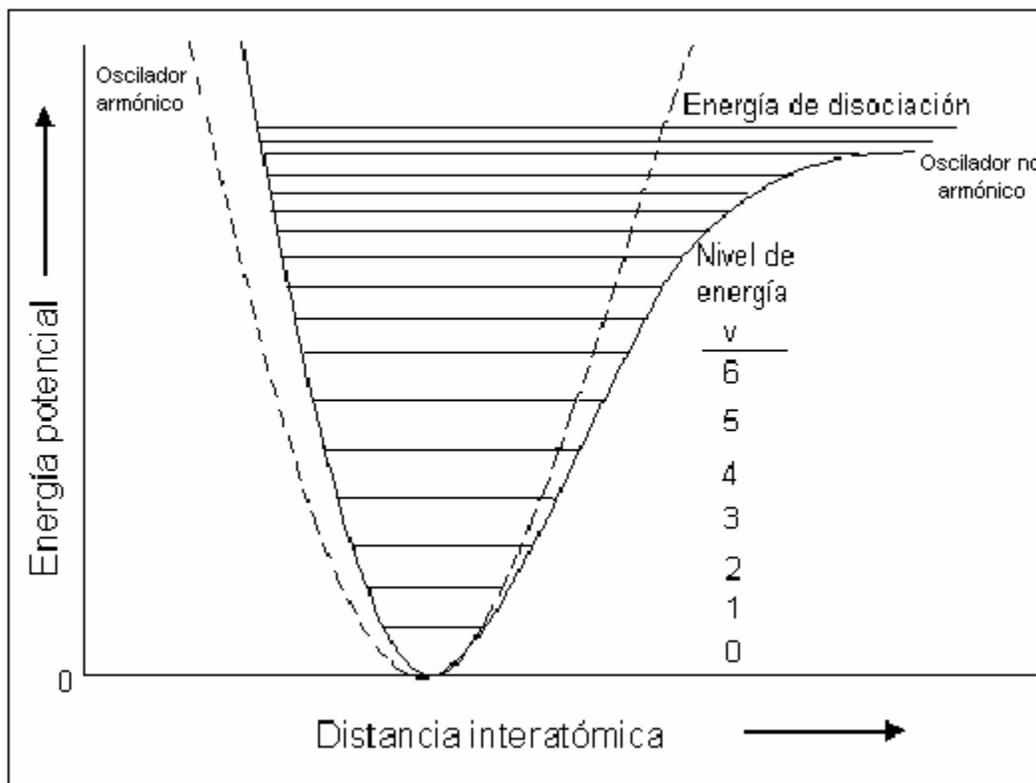


Figura 6. Diagrama de energía potencial para un Oscilador no armónico.

El principio de Franck Codon, dice que la probabilidad de encontrar un átomo en cierto punto dentro de una molécula vibrando, es inversamente proporcional a la velocidad con que vibra el átomo en ese punto. Por consiguiente, los átomos consumen más de su tiempo en la interacción con la energía cinética baja, donde la energía potencial es muy cercana a la energía total. Las transiciones tienden a ocurrir entre los niveles vibracionales en el cual las configuraciones nucleares son las mismas en ambos estados y surgen cuando las energías cinéticas nucleares son pequeñas.

Cuando debido al fenómeno de Franck Codon dos uniones químicas diferentes son excitadas a su primer o segundo nivel cuántico vibracional y coinciden entre si vibrando a la misma frecuencia se llaman bandas de combinación. El número de bandas vibracionales de combinación a observar, dependerá del principio de Franck Codon y de la magnitud del solapamiento entre las funciones de onda vibracionales de los estados vibracionales fundamental y excitado.

Un espectro de la región infrarroja media se caracteriza por bandas de absorción fundamentales de las moléculas (transición del nivel vibracional 0 al 1); y se definen como las regiones del espectro donde se plasma una absorción de radiación, en la cual su frecuencia o número de ondas, corresponde al punto más elevado de la máxima registrada. Esta banda de absorción de una molécula suele ser muy intensa.^[4]

Una molécula absorberá radiación NIR si la energía de la radiación corresponde a la diferencia energética entre más de un nivel cuántico vibracional y se da un cambio en su momento dipolar, en esta zona aparecen bandas conocidas como sobretonos, en donde las transiciones energéticas de $\nu > 1$; estos sobretonos aparecen a frecuencias ligeramente menores a los múltiplos de las frecuencias

fundamentales, lo cual se debe al diferente espaciado entre los niveles energéticos. El primer sobretono $\nu = 2$ es de mayor intensidad que los siguientes.

Como ya se mencionó, además de estos sobretonos también se pueden observar bandas de combinación debidas a la interacción entre las diferentes frecuencias fundamentales de vibración de moléculas poliatómicas. Las transiciones no fundamentales son menos probables, por eso las bandas en el NIR son anchas, menos definidas y de menor intensidad que las del infrarrojo medio (MIR por sus siglas en inglés).

El espectro NIR no sólo contiene información química relacionada con la composición de la muestra, sino que también contiene información que puede ser utilizada para determinar algunas propiedades físicas de las muestras.

Una característica de la zona del infrarrojo cercano es que las interacciones entre moléculas, como puentes de hidrógeno afectan de manera significativa al espectro, gracias a eso se puede llegar a obtener información sobre la estructura cristalina de las sustancias.

Los puentes de hidrógeno se generan debido a la tendencia del hidrógeno a formar enlaces débiles con átomos dadores de electrones, especialmente oxígeno y nitrógeno. La formación de enlaces débiles afecta a todas las vibraciones asociadas a ese hidrógeno y su compañero donador de electrones. Esto se traduce en desplazamientos de bandas (hacia mayores y menores longitudes de onda) que se observan habitualmente como ensanchamiento de los picos.

En la siguiente tabla se presentan algunos sobretonos característicos de bandas fundamentales:

INFRARROJO CERCANO						
	LONGITUD DE ONDA DE LOS SOBRETONOS λ (nm)					
ESTRUCTURA	PRIMERO	SEGUNDO	TERCERO			
CH ₃ asim	1717-1728	1156-1164	~879			
CH ₂ asim	1738-1750	1170-1178	~890			
CH ₃ sim	1770-1783	1192-1200	~907			
CH ₂ sim	1782-1795	1200-1209	~913			
CH	1759-1772	1185-1193	~901			
RCH=CH ₂ HC=CH C=CH	1678-1695	1130-1142	~861			
RCH=CH ₂ C=CH				1648-1659	1110-1118	~844
\equiv C-H						
CH aromático	~1684	~1134	~859			
H ₂ O	~1458	~980	~744			
ROH libre	1398-1421	~949				
ROH intramolecular	1437-1479	~982				
ROH intermolecular	1500-1594	~1041				
RNH ₂ asim	1501-1509	~1014				
RNH ₂ sim	1525-1535	~1031				
ArNH ₂	1494-1509	~1011				
NH	1518-1541	~1030				
CONH ₂ asim libre	~1449	~976				
CONH ₂ sim libre	~1496	~1007				
CONH ₂ intramolecular	~1522	~1025				
CONH ₂ intermolecular	~1604	~1080				
CONHR libre	1485-1503	1000-1012				
CONHR (H-)	1537-1560	1035-1050				
CONHR (H-)	1604-1625	1080-1094				
CONHR (H-)	1645-1662	1108-1119				

Tabla 2. Bandas características de absorción en el infrarrojo cercano.

2.4 Tipos de vibraciones

- Tensión

Producen un cambio en la distancia entre los átomos sin abandonar el eje de enlace.

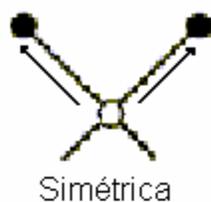
- a) Simétrica
- b) Asimétrica

- Doblamiento o flexión

Producen un cambio en el ángulo de dos enlaces

- a) Oscilación en el plano o balanceo
- b) Tijera
- c) Aleteo fuera del plano o cabeceo
- d) Torsión fuera del plano o trenzado

Vibraciones de tensión



Vibraciones de flexión

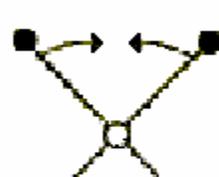
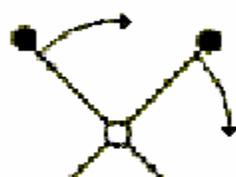


Figura 7. Tipos de vibraciones en una molécula.

2.5 Reflectancia y Transmitancia en el infrarrojo cercano

Cuando la radiación incidente (I_0) interactúa con una muestra, ésta puede ser absorbida (I_a), transmitida (I_t) o reflejada (I_r), en donde, según la ley de conservación de la energía, la radiación total incidente debe ser igual a la sumatoria de los distintos caminos que pueda seguir la radiación. Ésta se representa en la ecuación A:

$$I_0 = I_a + I_t + I_r \dots (ii)$$

La radiación total reflejada por una muestra es la suma de la reflexión especular más la reflexión difusa.^[1] La incidencia de la reflexión especular en la zona del infrarrojo cercano sobre las moléculas no aporta información. La reflexión difusa representa la dispersión de las ondas, y ocurre cuando la energía es transmitida momentáneamente y a la vez absorbida de manera parcial a través de una muestra. La dispersión sufrida por las ondas se encuentra sujeta a las propiedades físicas de la superficie sometida, es decir, la composición física de la muestra. Las más importantes son; el tamaño de partículas, contenido de humedad y temperatura de la misma.^[3] La composición heterogénea de una muestra y las características físicas, son la causa de una mayor distorsión en la dispersión de la luz, siendo las principales fuentes de error de la técnica la cual se expresa en el solapamiento de las bandas espectrales correspondientes a la materia analizada.

La muestra al ser analizada es bombardeada con haces NIR de diferentes longitudes de onda como se ilustra en la figura 8. Por cada longitud de onda, algunos rayos serán absorbidos por uniones químicas específicas. Al mismo tiempo, otros rayos serán diseminados y reflejados por otras uniones químicas. Este proceso es comúnmente descrito como reflectancia NIR. En contraste, algunos de los rayos pasarán a través de la muestra, lo cual es denominado NIR de transmisión.

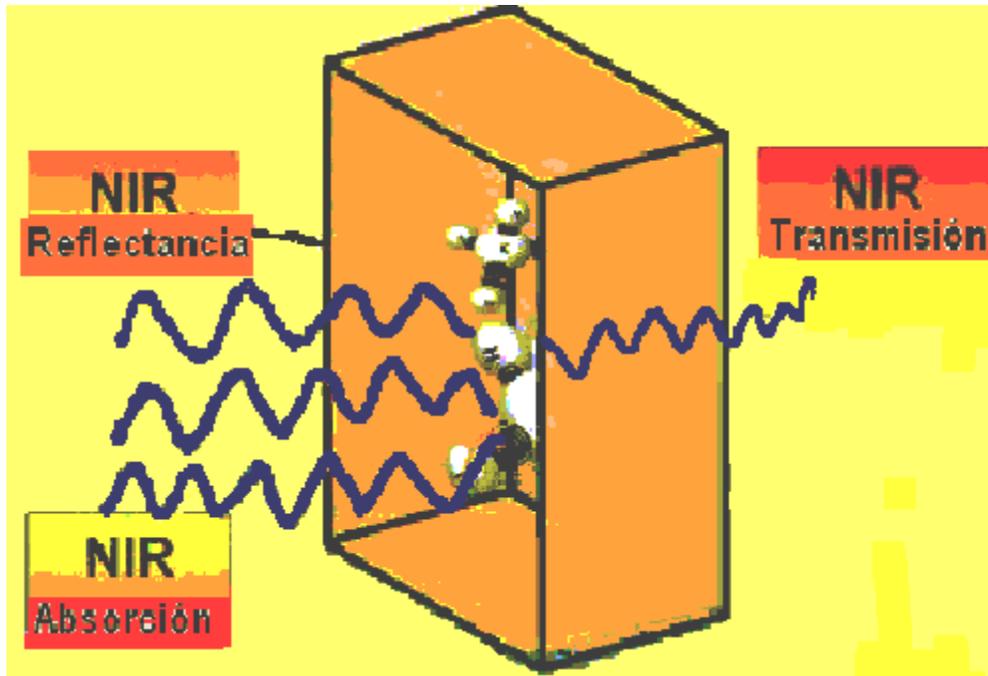


Figura 8. En NIR algunos rayos son absorbidos, algunos enlaces los reflejan y otros los transmiten.

Existe a menudo una mala interpretación del término reflectancia, los haces no son simplemente reflejados de la superficie externa, sino que realmente penetran la muestra. Cada vez que se halla que una unión química no absorbe una particular longitud de onda, los haces son diseminados y reflejados en todas direcciones. Estos haces dispersos pueden ser absorbidos o reflejados por otras uniones químicas, hasta que una porción de los haces eventualmente salgan de la muestra en todas direcciones. Existen dos tipos de reflectancia: especular, la cual no aporta información sobre la composición de la muestra en el infrarrojo cercano y difusa que tiene lugar en todas direcciones como consecuencia de los procesos de absorción y dispersión (figura 9).

Actualmente, los equipos NIR permiten trabajar en la forma de transreflectancia^[8], en la cual parte de la radiación incidente es reflejada y otra parte atraviesa la muestra para, posteriormente, ser reflejada por un material colocado en la cara opuesta de la muestra.

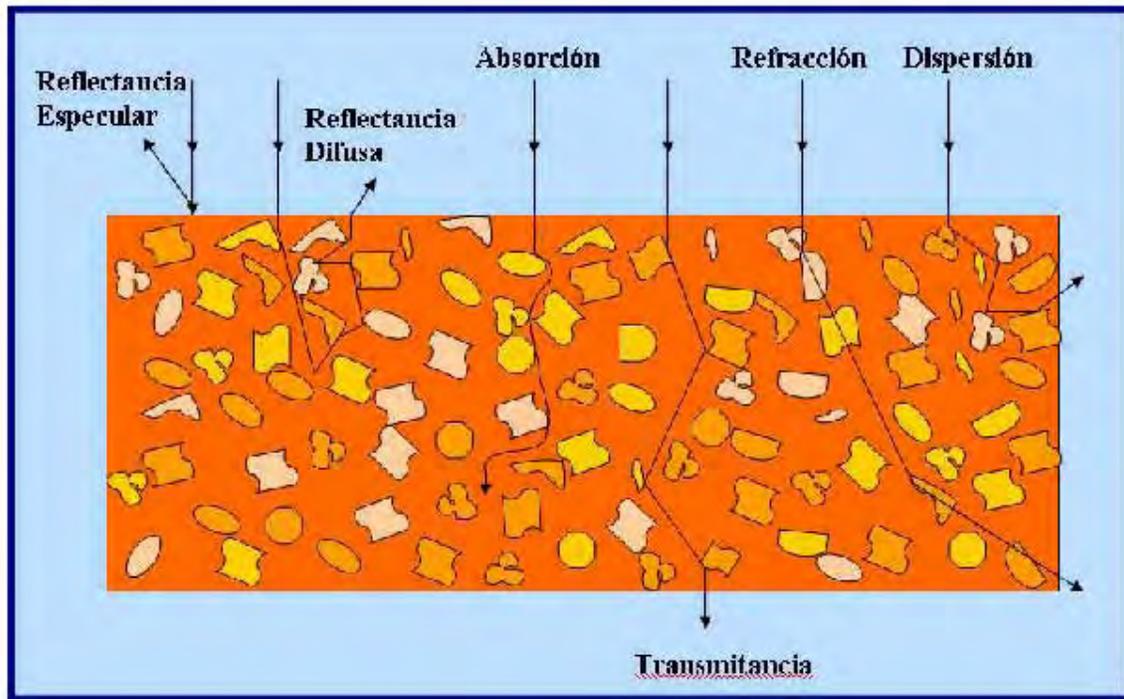


Figura 9. Interacción de la radiación infrarroja cercana con las partículas sólidas de una muestra.

La Transmisión NIR, donde el detector está ubicado detrás de la muestra, es ideal para líquidos transparentes y algunos productos que no son demasiado densos (figura 10). La profundidad de penetración del haz dentro de la muestra no está determinada por la posición del detector, sino por la potencia de la fuente de radiación y del ángulo de incidencia de la radiación.

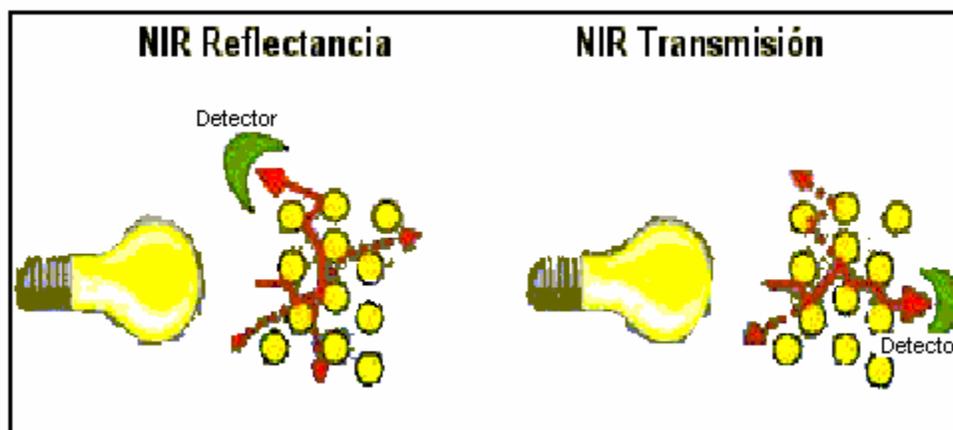


Figura 10. La penetración de radiación infrarrojo cercano cuando hay reflectancia y transmisión.

2.6 Ley de Lambert y Beer

Esta ley predice, que para una longitud de onda (λ) constante y paso óptico fijo, existe una relación lineal entre la Absorbancia (A) y la concentración (c), cuya pendiente es el coeficiente de absorción molar (ϵ) y b ordenada al origen. Sin embargo, dicha ley esta limitada para soluciones diluidas, de concentraciones menores o iguales a 0.01M generalmente, ya que ϵ no es constante para soluciones concentradas sino que depende del índice de refracción de la solución.

El coeficiente de absorción molar para una longitud de onda dada, ϵ_{λ} , es característica de cada sustancia y depende de la longitud de onda o la frecuencia de la radiación. Así la forma más conocida de la Ley de Lambert-Beer para una sustancia absorbente es:

$$A = \epsilon_{\lambda} b c \dots (iii)$$

De acuerdo a la ley de Lambert-Beer, la radiación absorbida por una muestra es directamente proporcional a la absorbancia (A) de ésta al momento que ocurre la transmisión (T) de energía, estableciendo que la concentración de los enlaces moleculares es lineal al $\log 1/T$ (ecuación iv). Dicha relación, es fundamental para cuantificar la absorción y puede además ser aplicada en mediciones de reflectancia (R) para aquellos materiales que dispersan luz. La interpretación de la ley de Lambert-Beer para utilizarse en reflexión difusa se expresa en la ecuación (v) ^[4]

$$A = \log 1/T = \log I_t / I_o \dots (iv)$$

$$A = \log 1/R = \log I_r / I_o \dots (v)$$

En la ecuación (v) se presenta la relación que permite aplicar la ley de Lambert-Beer para reflectancia, esta ley manifiesta que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de la especie absorbente (c) y a la longitud de trayecto (b) del medio de absorción, resultando la ecuación (vi)

$$A = \log I_0 / I = a b c \dots (vi)$$

donde (a) es la constante de proporcionalidad llamada coeficiente de absorción; cuando se expresa la concentración (c) en mol por litro, y (b) en centímetros, la constante de proporcionalidad se llama coeficiente de absorción molar y recibe el símbolo de ϵ , teniendo como unidades $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Así que (vi) se expresa como:

$$A = \epsilon b c \dots (vii)$$

La función que relaciona la absorbancia (A), logaritmo de absorbancia ($\log A$), porcentaje de transmitancia (%T), o coeficiente de absorción molar (ϵ) de un analito con la longitud de onda (λ) o la frecuencia (ν) de la radiación es llamado espectro de absorción de un compuesto. Como el coeficiente de absorción puede cambiar en varios órdenes de magnitud en el espectro de absorción para un único compuesto inorgánico u orgánico se utilizan gráficos de $\log \epsilon$ contra A (Absorbancia), para representar el espectro de absorción de las sustancias y poder compararlos con diferentes concentraciones.

Cuando se analizan muestras sólidas por transmisión no puede asumirse directamente que cualquier sistema siga la Ley de Lambert-Beer, ya que por efecto de la dispersión parte de la radiación puede sufrir reflectancia difusa y en este caso $\log 1/T$ no representa la atenuación de la radiación por absorción. Desde un punto de vista práctico, para realizar análisis mediante medidas de transmisión se procede del mismo modo que en reflectancia, es decir utilizando una A aparente. La instrumentación utilizada en este tipo de medidas está diseñada para minimizar los efectos de la dispersión de la radiación y, por tanto, la señal analítica depende fundamentalmente de la absorbancia de la muestra.

El análisis (NIR) de sólidos por transmisión presenta como principales ventajas respecto a medidas por reflectancia, una mayor sensibilidad y homogeneidad espectral, debido a que, para registrar el espectro se utiliza una porción mayor de muestra, pero tiene como principal inconveniente que componentes muy sensibles a la radiación (termosensibles), pueden ser afectados por la gran cantidad de energía que atraviesa la muestra.

Una variación de esta metodología son las medidas por transflectancia, en este caso se mide la transmitancia después que la radiación haya atravesado dos veces la muestra, la primera es el camino de la radiación para llegar a un reflector colocado al lado de la muestra y la segunda una vez reflejado pasa por la misma muestra antes de llegar al detector.

2.7 Ley de Aditividad

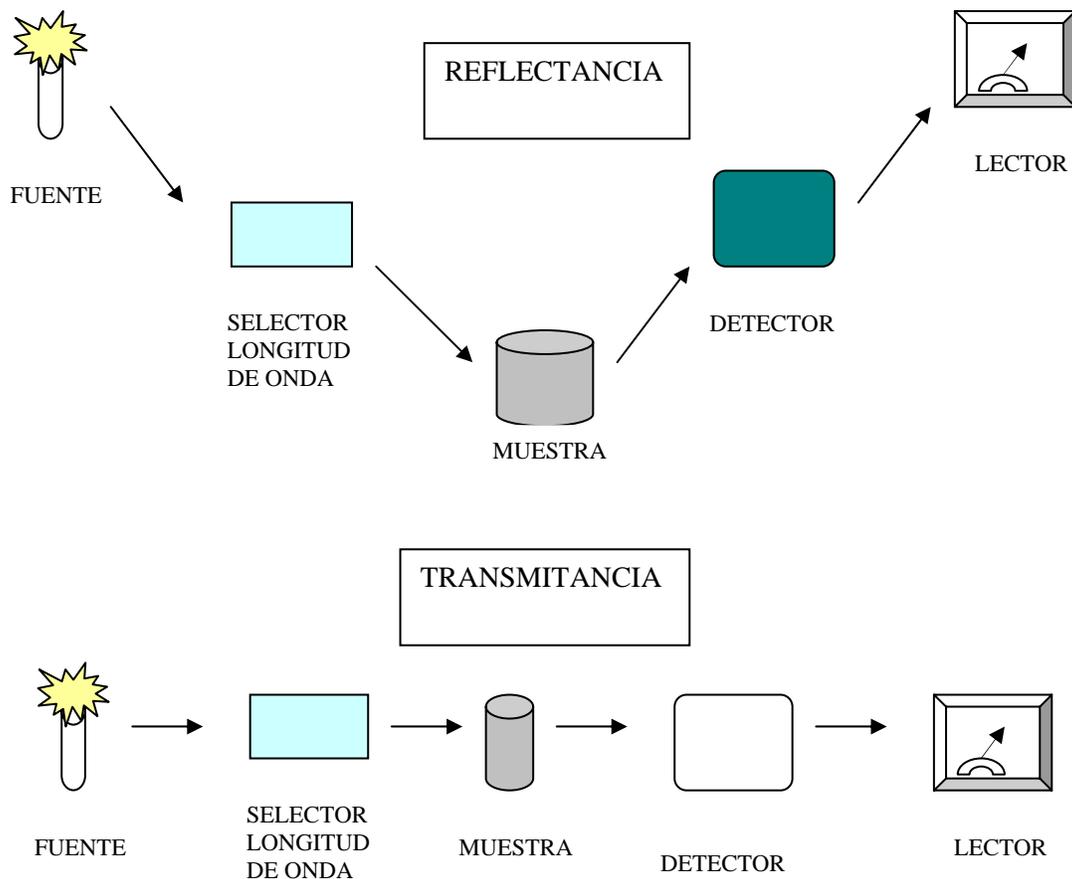
Si varias especies químicas absorben radiación a longitudes de onda muy cercanas o iguales y no hay interacción química de las diversas especies, también se aplica la ley de Lambert-Beer en donde la absorbancia total de un sistema de componentes múltiples es la suma de las absorbancias individuales; se conoce como aditividad de las absorbancias:

$$A_{\text{total}} = A_1 + A_2 + \dots + A_n \dots (viii)$$
$$A_{\text{total}} = \varepsilon_1 bc_1 + \varepsilon_2 bc_2 + \dots + \varepsilon_n bc_n \dots (ix)$$

donde los subíndices se refieren a los componentes absorbente 1,2, 3, 4, , n. Cuando se desea analizar en una sola muestra varios compuestos, que por lo general sucede en las muestras de alimentos es necesario de la quimometría para resolver todas estas ecuaciones resultantes.

2.8 Instrumentación en el infrarrojo cercano

Existen diferentes modelos de equipos, los primeros diseños estaban formados esencialmente por: una fuente que irradia energía, por un discriminador de longitudes de onda (monocromador), un medio para exponer la muestra a la radiación, que pueden ser celdas de reflectancia o de transmitancia, un detector que convierte la energía irradiada a una señal eléctrica y un procesador de la señal y el registrador. ^[1] Actualmente en el intervalo espectral del infrarrojo cercano se realizan medidas de reflectancia, transmitancia o transflectancia, la diferencia básica entre los tres tipos de medidas es la posición de la muestra en el instrumento^[8] como se observa en la figura 11.



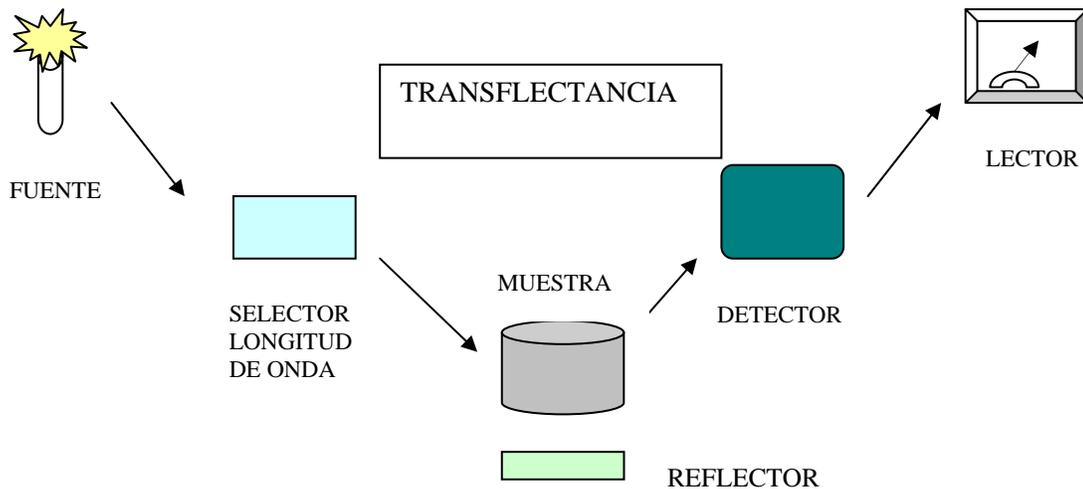


Figura 11. Diseños instrumentales en espectroscopia del infrarrojo cercano
a: reflectancia b: transmitancia c: transflectancia.

Actualmente los equipos más difundidos son los llamados de Transformada de Fourier (FTIR por sus siglas en inglés) los cuales trabajan con fuentes de radiación que abarcan toda la región del infrarrojo, estos instrumentos están basados en el principio del interferómetro de Michelson (figura 12) en el cual la radiación incide primero a un cristal de bromuro de potasio recubierto de germanio que tiene la particularidad de separar el haz de radiación en dos partes iguales, uno es reflejado y el otro es transmitido. Estos dos haces de radiación interfieren en el divisor en su viaje de vuelta, cuando son reflejados sobre otros dos espejos, uno dispuesto frente a la trayectoria del haz original (espejo móvil) y el otro perpendicular (espejo fijo). Los haces de estas trayectorias salen hacia la muestra y a continuación al detector IR.

La intensidad resultante de la superposición de los dos haces es medida como función del desfase (s) del espejo móvil en su desplazamiento respecto a la posición intermedia. El gráfico resultante (intensidad contra desfase) se denomina interferograma.

La transformada de Fourier es una operación matemática que se aplica a los interferogramas, que consiste en la sumatoria de senos y cosenos de las distintas frecuencias ópticas que componen la radiación transmitida o reflejada según el caso para ser convertidas en bandas de absorción.

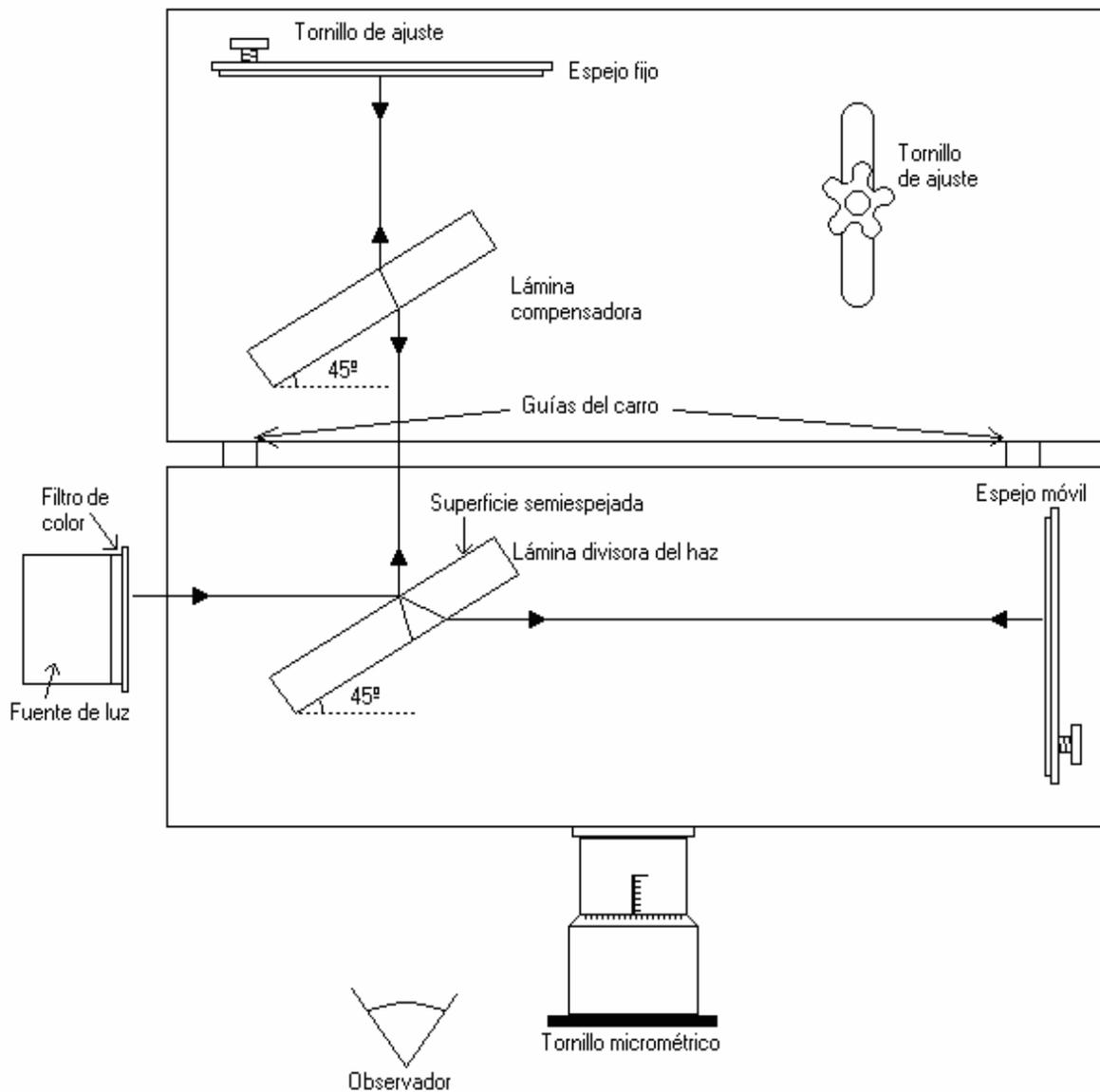


Figura 12. Esquema de un interferómetro de Michelson.

El FTIR utilizan como detectores cristales piroeléctricos de sulfato de triglicina deuterada (DTGS por sus siglas en inglés), los que permiten trabajar a altas frecuencias de modulación (del intervalo de KHz) producidas en el barrido rápido de espectros; o detectores fotoconductores de telurio de mercurio y cadmio (MCT por sus siglas en inglés), que son sensibles a frecuencias de modulación hasta de 20KHz.

En un espectrofotómetro IR con transformada de Fourier, la muestra se coloca entre el interferómetro y el detector. La muestra absorbe ciertas frecuencias de la radiación y por tanto el interferograma de la muestra corresponde a la energía emitida por la fuente menos la transmitida o reflejada por la muestra. En la práctica primero se registra el interferograma de la referencia constituida por la celda y el blanco para transformarlo en el espectro; luego se registra el interferograma de la muestra en la misma celda y se transforma en espectro. El cociente que resulta de dividir el segundo espectro entre el primero corresponde al espectro de la muestra.

Las ventajas de este método de FTIR son que al utilizar una energía que fluye constantemente mejora la sensibilidad y mejora la relación señal/ruido por promedio de los interferogramas.^[9]

Un equipo moderno de NIR se clasifica de diversas formas; según el mecanismo de manejo de muestra puede ser de: fibra óptica, celdas rotatorias para muestras molidas, cubetas para materiales voluminosos y contenedores para líquidos, y en base al intervalo de longitud de onda que emitan en: infrarrojo cercano (NIR por sus siglas en inglés), onda corta NIR (SWNIR por sus siglas en inglés) e infrarrojo medio (MIR por sus siglas en inglés).

La manera de presentar una muestra para la obtención de su espectro, es mediante dispositivos especialmente diseñados para equipos NIRS. Los más utilizados en reflectancia cuentan con el siguiente diseño; una cubierta circular de cuarzo, diámetro de 3.5 cm, montada en un cilindro plástico o de aluminio (color

negro) de un centímetro de profundidad. Éstas pueden ser utilizadas en el análisis de materiales finamente molidos o con algún grado de preparación. Otros modelos de recipientes, permiten trabajar indistintamente en el modo de reflectancia o transmitancia y con muestras intactas para lo cual deben poseer una doble ventana de cuarzo, entre las cuales se deposita la muestra, permitiendo así el paso de la radiación para el caso de transmitancia.^[4]

2.9 Calibración de los equipos en NIR

En el espectrofotómetro NIR el equipo se calibra ajustando lecturas a un valor estándar de acuerdo a las muestras y al trabajo específico a que pretenda ser destinado, procurando que una sola calibración sea factible utilizarla para diversos productos.

El proceso de calibración establece la relación entre la respuesta instrumental y la propiedad del analito a determinar, utilizándose un conjunto de muestras estándares, que pueden ser un sólo compuesto o matrices complejas, las cuales se analizan por métodos analíticos tradicionales, para determinar la composición real de las muestras. Cada una de estas muestras es colocada en el instrumento NIR, y se obtienen los valores de reflectancia o transmitancia de las diferentes longitudes de onda. Con la ayuda de una computadora y un programa quimométrico, los valores de longitud de onda de absorción son transformados a las constantes de calibración, las que se emplean en el reconocimiento y resolución de espectros del analito problema.^[10] Para desarrollar una nueva calibración, es necesario tener un grupo ideal de muestras el cual debe incluir las variaciones de los componentes analíticos y naturales que puedan presentarse.

2 10 Quimometría

La Quimometría se ha utilizado en la resolución de problemas que aparecen en el desarrollo de métodos de análisis mediante la espectroscopia NIR, de las cuales las aplicaciones más comunes son:

- Filtrado de señales: los espectros NIR pueden incorporar información no relevante. La aplicación de determinados métodos quimométricos permiten mejorar la calidad de la señal instrumental, eliminando o reduciendo el ruido y restando del espectro señales no deseables.
- Métodos de reconocimiento de pautas o perfiles de absorción: debido a las características del espectro NIR, no puede utilizarse directamente para identificación visual de compuestos o grupos funcionales. En el análisis cualitativo los métodos de reconocimiento de patrones tipo, permiten establecer relaciones entre muestras para agruparlas según la similitud de sus espectros de una forma objetiva.
- Métodos de calibración multivariable: de la misma forma, para los análisis cuantitativos los espectros NIR requieren de métodos de calibración multivariable que hagan posible relacionar la señal analítica con la propiedad a determinar. Estos métodos son muy diversos, todos están basados en la ley de aditividad, incluyendo además de los datos espectroscópicos de cada muestra (longitudes de onda de absorción), parámetros que pueden anular o disminuir fuentes de variabilidad de la señal, como por ejemplo, información repetida sobre enlaces específicos en bandas de combinación y en regiones del segundo y tercer sobretono, humedad de la muestra, tamaño de partícula, variaciones en el paso óptico efectivo entre otras, corrección de la desviación de la línea base y de la dispersión causada.^[11]

En general, los Métodos de Calibración Multivariable. pueden clasificarse de la siguiente forma:

- ❖ Univariables-multivariables: en función del número de variables de la respuesta.
- ❖ Lineales-no lineales: según la función que relaciona las variables.
- ❖ Directo-indirecto: si los parámetros de la calibración se calculan a partir de la señal de los componentes puros o a partir de mezclas.
- ❖ Clásica-inversa: en función de la variable independiente utilizada (concentración o señal analítica respectivamente).
- ❖ Espectro completo-selección de variables: según el número de variables utilizadas.

Existe una gran variedad de estos métodos, la elección del más adecuado depende del tipo de muestra a analizar, el conocimiento del sistema y de los datos disponibles.

Las técnicas de regresión lineal más utilizadas para desarrollar calibraciones en el NIR son; regresión múltiple, regresión múltiple paso a paso, componentes principales (PCR por sus siglas en inglés), cuadrados mínimos parciales (PLS por sus siglas en inglés) y el método de regresión de los cuadrados mínimos parciales modificados (MPLS por sus siglas en inglés). Los mejores resultados han sido obtenidos con las técnicas PCR, PLS y MPLS, de las cuales se señala a MPLS como el método más estable y exacto que se encuentra disponible.

El objetivo final de todo proceso de calibración en el infrarrojo cercano es el desarrollo de un método de trabajo de rutina que permita predecir valores de parámetros analíticos, sin necesidad de analizar las muestras por métodos tradicionales. Una vez obtenida la ecuación sólo es necesario escanear la muestra y a partir de la información espectral generada, el equipo predecirá todos los parámetros de manera simultánea para los cuales se haya calibrado en aproximadamente un minuto.

2.11 Interpretación de espectros

Como ya se mencionó en el espectro del infrarrojo cercano predominan las bandas debidas a sobretonos y combinaciones de enlace en los que participa el hidrógeno, en la figura 13 y en la tabla 3 se muestran las absorciones más habituales:

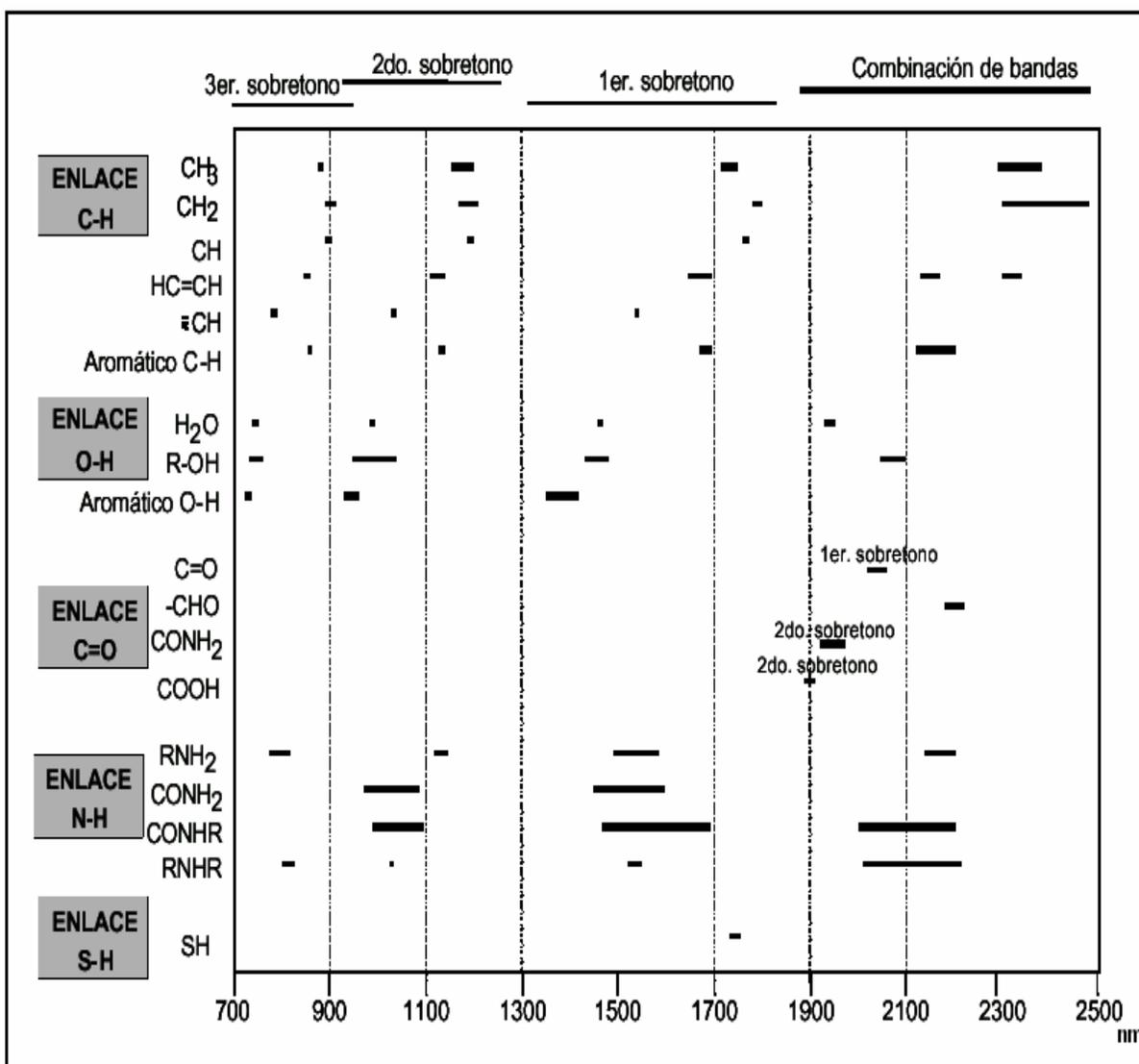


Figura 13. Tabla de asignación de bandas en la región del infrarrojo cercano.

BANDAS DE ABSORCIÓN DE ENLACES QUÍMICOS EN LA REGIÓN NIR	
Longitud de onda (nm)	Constituyente o enlace asignado
1152	CH ₃ C
1170	HC=CH C
1200	Lípidos, CH ₂ C
1440	Agua, almidón, sacarosa O
1730	Lípidos C
1780	Lípidos, celulosa C
1940	Agua O
1980	Proteínas N
2080	Almidón, sacarosa O
2180	Proteína, CH ₂ C=O, N
2320	Lípidos C
2350	Lípidos, celulosa C

Tabla 3. Bandas de absorción características para el NIR.

En el Infrarrojo cercano las bandas de absorción no están tan bien definidas como en el infrarrojo medio, apareciendo en forma de bandas anchas y solapadas entre sí, por lo que es más difícil realizar una asignación a un componente o grupo funcional de una muestra.

Las bandas en el NIR tienen una menor intensidad (la absorptividad es menor), por lo que se debe trabajar con caminos ópticos más largos, de 0.5 a 10 mm con respecto a los utilizados en el infrarrojo medio de 10 a 50 μm y utilizar mayor cantidad de muestra.

Como un ejemplo de las diferencias que presentan los espectros en MIR y NIR, en la siguiente figura se muestran los espectros del ciclohexano.

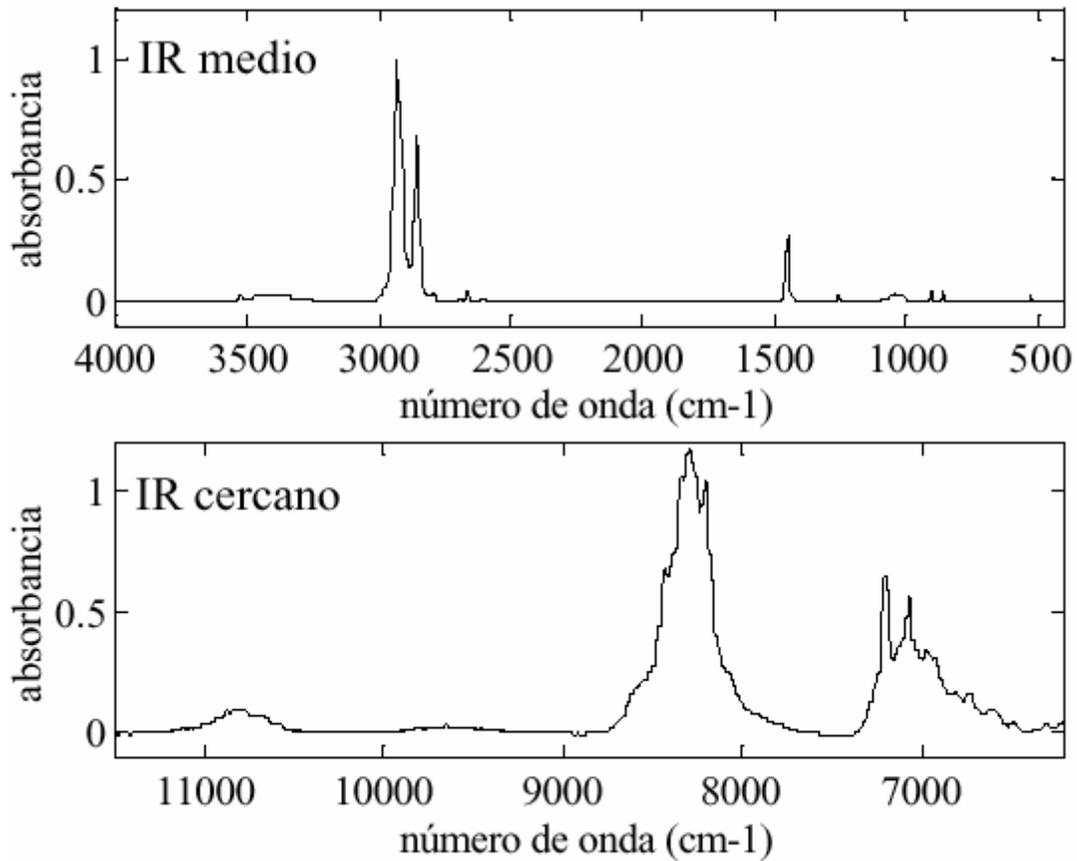


Figura 14. Comparación entre el espectro del MIR y NIR del ciclohexano.

Para obtener una mayor resolución espectral en el NIR, es frecuente emplear la segunda derivada del espectro, para evitar en parte el problema de superposición de picos y la corrección de la línea base. La segunda derivada cuenta con características interesantes; tiene mínimos en la posición de las bandas de absorción del espectro original, facilitando la resolución de los picos solapados (figura 15).

Aunque sus principales desventajas son que aumenta el ruido y la complejidad del espectro. En este caso la Ley de Lambert-Beer sigue siendo válida en el espectro derivado, por lo que éste puede ser utilizado para determinaciones cuantitativas.^[12]

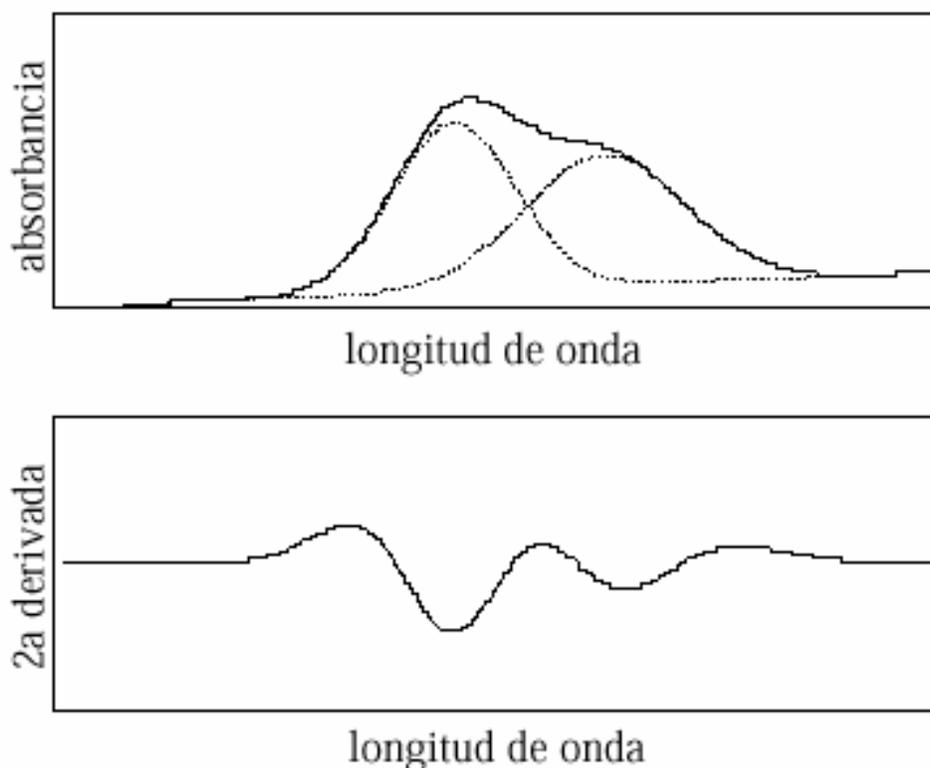


Figura 15. Resolución de dos bandas solapadas a través de la segunda derivada.

En la figura 16 se muestran algunos de los enlaces que se pueden presentar en productos agrícolas, facilitándose una calibración empírica y así poder predecir la calidad de los constituyentes del producto. La dificultad de preseleccionar al mejor grupo de longitudes de onda que se usará para algún análisis en particular, es causada por la gran cantidad de compuestos químicos presentes en la muestra.

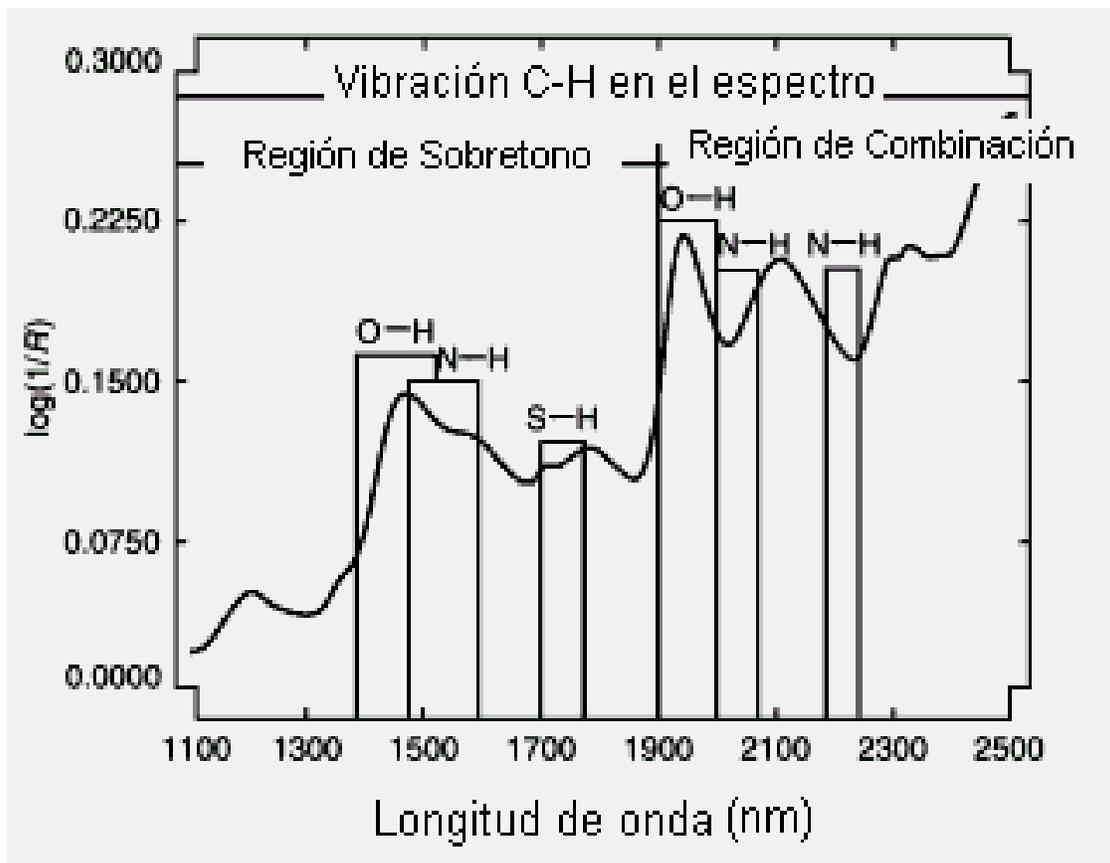


Figura 16. Representación general de X-H de un espectro de productos agrícolas.

Como ya se mencionó la espectroscopia NIR no es factible utilizarla como técnica de caracterización, por la gran sobreposición de bandas presentes en esta región del espectro, pero siendo registrados los espectros de muestras estándar, éstos presentan significativas diferencias que no se encuentran en el infrarrojo medio; por ejemplo, los azúcares y polímeros de la glucosa presentan gran similitud en las bandas en el infrarrojo medio y si es factible distinguirlos en el cercano.

El siguiente espectro en el infrarrojo medio (figura 17), corresponde a una muestra de celulosa que presenta un espectro muy parecido al del almidón; de tal modo que la espectroscopia en el infrarrojo medio sólo los caracteriza comparando la

región de las huellas digitales en muestras estándares y no nos identifica el compuesto.

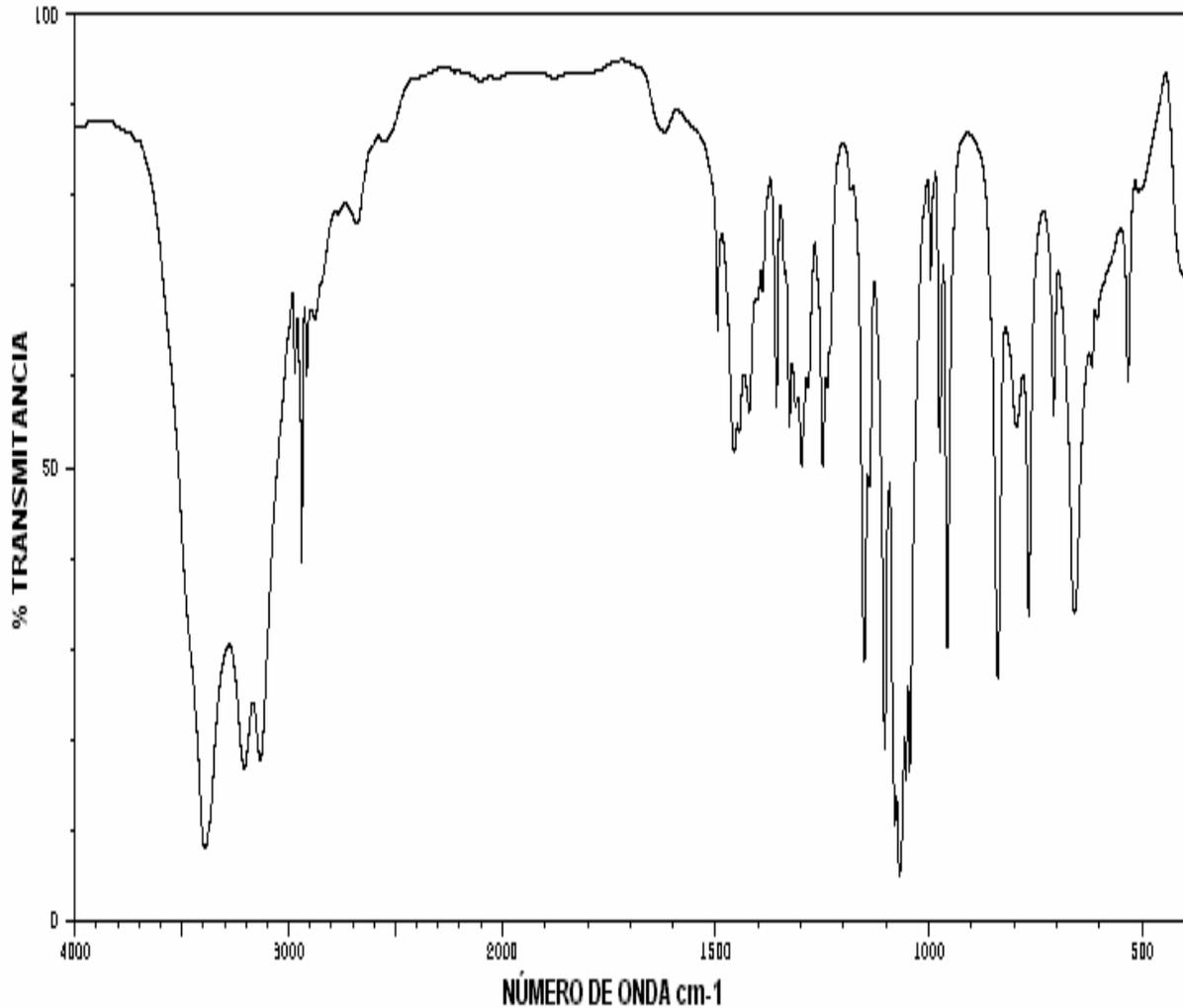


Figura 17. Espectro en el MIR de una muestra de celulosa.

En la figura 18 se observa el espectro en el infrarrojo cercano de 2000 a 2500 nm (región de bandas de combinación) de una muestra de celulosa, señalándose la banda de absorción que se encuentra entre 2336 - 2450 nm y de la tabla 2 se conoce que el enlace C – H correspondiente a la celulosa aparece en 2350 nm aproximadamente. En la figura 19 se presenta el espectro en el infrarrojo cercano del almidón, siendo éste muy parecido al anterior.

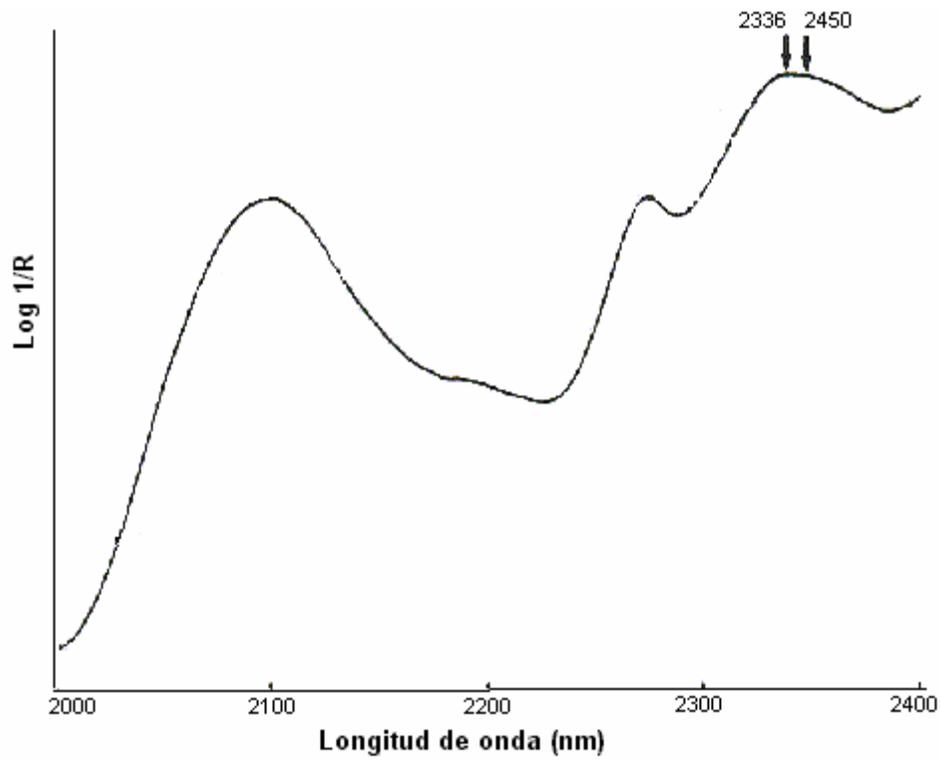


Figura 18. Espectro NIR (2000-2500 nm) de una muestra de celulosa.

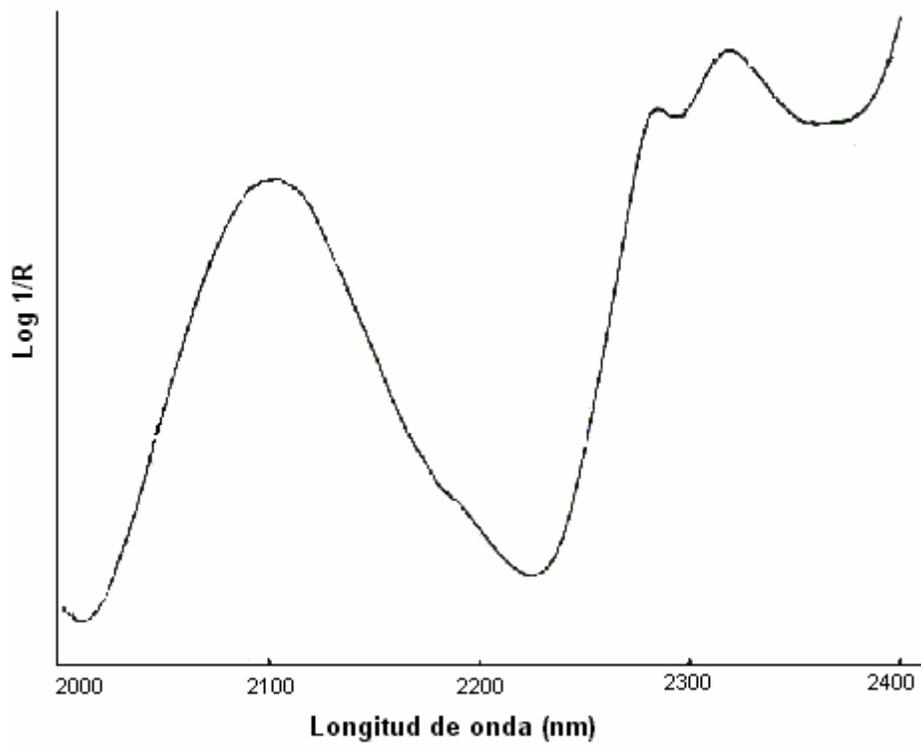


Figura 19. Espectro NIR (2000-2500 nm) de una muestra de almidón.

Al sobreponerse los dos espectros se observa una ligera diferencia, en el caso de la banda de longitudes de onda alrededor de los 2100 nm corresponde al enlace O–H, entre 2270 – 2320 y 2330 nm los dos las tienen, es decir que se deben a ambos tipos de carbohidratos; la única banda que permite la identificación es la que corresponde al enlace C–H de la celulosa en 2350 nm bastando sólo esa pequeña diferencia para caracterizarlos.

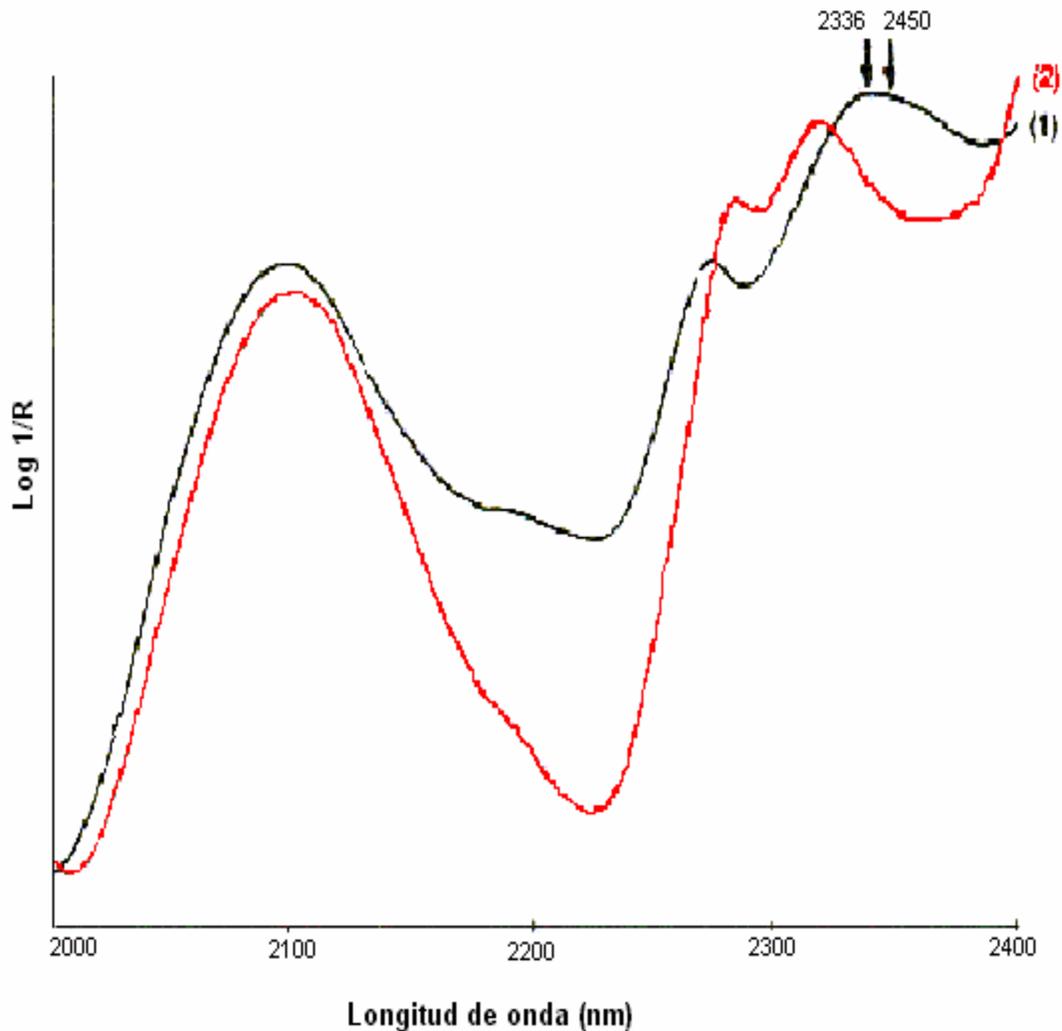


Figura 20. Espectro NIR (2000-2400 nm) de una muestra de celulosa (1) y una muestra de almidón (2).

2.12 Tratamiento de datos espectrales en el NIR

Luego de almacenados los datos de reflectancia como absorbancia ($\log 1/R$), es necesario someter la información espectral a tratamientos matemáticos para posteriormente, mediante análisis estadísticos determinar las calibraciones más satisfactorias.

Los tratamientos matemáticos más conocidos que permiten transformar al espectro son; Transformada de Fourier, Corrección de Variación Normal Estándar (SNV por sus siglas en inglés), Corrección de Dispersión Multiplicativa (MSC por sus siglas en inglés), Detrend y el tratamiento más ampliamente recomendado que sería “SNV y Detrend” (SNV-D por sus siglas en inglés).^[4] Las casas comerciales facilitan al consumidor programas específicos que establecen metodologías fáciles de aplicar estos tratamientos matemáticos.

2.13 Aplicaciones

A continuación se detallan algunas aplicaciones de esta técnica en diferentes industrias.

- En la industria petroquímica debido a la rapidez, versatilidad y por ser no contaminante. Choquette^[13] ha usado el FTIR y FTRaman para la identificación y cuantificación de compuestos oxigenados en una muestra de gasolina, además Buerck ha desarrollado un sensor para la determinación de hidrocarburos en aguas subterráneas^[14]. Así como, Chung^[15] ha demostrado la gran utilidad del instrumento del NIR con detector PbS para análisis de hidrocarburos usando una fibra óptica con una sonda de reflectancia.

- En la industria farmacéutica se utiliza para control de calidad en la manufactura de una gran diversidad de productos, principalmente en donde se requiere la mínima manipulación de las muestras, estos análisis se realizan mediante la espectroscopia de reflectancia difusa.^[7]
- En medicina se ha usado en la detección de lesiones (carcinoma) en la piel y medición del contenido de agua en capas de piel *in vivo* usando el NIR de reflectancia y NIR-FT-Raman^[16]. Y en biología Kusaka^[17] ha hecho análisis para la cuantificación de la oxigenación cerebral.
- En la industria de los polímeros se ha empleado en la identificación de éstos; Rohe ha usado el NIR de transmitancia en la determinación de polímeros como polietileno/polipropileno para su control de calidad^[18]. Van den Broek ha desarrollado un sistema para la detección remota para la discriminación del plástico en tiempo real facilitando su desecho.^[19] Groot^[20] ha desarrollado un sistema para la clasificación automatizada, utilizando el NIR en la separación en línea de madera, plástico y piedras.
- En la industria alimenticia, la espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) es un método utilizado para analizar la calidad de alimentos y productos agrícolas por efecto de la luz que ellos reflejan, esta técnica permite la predicción de la composición nutricional de una muestra (determinación de proteína, grasa, fibra, aminoácidos, almidón, etc.).
- Existen varios métodos reconocidos por la FAO,^[21] para la determinación de los diferentes constituyentes de los alimentos, los cuales se exponen en las tablas del apéndice A y B.
- Algunas aplicaciones específicas reportadas son: la detección de harinas adulteradas, la identificación de materias primas, las pruebas de origen de diferentes productos, constituyentes y características estructurales de la

madera, el contenido de agua en frutas como una medida de control de calidad y la determinación de sacarosa en el agua de la matriz celular. Ding y Xu han empleado la espectroscopia en el infrarrojo cercano para determinar adulteraciones en la carne^[22], González ha cuantificado la proteína en la grasa infiltrada en el músculo del lomo de puerco de raza ibérica^[23]. Así como Tsuta desarrollo un método universal para visualizar el contenido de azúcar en la carne del melón^[24]. El NIR también se ha empleado en la determinación de caseína y grasa en leche; además en la predicción de propiedades sensoriales en carne de vaca^[25].

- Algunos de los estudios más recientes aplicando la técnica del infrarrojo cercano son; la clasificación del tomate con diferentes genotipos por Lijuan Xie, ^[26] en la región del visible y NIR de onda corta (400-1100nm); también la comparación de varios métodos para determinar agua en muestras de yogurt realizados por Martin Adam ^[27], empleando el infrarrojo cercano de transmitancia; así como la determinación de Yulan Rao y colaboradores^[28] del grado de acidez en aceite de cacahuete.

3. CONCLUSIONES

- La espectroscopia en el infrarrojo cercano es una técnica con aplicaciones cualitativas y cuantitativas.
- Su principal ventaja es de requerir un mínimo o ningún tratamiento de la muestra, pudiendo realizar análisis *in situ*.
- Es una técnica no destructiva.
- La exactitud de las técnicas en el infrarrojo cercano depende de la precisión con que se realicen los análisis químicos y los tratamientos matemáticos (quimometría).

4. BIBLIOGRAFÍA

- [1]. Osborne B.G.; Near Infrared Spectroscopy in food Análisis; Longman Scientific technical y Wiley; USA 1986.
- [2]. Lee Smith A.; Applied Infrared Spectroscopy: Fundamentals, Techniques and Analytical problem-solving; John Wiley & Sons; vol. 54; pag. 1-6,97,139-140; 1979.
- [3]. Vázquez D. R., Abadía B., Arreaza L. C.; Aplicación de la Espectroscopia de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano para la caracterización nutricional del pasto de Guinea y del grano de maíz; Revista Corpoica; vol. 5 no. 1; octubre 2004.
- [4]. Burns Donald A., Ciurczak Emil W.; Handbook of Near-Infrared Analysis; 2a. edición; 2001.
- [5]. Cozzolino D., Delucchi I., Kholi M., Vázquez D.; Use of Near Infrared Reflectance spectroscopy to evaluate quality characteristics in whole-wheat grain; Agricultura técnica, vol. 66 no. 4, Chile 2006.
- [6]. Siesler H.W., Ozaki Y., Kawata S., Heise H. M.; Near Infrared Spectroscopy; Wiley-Vch; Weinheim (Alemania); 3er. Reimpresión; 2006.
- [7]. Stchur P., Cleveland D., Zhou J., Michel R.G.; A review of recent applications of Near Infrared Spectroscopy, and of the characteristics of a novel PbS CCD array-based Near-Infrared Spectrometer; Applied Spectroscopy Reviews; vol. 37 no. 4; pag. 383-428; 2002.
- [8]. Pou Saboya Nuria; Análisis de control de preparados farmacéuticos mediante Espectroscopía en el infrarrojo próximo; Universitat Autònoma de Barcelona; Tesis doctoral; Bellaterra 2002.
- [9]. Harris D.; Análisis químico cuantitativo, tercera edición; editorial Iberoamericana; pag. 826; 1992.
- [10]. Gary D. Christian; Química Analítica; Mc Graw Hill; sexta edición; México, D.F.
- [11]. Garbisu C., Alonso E., Luengas I. Aristegieta A., Murua G.; Determinación de parámetros nutricionales por espectroscopia del infrarrojo cercano; Centro Neiker; 2005.

- [12]. Macho Aparicio Santiago; Metodologías analíticas basadas en espectroscopia de Infrarrojo y calibración multivariante. Aplicación a la Industria Petroquímica; Universitat Rovira i Virgili; Tesis doctoral, Tarragona 2002.
- [13]. Choquette S.J., Chelser S.N., Duewer D.L.; Identification and quantitation of oxygenates in gasolina ampules using Fourier transform Near infrared and Fourier transform Raman spectroscopy; *Anal. Chem.*; 1996, 68(20), 3525-3533.
- [14]. Buerck J., Roth S., Kraemer K., Scholz M., Klaas N.; Application of a fiber-optic NIR-EFA sensor system for in situ monitoring of aromatic hydrocarbons in contaminated groundwater; *J. Haz. Mat.*; 2001, 83 (1-2), 11-28.
- [15]. Chung, H.; Choi H.J.; Ku M.S; Rapid identification of petroleum products by Near-infrared spectroscopy; *Bull. Korean Chem. Soc.* 1999; 20(9), 1021-1025.
- [16]. Fendel S., Schrader B.; Investigation of skin and skin lesions by NIR-FT-Raman spectroscopy; *Fres J. Anal. Chem.*; 1998, 360(5), 609-613.
- [17]. Kusaka T., Isobe K., Nagano K., Okubo K., Yasuda S., Kondo M., Itoh S., Hirao K., Onishi S.; Quantification of cerebral oxygenation by full-spectrum Near infrared Spectroscopy using a two-point method; *Comp. Biochem. And Phys. A.*; 2002, 132A(1), 121-132.
- [18]. Rohe T., Becker W., Kölle S., Eisenreich N., Eyerer P.; Near infrared (NIR) Spectroscopy for In-line monitoring of polymer extrusion processes; *Talanta*; 1999, 50(2), 283-290.
- [19]. Van den Broek W.H.A.M., Wienke D., Melssen W.J., Buydens L.M.C.; Plastic Material identification with spectroscopy Near infrared imaging and artificial neural networks; *Anal. Chem. Acta*; 1998, 361, 161-176.
- [20]. De Groot P.J., Postma G.J., Melssen W.J., Buydens L.M.C.; Validation of remote on-line Near infrared Measurements for the classification of demolition waste; *Anal. Chem. Acta*; 2002, 453(1), 117-124.
- [21]. <http://www ftp.fao.org/docrep/fao/009/y4705s/y4705s02.pdf>. Consultada el 22 de mayo de 2009.
- [22]. Ding H.B., Xu R.J.; Near infrared Spectroscopy technique for detection of beef hamburger adulteration; *J. Agric. Food Chem.*; 2000, 48(6), 2193-2198.

- [23]. González-Martín I., González-Pérez C., Hernández-Méndez J., Alvarez-García N., Andaluz J.L.H; On-line non-destructive determination of proteins and infiltrated fat in Iberian pork loin by Near infrared Spectrometry with a remote reflectance fibre optic probe; *Anal. Chem. Acta*; 2002, 453(2), 281-288.
- [24]. Tsuta M., Sugiyama J., Sagara Y.; Near-infrared imaging Spectroscopy based on sugar absorption bands for melons; *J. Agric. Food Chem.*; 2002, 50(1), 48-52.
- [25]. Hildrum K.I., Isaksson T., Naes T., Nilsen B.N., Rødbotten M., Lea P.; Near infrared reflectance spectroscopy in the prediction of sensory properties of beef; *J. Near Infrared Spectrosc*; 1995, 3, 81-87.
- [26]. Xie Lijuan, Ying Yibin, Ying Tiejin; Classification of tomatoes with different genotypes by visible and short-wave near-infrared spectroscopy with least-square support vector machines and other chemometrics; *Journal of food Engineering*; 2009, 94, 34-39.
- [27]. Adam Martin, Dobias Petr, Bajerová Petra, Ventura Karel; Comparison of various methods for determination of water in white yoghurts; *Food Chemistry*; 2009, 115, 1069-1073.
- [28]. Rao Yulan, Xiang Bingren, Zhou Xiaohua, Wang Zhimei, Xie Shaofei, Xu Jianping; Quantitative and qualitative determination of acid value of peanut oil using near-infrared spectrometry; *Journal of food Engineering*; 2009, 93, 249-252.

5. APÉNDICE A

MÉTODOS DE ANÁLISIS DEL AGUA				
PROCEDIMIENTO	APLICABILIDAD	LIMITACIONES	COSTOS DE CAPITAL	ALGUNAS REFERENCIAS
Eliminación física del agua				
Horno de aire a 100°C-105°C	La mayoría de los alimentos excepto los ricos en azúcares y grasas	Caramelización de los azúcares, degradación de las grasas insaturadas, pérdida de otras sustancias volátiles	Bajos	AOAC Internacional, 2002 Anklam, Burke e Isengard, 2001; Nielsen, 1998
Horno de vacío a 60°C	La mayoría de los alimentos	Pérdida de sustancias volátiles	Bajos	Como supra
Liofilización	La mayoría de los alimentos	Lento, agua residual en las muestras	Medios	Como supra
Horno de microondas	Humedad media o elevada	Carbonización	Bajos	Como supra
Destilación de Dean y Stara	Alimentos con alto contenido de sustancias volátiles	Inocuidad de los disolventes utilizados	Bajos	Como supra
Ractividad química				
Kart Fischer	Alimentos higroscópicos con escasas humedad		Bajos	Como supra
Métodos físicos				
RMN	La mayoría de los alimentos	Necesidad de calibración con un alimento específico	Altos	Bradley, 1996; Hester y Quine, 1976
NIR	Establecida para los cereales y algunos otros alimentos	Necesidad de una calibración amplia con un alimento específico. Dependencia del tamaño de las partículas	Altos	Williams, 1975
Cromatografía				
GLC	Carne y productos cárnicos		Altos	Reineccius y Addis, 1973
GSC	Algunos productos cárnicos		Altos	Khayat, 1974
Notas: En las referencias seleccionadas aparecen procedimientos, evaluaciones o exámenes detallados. RMN: resonancia magnética nuclear; NIR: reflectancia en el infrarrojo cercano; GLC: cromatografía gas-líquido; GSC: cromatografía gas-sólido. Los costos de capital bajos, medios y altos se describen en el texto.				

APÉNDICE A

MÉTODOS DE ANÁLISIS DEL NITRÓGENO Y LAS PROTEÍNAS				
PROCEDIMIENTO	APLICABILIDAD	LIMITACIONES	COSTOS DE CAPITAL	ALGUNAS REFERENCIAS
Nitrógeno total				
Kjeldahl	Manual, todos los alimentos	Ligera interferencia del nitrógeno inorgánico	Bajos	AOAC Internacional, 2002; Sullivan y Carpenter; 1993
	Automatizado, con varios niveles de complejidad	Ligera interferencia del nitrógeno inorgánico	Medios	
Dumas	Automatizado todos los alimentos	Incluye el nitrógeno inorgánico. Tamaño de la porción analítica	Altos	AOAC Internacional, 2002;
Métodos radioquímicos	La mayoría de los alimentos	Necesidad del instrumento	Muy altos	Pomerantz y Moore, 1975
Proteínas				
N total x factor	Todos los alimentos	Variaciones del NNP	Bajos	FAO/OMS, 1973
N proteico x factor	Preferible para las hortalizas, algunos pescados, alimentos con levadura o con insectos, leche materna	Elección del procedimiento para la medición del NNP. Es mejor utilizar el nitrógeno de los aminoácidos	Bajos	Koivistoinen <i>et al.</i> , 1996; Bell, 1963
Métodos aplicables a alimentos específicos				
Titulación con formol	Productos lácteos	Especificidad	Bajos	Taylor, 1957; AOAC Interl, 2002; Chang 1998
Biuret	Como supra	Especificidad	Bajos	Noll, Simmonds y Bushuk, 1974; como para el formol
Reactivo de Folin	Como supra	Especificidad	Bajos	Lowry <i>et al.</i> , 1951; Huang <i>et al.</i> , 1976; como para el formol
Destilación alcalina	Cereales	Especificidad	Bajos	Chang 1998
Fijación de colorantes	Alimentos específicos, algunos cereales, algunas legumbres	Especificidad	Bajos	Como para el formol
NIR	Establecido para algunos alimentos	Número de muestras de calibración	Altos	Hunt, W. H. <i>et al.</i> , 1977
Notas: En las referencias seleccionadas aparecen procedimientos, evaluaciones o exámenes detallados. NNP: nitrógeno no proteico; NIR: reflectancia en el infrarrojo cercano				

APÉNDICE A

MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LOS AMINOÁCIDOS				
PROCEDIMIENTO	APLICABILIDAD	LIMITACIONES	COSTOS DE CAPITAL	ALGUNAS REFERENCIAS
Cromatografía de intercambio iónico tras hidrólisis ácida	Todos los alimentos	Pérdidas hidrolíticas de los aminoácidos más hábiles y liberación lenta de los aminoácidos de cadena ramificada	Altos	AOAC Inter., 2002; De Geeter y Huyghebaert, 1992
Cromatografía líquida de alto rendimiento tras hidrólisis ácida	Todos los alimentos	Como supra	Altos	Como supra
Cromatografía de gases tras hidrólisis ácida y derivación	La mayoría de los alimentos	Es decisiva la elección de derivados	De medios a altos	Como supra
(Aminoácidos azufrados) Hidrólisis ácida tras la oxidación de los aminoácidos azufrados	La mayoría de los alimentos	Pérdidas hidrolíticas	Altos	Como supra
(Triptófano) Hidrólisis alcalina o cromatografía de intercambio iónico	La mayoría de los alimentos	Pérdidas hidrolíticas de otros aminoácidos	Altos	Moore y stein, 1948; Landry y Delhave, 1993
(Triptófano y aminoácidos S) Colorimetría	La mayoría de los alimentos		Bajos	Blackburn, 1968; Christie y Wiggins, 1978
(Lisina disponible) Colorimetría	La mayoría de los alimentos		Bajos	Carpenter, 1960; Booth, 1971
Notas: En las referencias seleccionadas aparecen procedimientos, evaluaciones o exámenes detallados.				

APÉNDICE A

MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LOS AZÚCARES				
MÉTODOS	APLICABILIDAD	LIMITACIONES	COSTOS DE CAPITAL	ALGUNAS REFERENCIAS
Peso específico	Soluciones de azúcares	Exacto para la sacarosa	Bajos	AOAC Internacional, 2002; Spathgate, 1991
Índice de refracción	Soluciones de azúcares	Se requiere de calibración empírica	Bajos	Como supra
Polarimetría	Azúcares aislados, mezclas simples	Es esencial una estrecha atención a los métodos normalizados	Bajos	Como supra
Reductimetría	Azúcares reductores, mezclas de azúcares invertidos	Azúcares no reductores	Bajos	AOAC Internacional, 2002
Colorimetría	Azúcares aislados, mezclas simples	Especificidad	Bajos	Spathgate, 1991; Hudson et al., 1976; Hudson y Bailey, 1980
Métodos de enzimas específicas	Glucosa, mezclas complejas	Los reactivos pueden ser caros	Bajos	Bergmeyer, 1974
GLC	Mezclas complejas	Necesidad de derivados	Medios	Englyst, Quigley y Hudson, 1994
HPLC	Mezclas complejas	Elección de la columna, detectores	De medios a altos	Spathgate, 1991; Shaw, 1988; Englyst, Quigley y Hudson, 1994
<p>Notas: En las referencias seleccionadas aparecen procedimientos, evaluaciones o exámenes detallados. GLC: cromatografía gas-líquido; HPLC: cromatografía líquida de alto rendimiento</p>				

APÉNDICE A

MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LOS LÍPIDOS				
PROCEDIMIENTO	APLICABILIDAD	LIMITACIONES	COSTOS DE CAPITAL	ALGUNAS REFERENCIAS
Grasa total				
Extracción continua (disolvente único)	Alimentos con poca humedad (muestras analíticas secas)	Extracción incompleta de numerosos alimentos. Requiere mucho tiempo; los extractos no pueden utilizarse para estudios de ácidos grasos	Bajos	Sullivan y Carpenter, 1993
Hidrólisis ácida	Todos los alimentos, excepto los productos lácteos y con mucho azúcar	Hidrólisis parcial de lípidos. Los extractos no se pueden utilizar para estudios de ácidos grasos	Bajos	AOAC Internacional, 2002; Sullivan y Carpenter, 1993
Hidrólisis y GLC capilar	La mayoría de los alimentos (conformidad con la NLEA)		Altos	
Extracción con mezclas de disolventes	Rápido y eficaz para muchos alimentos. El extracto se puede usar para mediciones de ácidos grasos	Extracción completa de la mayoría de los alimentos. A menudo hay que purificar los extractos	Bajos	Bligh y Dyer, 1959; Hubbard <i>et al.</i> , 1977
Hidrólisis alcalina	Productos lácteos alimenticios	Validado sólo para los productos lácteos alimenticios	Bajos	AOAC Internacional, 2002
NIR	Establecido para los cereales	Requiere una amplia calibración	Altos	Hunt, W.H. <i>et al.</i> , 1977
Triacilgliceroles				
Serie de métodos cromatográficos	Todos los alimentos	Los ácidos grasos libres pueden interferir. Útil la verificación de TLC	Medios	Gurr, Harwood y Frayn, 2002
Ácidos grasos				
GLC	Todo alimento previa transmetilación	Validado para mayoría de alimentos	Altos	AOCS, 1998
HPLC	En fase de perfeccionamiento	No tiene por ahora ventajas demostradas sobre la GLC	Altos	Gurr, Harwood y Frayn, 2002
Ácidos grasos trans				
GLC con análisis de infrarrojo	Todos los alimentos	Disponibilidad de patrones auténticos para algunos isómeros	De medios a altos	Como supra
Absorción de IR	Todos los alimentos	Algunas interferencias	Altos	Como supra
GLC	Todos los alimentos	Se requieren técnicas capilares	Altos/medios	Como supra
Notas: GLC: cromatografía gas-líquido; IR: infrarrojo; NLEA: Ley de etiquetado y Educación Nutricional; NIR: reflectancia en el infrarrojo cercano; TLC: cromatografía en capa fina; HPLC: cromatografía líquida de alto rendimiento				

APÉNDICE B

FACTORES PARA LA CONVERSIÓN DE LOS VALORES DE NITRÓGENO EN PROTEÍNAS (por g de N)*			
PRODUCTO ALIMENTICIO	FACTOR	PRODUCTO ALIMENTICIO	FACTOR
PRODUCTOS ANIMALES		PRODUCTOS ANIMALES	
Carne y pescado	6.25	Trigo	
Gelatina	5.55	entero	5.83
Leche y productos lácteos	6.38	salvado	6.31
Caseína	6.40	embriones	5.80
Leche humana	6.37	endosperma	5.70
Huevos		Arroz y harina de arroz	5.95
enteros	6.25	Centeno y harina de centeno	5.83
albúmina	6.32	Cebada y harina de cebada	5.83
vitelina	6.12	Avena	5.83
		Mijo	6.31
		Maíz	6.25
		Frijoles	6.25
		Soja	5.71
		Nueces	
		almendras	5.18
		nueces del Brasil	5.46
		maníes	5.46
		otras	5.30
<p>❖ Cuando no se indica ningún factor específico, se debe utilizar el de 6.25 hasta que se haya determinado uno más apropiado.</p>			
<p>Fuente: FAO/OMS, 1973</p>			