



DEPARTAMENTO DE POSGRADOS

“DETERMINACIÓN DEL DETERIORO MICROBIANO DE LA CARNE MOLIDA DE CERDO Y POLLO APLICANDO ESPECTROSCOPIA INFRARROJA”

MAGISTER EN GESTIÓN DE LA CALIDAD Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

AUTOR: MARÍA FERNANDA ROSALES MEDINA

DIRECTOR: PIERCOSIMO TRIPALDI

CUENCA – ECUADOR

2013

DEDICATORIA

A Guillermo, Guillermito y Luis Fernando, los amo.

A mis padres y hermanos por ser mi fortaleza.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a Dios, por ser el apoyo en los momentos difíciles y nunca dejarnos solos.

Un especial agradecimiento al Dr. Piercosimo Tripaldi, amigo querido que ha dado su conocimiento y tiempo para este trabajo.

A la Ing. Miriam Briones, Directora de la Maestría en Gestión de la Calidad y Seguridad Alimentaria por la amistad y apoyo incondicional.

A Johanna Tacuri, Mónica Tinoco y Andrea Alejandro por la ayuda prestada para la culminación de esta tesis.

RESUMEN

El presente trabajo tiene como objetivo determinar el deterioro de carnes a través de espectroscopia de infrarrojo FT-MIR-ATR. Se utilizaron muestras de carnes de cerdo y pollo comprados en los mercados de la ciudad de Cuenca a los cuales se les realizó análisis microbiológicos y espectrales en la región de 780 a 1800 cm^{-1} en el equipo de infrarrojo medio del laboratorio de química de la Universidad del Azuay. Se aplicó un método de clasificación K-NN en combinación con el método de algoritmos genéticos para el modelo de predicción, el cual fue evaluado a través de una validación externa. Se reporta las longitudes de onda, así como los pre tratamientos de los datos generados en el presente estudio. El algoritmo genético identificó los picos de los espectros que influyen en la detección microbiana; estos picos son indicativos de amida-CN debido a la degradación de proteínas por microorganismos.

Palabras Claves: FT-MIR-ATR, espectrales, algoritmos genéticos, amida-CN

ABSTRACT

The goal of the present project is to determine the deterioration of meat through infrared spectroscopy FT-MIR-ATR. Pork meat and chicken from the local markets in the city of Cuenca were employed as samples. We performed a microbiologic and spectral analysis in the 180 to 1800 cm^{-1} region through the mid-infrared equipment of the chemistry laboratory in the University of Azuay. We employed the K-NN classification method combined with the predicting method based on genetic algorithm, which was evaluated through external validation. We reported the wave lengths as well as the pretreatment of the data generated in the present study. The genetic algorithm identified the spectrum peaks that influence in microbial detection. These peaks are indicators of amide C-N due to the degradation of proteins by microorganisms.

Keywords: FT-MIR-ATR spectral genetic algorithms, amide-CN



Translated by,

Diana Lee Rodas

INDICE DE CONTENIDO

CONTENIDO	Página
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTO.....	iii
RESUMEN Y PALABRAS CLAVE.....	iv
ABSTRACT AND KEYWORDS.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
INTRODUCCION.....	1
OBJETIVO	
GENERAL.....	6
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	6
CAPITULO I.....	7
MATERIALES Y METODOS.....	7
1.1 Descripción del lugar de estudio.....	7
1.2 Muestreo	7
1.3 Preparación de las muestras.....	7
1.4 Análisis de las muestras.....	7
1.4.1 Análisis microbiológico.....	8
1.4.1.1 Materiales.....	8
1.4.1.2 Diagrama de flujo de análisis microbiológicos de muestras.....	8
1.4.2 Análisis de espectros.....	10
1.4.2.1 Pre procesamiento de los datos.....	11
1.5 Análisis estadístico	14
1.5.1 Método de clasificación KNN (K-nearest neighbors).....	14
1.5.2 Método de algoritmos genéticos.....	14
1.5.3 Validación cruzada (cross validation).....	15

1.5.4 Validación externa (test set).....	15
1.6 Modelo de predicción.....	15
CAPITULO II	19
RESULTADOS.....	19
2.1 Análisis microbiológico	19
2.2 Resultados del modelo de predicción	21
2.2.1 Resultados de los análisis de los datos de las muestras de cerdo	22
2.2.2 Resultados de los análisis de los datos de las muestras de pollo	26
CAPITULO III.....	30
DISCUSIÓN.....	30
CONCLUSIONES.....	33
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	34
REFERENCIAS ELECTRONICAS	36
ANEXOS	37

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Vibraciones de estiramiento y flexión.....	3
Figura 2. Vibraciones de tensión simétrica y asimétrica.....	3
Figura 3. Esquema de un instrumento FTIR	4
Figura 4. Esquema ATR.....	5
Figura 5. Calidad del modelo para la carne de cerdo	22
Figura 6. Espectros FT-IR de la muestra de carne de cerdo	24
Figura 7. Calidad del modelo para la carne de pollo	26
Figura 8. Espectro FT-IR de la muestra de carne de pollo	28

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Resultados de los análisis microbiológicos en las muestras de carne de cerdo.....	19
Tabla 2. Resultados de los análisis microbiológicos en las muestras de carne de pollo.....	20
Tabla 3. Bandas seleccionadas por el algoritmo genético para carne de cerdo	22
Tabla 4. Parámetros de calidad del modelo de predicción para el training set de carne de cerdo.....	22
Tabla 5. Resultados del training set para carne de cerdo	23
Tabla 6. Resultados del test set para carne de cerdo	24
Tabla 7. Matriz de confusión para carne de cerdo	25
Tabla 8. Parámetros de calidad para el training set de carne de cerdo	25
Tabla 9. Parámetros de calidad del modelo para el Test set para carne de cerdo	25
Tabla 10. Matriz de confusión del Test set para carne de cerdo.....	25
Tabla 11. Bandas seleccionadas por el algoritmo genético para carne de pollo.....	26
Tabla 12. Parámetros de calidad del modelo de predicción para el training set de carne de pollo.....	26
Tabla 13. Resultados del training set para carne de pollo	27
Tabla 14. Resultados del test set para carne de pollo	28
Tabla 15. Matriz de confusión para carne de pollo	28
Tabla 16. Parámetros de calidad para el training set de carne de pollo	29
Tabla 17. Parámetros de calidad del modelo para el Test set para carne de pollo	29
Tabla 18. Matriz de confusión del Test set para carne de pollo.....	29

Rosales Medina María Fernanda

Trabajo de graduación

Dr. Piercosimo Tripaldi

Junio, 2013

“Determinación del deterioro microbiano de la carne molida de cerdo y pollo aplicando espectroscopia infrarroja”

INTRODUCCION

De acuerdo a la Gaceta Epidemiológica Semanal N° 13, SIVE-ALERTA del Ministerio de Salud Pública del Ecuador, para lo que va del año 2013 se encuentran registrados 1838 intoxicaciones alimentarias agudas, muchas de estas intoxicaciones no están determinadas exactamente el agente causante, por lo que se generaliza como una ETA (enfermedad transmitida por alimentos)

Pero estos alimentos muchas veces son los que consumimos en casa o en los locales de comida preparada, las causas de las intoxicaciones pueden ser dadas por microorganismos como: *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Yersinia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, ciertos clostridios, *Campilobacter*, enterococos, *Staphylococcus*, etc.

Alimentos como la carne de res, cerdo, pescado, aves, etc., son propensos a contaminarse rápidamente ya sea por la forma de faenamiento, expendio y manipulación en los centros de abasto, en los que la falta de refrigeración las hacen muy vulnerables a la proliferación de microorganismos ambientales y propios de la canal, como los mencionados anteriormente.

Las empresas cárnicas, faenan o compran la carne la cual pasa por una serie de tratamientos hasta convertirse en un producto procesado listo para el consumo, y aunque mantiene la cadena de frío, no siempre pueden saber qué tipo de carne, desde el punto de vista microbiológico, tiene antes de empezar el proceso de producción. Esto conlleva a que muchas veces piezas de carne que parecen de buena calidad no se encuentren aptas para el proceso, además de que al hacer un análisis microbiológico inicial a la carne este toma de 24 a 48 horas para saber el estado de contaminación. Hoy en día las fabricas de cárnicos utilizan ácidos como el ácido láctico para mantener las cargas microbianas lo más bajas posibles, aunque esto puede generar cierta dureza al músculo, por lo que es utilizada con moderación y en dosis no muy altas.

Las técnicas de microbiología han cambiado en los últimos años, es así que por mucho tiempo se ha usado medios de cultivo que se deben preparar, es decir pesar el producto, procesarlo en un autoclave y colocarlo en cajas de petri y luego sembrar la muestra a analizar y terminar incubando por un lapso de tiempo.

Entre preparación y análisis se toma un tiempo aproximado de 4 horas y luego el tiempo de incubación unas 24 a 48 horas dependiendo del análisis a realizar, ya que hay técnicas que requieren más horas. Ahora existen métodos un poco más rápidos desde el punto de vista de la preparación y algo en el tiempo de espera durante la incubación, como son las cajas Compact Dry (Nissui, Japón) las cuales vienen listas para trabajar y ahorran tiempo de preparación y son económicas. La dificultad de esperar es que no se pueden liberar lotes de materias primas para el inicio de un proceso de producción, como es el caso de las carnes, ya que tomaría un tiempo prudencial de espera para la incubación microbiológica.

Viendo esta necesidad de saber si la carne de cerdo o pollo se encuentran aptas para el consumo y el proceso, se realizó el presente estudio el cual determina a través de la espectroscopia de infrarrojo utilizando una clasificación KNN acoplada a algoritmos genéticos si la carne de cerdo o pollo se encuentran dentro o fuera de los límites de contaminación por E. coli que permite la norma técnica ecuatoriana NTE INEN 1338:12 para carnes y sus productos. Aunque no es necesario descartar el análisis microbiológico ya que este nos dirá el grado de contaminación y el tipo de microorganismo presente importante para tomar acciones correctivas antes, durante y al final de los procesos productivos.

Bacterias como la E. coli son de suma importancia a nivel alimentario, ya que es una bacteria cosmopolita que es producto de la contaminación fecal.

E. coli es un bacilo corto, móvil, gran negativo, muy parecida a Salmonella. Ataca la sacarosa y lactosa con la producción de ácido y gas. Se encuentra en el intestino de los animales de sangre caliente, pueden llegar a ser patógenas para el hombre. Existen varios tipos de E. coli, entre ellas: E. coli enteroagregante (EAEC) origina diarreas persistentes en los niños. Estas cepas producen toxinas que estimulan la secreción intestinal. E. coli enteropatógeno (EPEC) causa graves diarreas en los niños pero se desconoce su mecanismo patogénico. E. coli enterotoxigenico (ETEC) produce la conocida "diarrea del viajero". Estas cepas producen enterotoxinas de dos tipos distintos: una termolábil que se inactiva a los 60°C en 30 minutos y una termoestables que resisten 100°C durante 15 minutos. E. coli enteroinvasivo (EICE) produce una citotoxina y frecuentemente induce enfermedades muy graves, como colitis y una forma de disentería acompañada de fiebre y heces sanguinolentas. E. coli enterohemorrágico (EHEC) también produce citotoxinas que originan enfermedades graves, aquí se encuentra la E. coli O157:H7. Su dosis infectiva es de aproximadamente 10 a 100 bacterias y sus vehículos infectivos son la carne poco cocinada, los lácteos contaminados, los jugos de manzana y el contacto directo con animales. E. coli verotoxigenico (VTEC), como E. coli O26:H11, este tipo de bacteria produce a través de sus toxinas VT1 y VT2 destrucción de las células del intestino y producción de colitis hemorrágica, un 15% de los infectados desarrollan síndrome urémico hemolítico. (Forsythe, 2010)

La espectroscopia de infrarrojo es una técnica basada en las vibraciones de los átomos de una molécula. Un espectro infrarrojo se obtiene generalmente mediante el paso de radiación infrarroja a través de una muestra y determinar qué fracción de la radiación incidente es absorbida en una energía particular. La energía que en cualquier pico en un espectro de absorción aparece corresponde a la frecuencia de la vibración de una parte de una molécula de la muestra.

Las interacciones de la radiación infrarroja con la materia pueden ser entendidas en términos de cambios en los dipolos moleculares asociados a las vibraciones y rotaciones. Para empezar con un modelo básico, una molécula puede ser considerada como un sistema de masas unidas por enlaces con propiedades tipo resorte. Tomando primero el caso simple de moléculas diatómicas, dichas moléculas tienen tres grados de libertad de traslación y dos grados de libertad de rotación. Los átomos en las moléculas también pueden moverse uno con relación a otro, es decir, las longitudes de enlace pueden variar o un átomo se puede mover fuera de su plano actual. Esta es una descripción de los movimientos de estiramiento y flexión que se hace referencia colectivamente como vibraciones. Para una molécula diatómica, sólo una vibración que se corresponde con el estiramiento y la compresión de la unión es posible. Esto representa un grado de libertad de vibración. (Stuart, 2004)

Las vibraciones pueden implicar un cambio en la longitud del enlace (estiramiento) o ángulo de enlace (flexión) (ver Figura 1). Algunas bandas pueden estirar en fase (estiramiento simétrico) o fuera-de-fase (estiramiento asimétrico), como se muestra en la Figura 2.

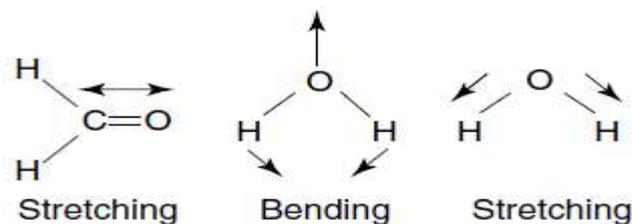


Figura 1. Vibraciones de estiramiento y flexión

Fuente: Stuart, 2004

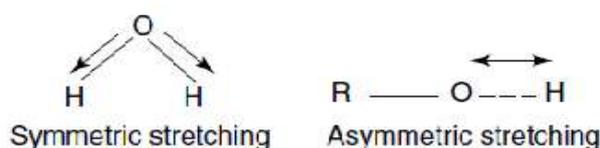


Figura 2. Vibraciones de tensión simétrica y asimétrica.

Fuente: Stuart, 2004

La espectroscopia de Infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) se basa en la idea de la interferencia de la radiación entre los dos haces para producir un interferograma. El último es una señal producida como una función del cambio de la longitud de la trayectoria entre

los dos haces. Los dos dominios de la distancia y la frecuencia son transformables entre sí por el método matemático de transformación de Fourier. Los componentes básicos de un espectrómetro FTIR se muestran esquemáticamente en la Figura 3. La radiación que emerge de la fuente pasa a través de un interferómetro para la muestra antes de llegar a un detector. Tras la amplificación de la señal, en el que las contribuciones de alta frecuencia han sido eliminadas por un filtro, los datos se convierten a forma digital por un convertidor analógico-a-digital y transferido al ordenador por la transformación de Fourier. (Stuart,2004)

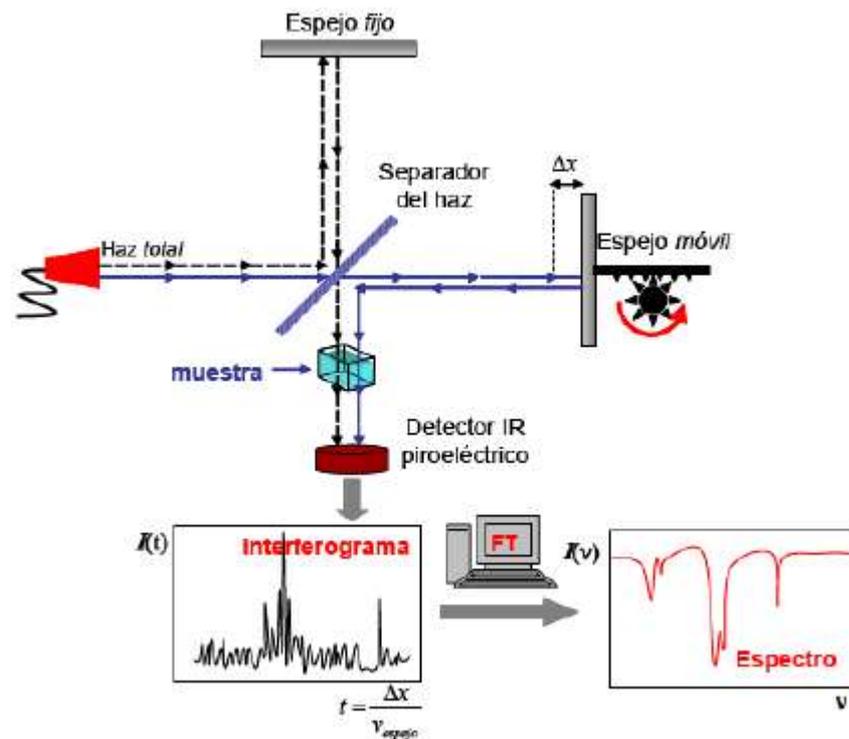


Figura 3: Esquema de un instrumento FTIR

Fuente: Skoog, 2008

El espectro infrarrojo se puede dividir en tres regiones principales: el infrarrojo lejano ($<400 \text{ cm}^{-1}$), el infrarrojo medio ($4000 \text{ a } 400 \text{ cm}^{-1}$) y el infrarrojo cercano ($13\ 000\text{-}4000 \text{ cm}^{-1}$).

El espectro de infrarrojo medio ($4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$) puede ser aproximadamente dividido en cuatro regiones y la naturaleza de una frecuencia de grupo puede ser generalmente determinado por la región en la que se encuentra. Las regiones son las siguientes: la región X-H estiramiento ($4000\text{-}2500 \text{ cm}^{-1}$), la región de triple unión ($2500\text{-}2000 \text{ cm}^{-1}$), la región de doble enlace ($2000\text{-}1500 \text{ cm}^{-1}$) y la región de la huella digital ($1500\text{-}600 \text{ cm}^{-1}$)

Las principales bandas en la región de $2000\text{-}1500 \text{ cm}^{-1}$ son debido al estiramiento de los grupo $\text{C} = \text{C}$ y $\text{C} = \text{O}$. El estiramiento del grupo carbonilo es una de las más fáciles de reconocer en las absorciones de un espectro infrarrojo. Por lo general, es la banda más

intensa en el espectro, y dependiendo del tipo de enlace C = O, se produce en la región 1830-1650 cm^{-1} (Stuart, 2004).

Cuando las muestras son difíciles de analizar por los métodos de transmitancia convencional se utiliza otros métodos de reflectancia como la total atenuada (ATR).

La espectroscopía de reflectancia total atenuada (ATR) utiliza el fenómeno de la reflexión interna total (Figura 4). Un haz de radiación que entra un cristal se someterá a la reflexión interna total cuando el ángulo de incidencia en la interfaz entre la muestra y el cristal es mayor que el ángulo crítico, donde la última es una función de los índices de refracción de las dos superficies. El haz penetra en una fracción de una longitud de onda más allá de la superficie reflectante y cuando un material que absorbe selectivamente la radiación está en estrecho contacto con la superficie de reflexión, el haz pierde energía en la longitud de onda donde absorbe el material. La radiación atenuada resultante se mide y se representa como una función de longitud de onda por el espectrómetro y da lugar a las características espectrales de absorción de la muestra (Stuart, 2004)

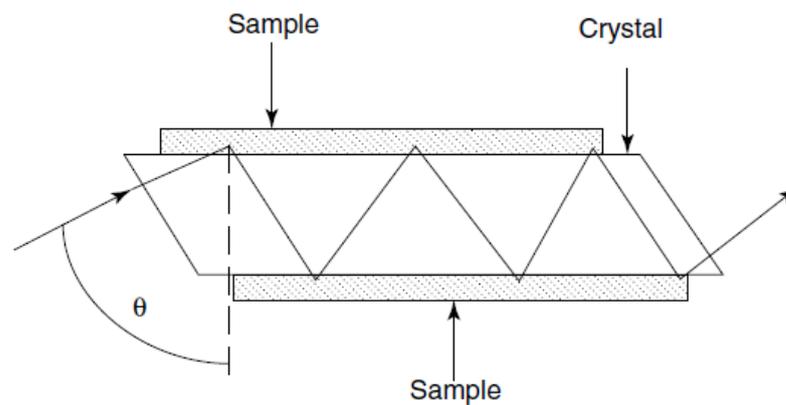


Figura 4. Esquema de ATR

Fuente: Stuart, 2004

OBJETIVO GENERAL:

Determinar a través de la espectroscopia infrarroja el deterioro de las carnes de cerdo y pollo, como un método rápido de microbiología.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Identificar los espectros del infrarrojo de la carne de pollo y cerdo cada hora.
- Realizar los análisis microbiológicos de las muestras de carne homogenizada.
- Seleccionar las variables a estudiar.
- Aplicar algoritmos genéticos que ayudará a determinar la correlación entre las pruebas microbiológicas y las pruebas en el IR.

CAPITULO I

MATERIALES Y METODOS

1.1 Descripción del lugar de estudio

Los análisis microbiológicos de las muestras de carne de pollo y cerdo, así como los análisis espectrales en el IR se llevaron a cabo en el laboratorio de Microbiología y química de UDA LABORATORIOS respectivamente que se encuentran localizados en la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del Azuay.

1.2 Muestreo

Se tomaron las muestras de carne de cerdo y pollo en los mercados principales de la Ciudad de Cuenca en las carnicerías, colocando las muestras en fundas plásticas y llevando inmediatamente al laboratorio de microbiología para su proceso.

Las muestras fueron llevadas en una hielera y almacenadas inmediatamente en refrigeración a una temperatura de 4°C aproximadamente antes de su procesamiento.

Se compraron cerca de 450 gramos de carne tanto de pollo como de cerdo.

1.3 Preparación de las muestras

Tal y como describe Ellis et al (2004), las muestras de carne se procesaron en una licuadora de laboratorio marca Waring en la que se molía por completo la muestra tal y como se compraba, es decir músculo, piel (caso del pollo), tegumentos, colágeno, grasa, etc.

Una vez molida la carne, se colocaba en cajas de petri descartables abiertas y se colocaba en una incubadora marca Memmert, la cual se mantenía a una temperatura entre 22 a 25°C, las muestras permanecían ahí hasta que se sacaba una pequeña muestra cada hora para realizar el análisis espectral en el IR y otra muestra para realizar el análisis microbiológico.

1.4 Análisis de las muestras

Las muestras fueron analizadas tanto microbiológicamente como espectralmente a través del IR, como indica Ellis et al (2004). Se tomaron las muestras y se realizó un análisis microbiológico para poder realizar luego un análisis en conjunto con los espectros encontrados, los análisis fueron realizados a la misma hora por 8 horas continuas.

1.4.1 Análisis Microbiológico

1.4.1.1 Materiales

Balanza técnica

Autoclave

Pipetas automáticas 100 a 1000 ul

Puntas de pipetas azules envueltas en papel aluminio y esterilizadas

Tubos de vidrio tapa rosca

Agua de peptona tamponada (90 ml en frascos con tapa rosca y 9 ml en cada tubo de vidrio, esterilizar a 121°C por 15 minutos)

Placas Compact Dry EC (E. coli/ coliformes)

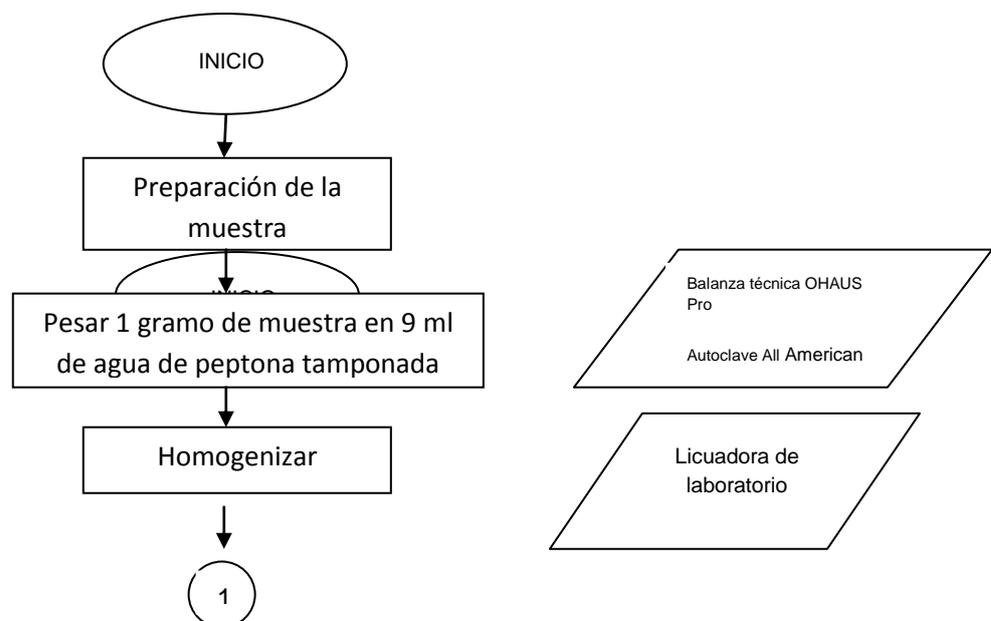
Placas Compact Dry TC (Total Count, aerobios mesófilos)

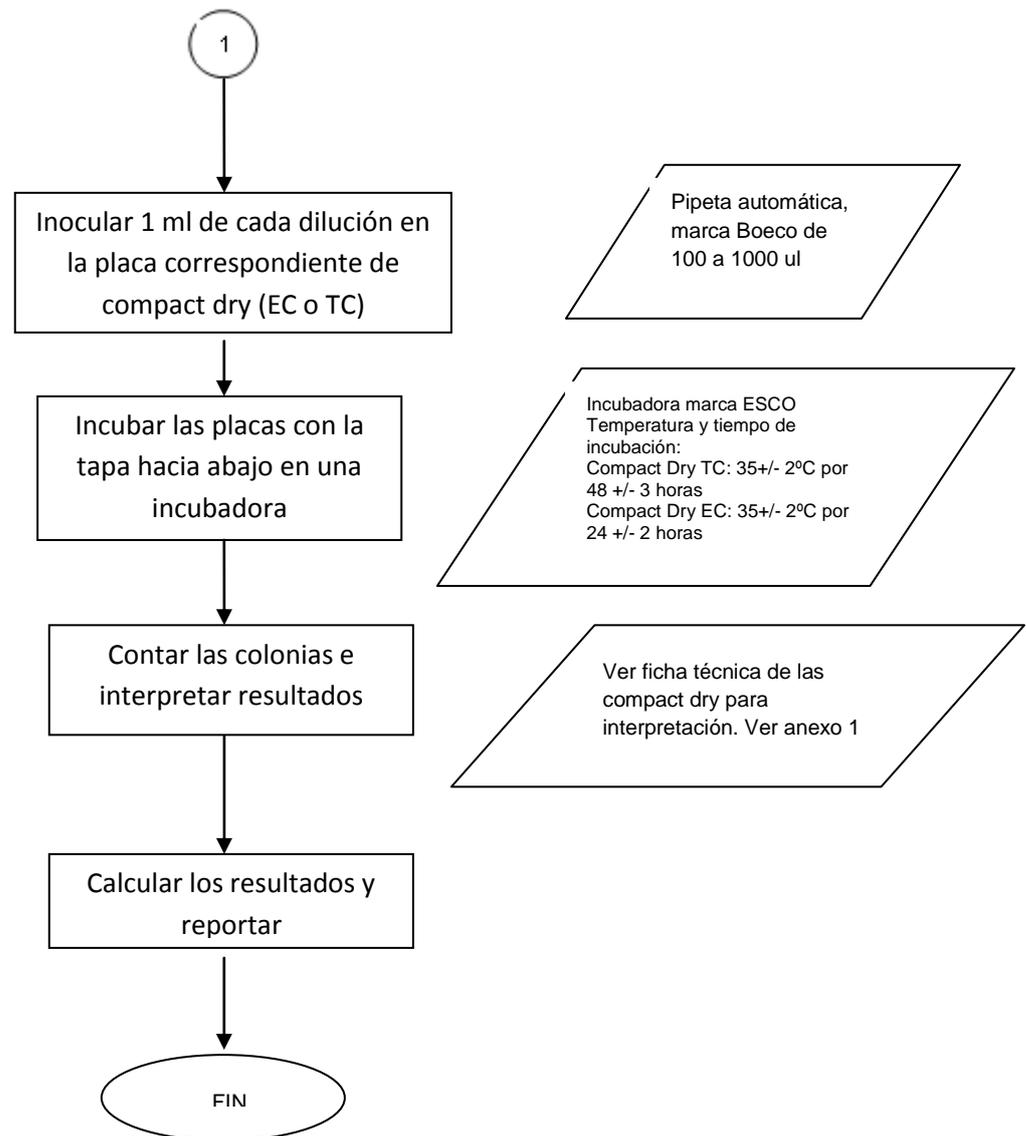
Cámara de flujo laminar vertical

Incubadora

Contador de colonias

1.4.1.2 Diagrama de flujo de análisis microbiológico de muestras





Para la elaboración de estos análisis se utilizaron placas Compact Dry de la empresa Nissui Pharmaceutical Co. Ltda. Japón, estas placas microbiológicas se encuentran validadas por la AOAC (Association of Official Analytical Chemists).

Compact Dry TC (Total Count) es un medio que contiene agar de cultivo estándar y que sirve para comprobar el índice de germinación total. Debido a la sal de tetrazolio, indicador redox, las colonias de bacterias presentan una coloración roja, pudiéndose con ello distinguir muy fácilmente de posibles restos de alimentos (Nissui, 2005)

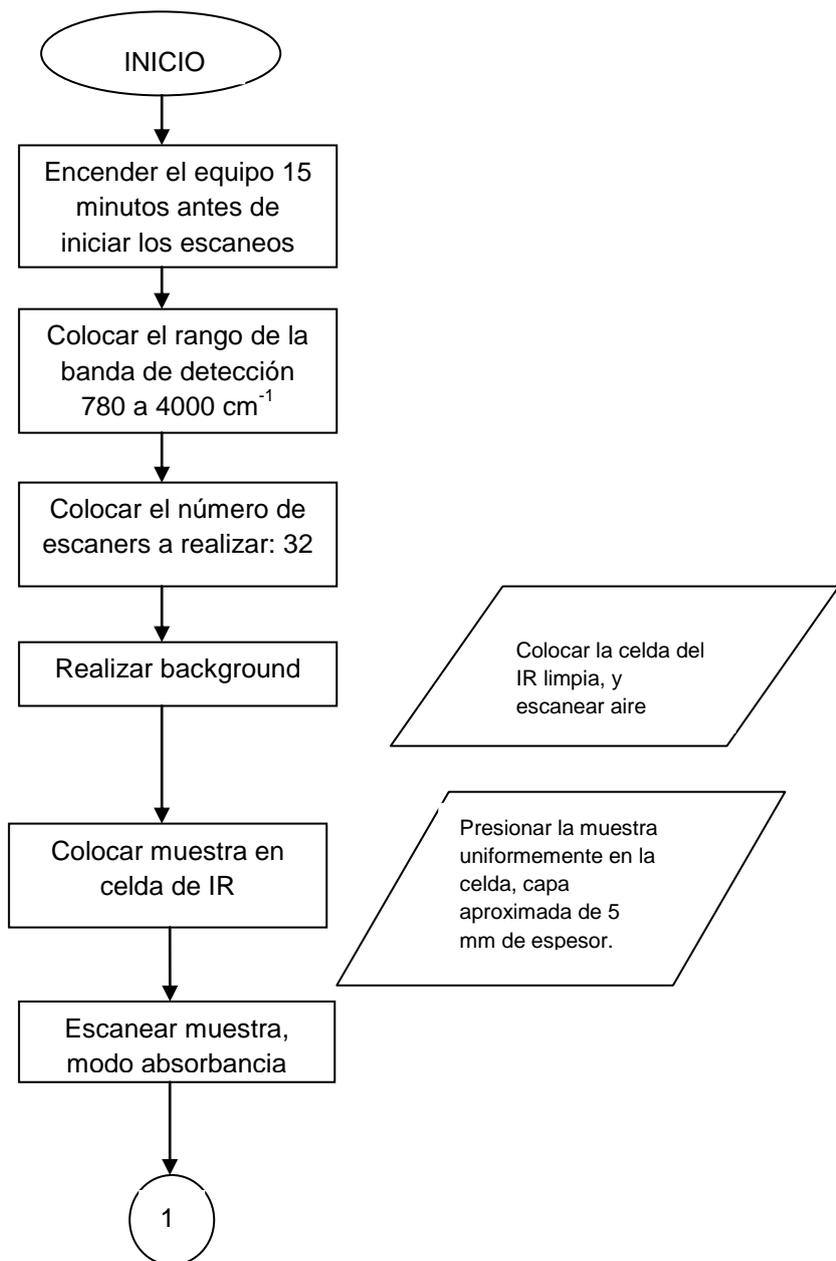
Con Compact Dry EC (E. coli/Coliformes) se pueden detectar y distinguir coliformes y E. coli. El medio contiene dos sustratos enzimáticos cromógenos: Magenta-GAL y X-Glucoronido. De esta manera los coliformes denotan una coloración roja, mientras que la de los E.coli es azul. Sumando las colonias rojas y azules resulta la cifra total del grupo coliforme (Nissui, 2005).

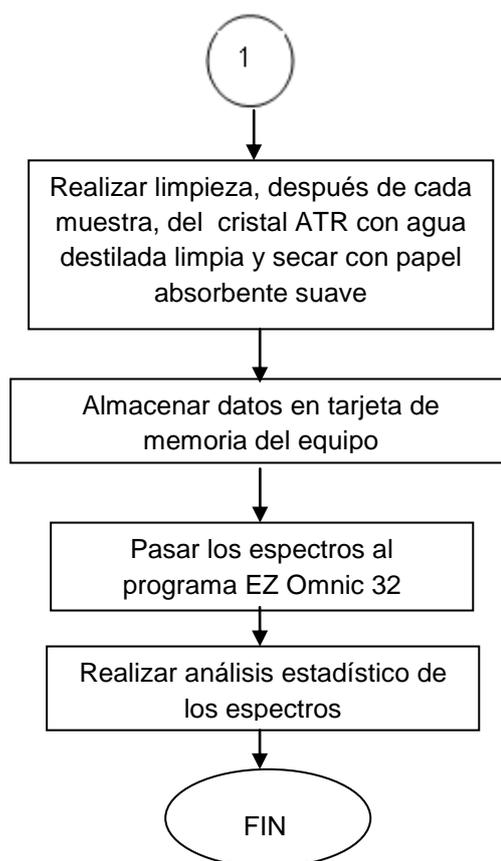
1.4.2 Análisis de Espectros

Para realizar el análisis de espectros de las muestras de carne de cerdo y pollo, se utilizó un espectrofotómetro de Infrarrojo en el rango medio (MIR), marca Thermo Nicolet FT-IR 100 con aditamento ATR de Selenito de Zinc (ZnSe), se encuentra conectado a un PC equipado con un software EZ-Omnice 32.

Los espectros de las muestras se escanearon 32 veces en la región 780 a 4000 cm^{-1} , a un intervalo de 2 cm^{-1} .

A continuación se detalla a través de un diagrama de flujo el método de análisis en el FT-IR:





1.4.2.1 Pre procesamiento de los datos

De acuerdo a Da-Wen Sun (2009), el objetivo principal del pre-procesamiento es transformar los datos de tal manera que las señales (multivariante) se adhieran mejor a la ley de Beer, que establece que la absorbancia y la concentración están correlacionados linealmente:

$$A = \epsilon l c$$

Las técnicas de procesamiento están diseñadas para compensar las desviaciones de las relaciones lineales como dispersión de partículas, factores de interferencia, interacciones moleculares, refracción de concentraciones altas, grosor de las muestras, y muchas más, por lo tanto estas técnicas mejoraran la relación lineal entre las señales espectrales y las concentraciones del analito.

Para realizar el pre procesamiento de los datos se tomaron en cuenta algunas de las técnicas que se revisan a continuación y que se encuentran formando parte de dos grandes grupos: los que utilizan directamente los valores de referencia disponibles para la operación de pre-procesamiento, y los que no lo hacen (técnicas independientes).

Las técnicas de referencia independientes además se pueden dividir en dos subgrupos: métodos de corrección de dispersión y los métodos de derivación. Métodos de corrección de dispersión incluyen: la señal de corrección multiplicativa (MSC), también conocida como corrección de dispersión multiplicativo (incluyendo el MSC extendida, inversa MSC, extendida inversa MSC y de tendencias), variable aleatoria normal estándar (SNV) de escala, la normalización y corrección de línea base. Los métodos de derivación incluye las siguientes técnicas: diferencia finita, Savitzky-Golay y Norris-Williams.

Para el caso del análisis de la base de datos de los espectros se realizaron los siguientes pre tratamientos:

La **suavización según Savitzky-Golay**, está basado en el cálculo de una regresión polinomial local (de grado k), con al menos $k+1$ puntos equiespaciados, para determinar el nuevo valor de cada punto. El resultado será una función similar a los datos de entrada, pero suavizada.

Con este método se obtienen máximos y mínimos relativos, así como también se preservan los anchos de los picos, que se pueden perder con otras técnicas de derivación.

En **Baseline Correction** (Da-Wen Sun, 2009) que es la técnica de corrección de línea de base más común usado en NIR (e IR) es la técnica de eliminar la tendencia introducido por Barnes et al. (1989). Utiliza el mismo principio que eliminar la tendencia, y la diferencia básica es que la instalación de la línea de base se realiza iterativamente. En primer lugar una línea de base de un polinomio de orden elegido se monta en el espectro de la muestra. A continuación, los puntos de medición se encuentran por encima de la línea base estimada se sustituyen por las predicciones de la línea de base ajustada. Este espectro de línea de base nueva (artificial) se ajusta entonces de nuevo con el mismo orden polinomio, y este procedimiento se repite hasta que se sustituyen y no hay nuevos puntos de muestra.

Se realizó también **Diferenciación**, que es la técnica más utilizada para calcular la derivada del espectro es la de Savitzky-Golay (SG) 1964, modificada por Steiner en 1972. Este metodo permite suavizar el espectro y no amplifica el ruido como el clásico de las diferencias finitas.

En la tecnica SG, cada espectro es seccionado en ventanas que contienen $2g+1$ puntos, g puntos antes y g puntos despues del centro. Estos puntos son aproximados con un polinomio de un cierto orden y sus coeficientes pueden utilizarse para recalculer el espectro suavizado o para el espectro diferenciado.

El cálculo es rápido porque los coeficientes del polinomio no cambian de una ventana a la otra cuando las longitudes de onda son equidistantes. El mismo vector de coeficientes puede ser utilizado para todo el espectro menos los dos sets iniciales y finales. Los coeficientes, dependiendo del ancho de la ventana son tabulados.

Se pueden calcular fácilmente invirtiendo la matriz C:

$$C = \begin{bmatrix} 1 & -g & \dots & (-g)^i \\ 1 & -(g-1) & \dots & [-(g-1)]^i \\ \dots & \dots & 0 & \dots \\ 1 & g-1 & \dots & (g-1)^i \\ 1 & g & \dots & g^i \end{bmatrix}$$

i es el orden del polinomio

Se aplicó **Estándar normal variate (SNV)**, donde la ecuación básica para SNV es la misma que se utiliza para MSC (multiplicative signal correction), la ecuación de Barnes et al, 1999.

$$X_{\text{corr}} = \frac{X_{\text{org}} - a_0}{a_1}$$

Para la técnica SNV a_0 es el valor promedio del espectro, mientras a_1 es la desviación estándar del espectro.

En espectroscopia se utilizan prácticamente dos tipos de normalizaciones:

Taxicab norm:

$$a_1 = \sum_{m=1}^M |x_{\text{org},m}|$$

Euclidean norm:

$$a_1 = \sqrt{\sum_{m=1}^M x_{\text{org},m}^2}$$

Esta técnica se utiliza para reducir los efectos multiplicativos de la dispersión y tamaño de la partícula y para reducir las diferencias en las intensidades de las señales globales. Tiene como objetivo dar el mismo peso a cada señal por

corrección de las diferencias en la intensidad global (Zeiter M, and Rutledge D, cop, 2009)

1.5 Análisis estadístico

Para el estudio realizado se utilizó el método de clasificación KNN combinado con algoritmos genéticos y una validación externa de los datos.

1.5.1 Método de clasificación KNN (K-nearest neighbors)

Es un método de clasificación no paramétrico, que utiliza para la clasificación el concepto de analogía. El método se basa en la elección de una distancia (generalmente la distancia Euclideana) y en la elección del número entero de k entorno, el cual se extiende a la evaluación de las clases a las que pertenecen los objetos considerados a clasificar.

El algoritmo en el cual se basa el método K-NN está definido por la escalada de los datos, la selección de la distancia a utilizar, elección del número de entorno k útil para la clasificación, cálculo de la matriz de la distancia, para cada objeto se considera el objeto k más cercano y el objeto viene asignado a la clase más representativa en k más cercano.

El modelo matemático no forma un verdadero y propio modelo matemático, es decir una función analítica aplicada sucesivamente al objeto incógnita de clasificación. El modelo KNN está constituido del mayor valor de k encontrado, de la medida utilizada y de todos los datos pertenecientes al training set. La predicción de la clase por un nuevo objeto se realiza en función del objeto k más cercano perteneciente al training set (Todeschini, 1998)

1.5.2 Método de Algoritmos genéticos

Un algoritmo genético es un método de búsqueda que imita la teoría de la evolución genética de Darwin para la resolución de problemas.

Con este método se alcanza la numerosidad con una técnica similar a la de la selección natural: Se seleccionan un cierto número de subconjunto al azar y se construyen los modelos, determinando cual combinación (CROMOSOMA) es la mejor, luego se procede a la fase evolutiva combinando los cromosomas y mudándolos, para cada nuevo cromosoma se calcula la bondad del modelo, se desechan los cromosomas malos y se sigue combinando o mutando los mejores hasta alcanzar el nivel de bondad requerido (Todeschini, 1998)

1.5.3 Validación cruzada (cross validation)

Es una técnica utilizada para evaluar los resultados de un análisis estadístico y garantizar que son independientes de la partición entre datos de entrenamiento y prueba. Consiste en repetir y calcular la media aritmética obtenida de las medidas de evaluación sobre diferentes particiones. Se utiliza en entornos donde el objetivo principal es la predicción y se quiere estimar cómo de preciso es un modelo que se llevará a cabo a la práctica.

La validación cruzada proviene de la mejora del método de retención o holdout method. Este consiste en dividir en dos conjuntos complementarios los datos de muestra, realizar el análisis de un subconjunto (denominado datos de entrenamiento o training set), y validar el análisis en el otro subconjunto (denominado datos de prueba o test set), de forma que la función de aproximación sólo se ajusta con el conjunto de datos de entrenamiento y a partir de aquí calcula los valores de salida para el conjunto de datos de prueba (valores que no ha analizado antes). La ventaja de este método es que es muy rápido a la hora de computar. (Stuart, 2004)

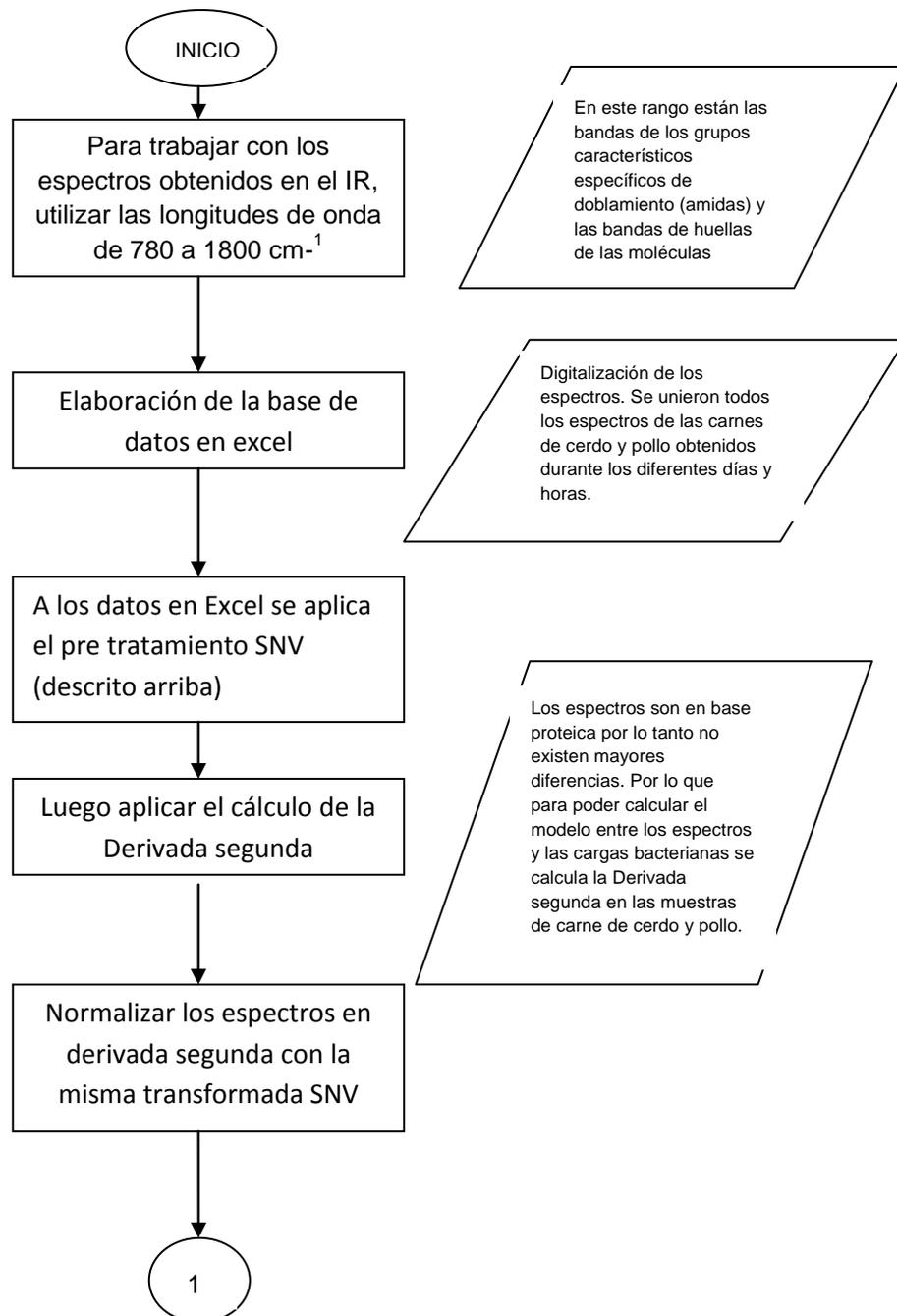
1.5.4 Validación Externa (test set)

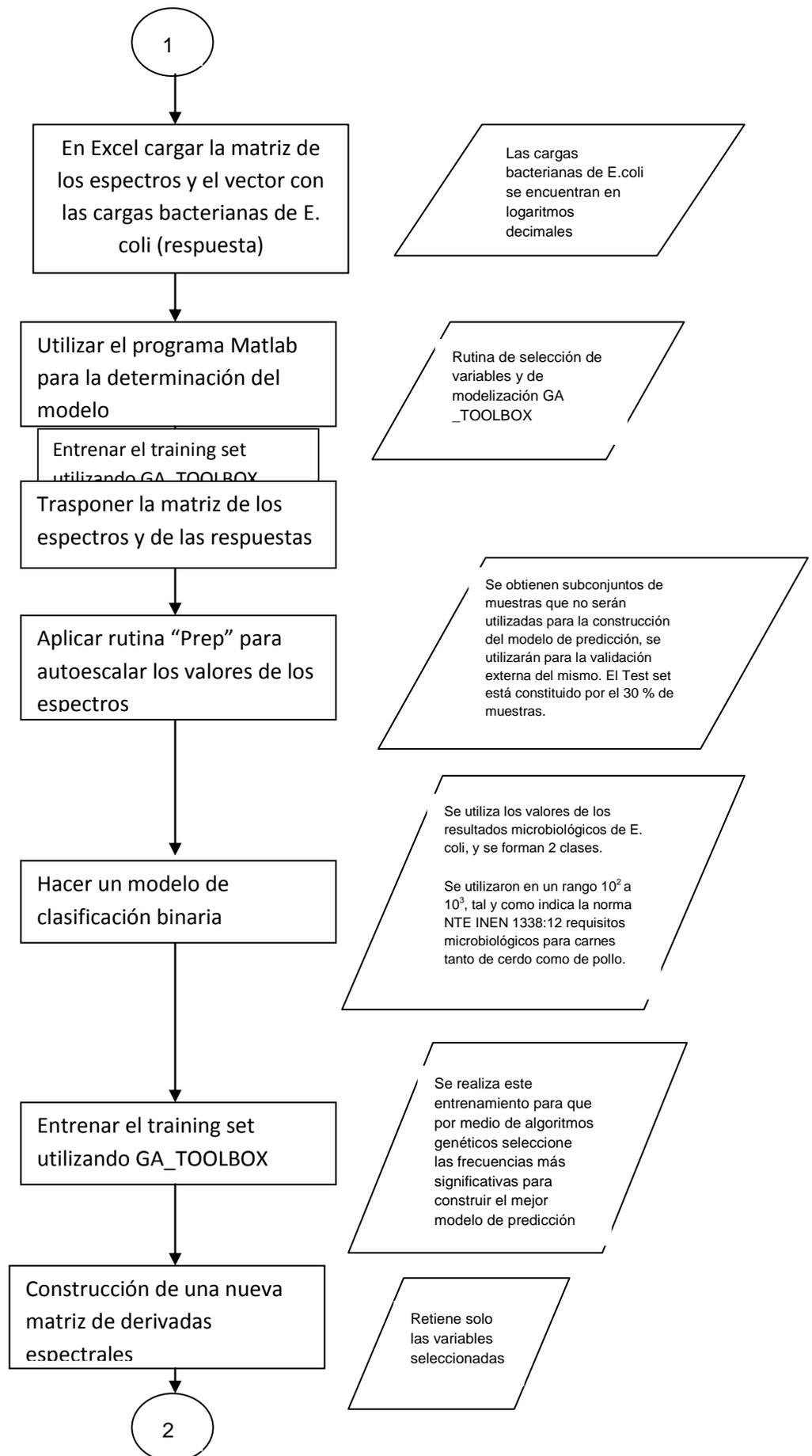
En muchos de los procedimientos se han desarrollado análisis de regresión, fue uno de los primeros enfoques a ser desarrollados. Los datos utilizados para construir o descubrir una relación predictiva se denominan datos de entrenamiento conjunto. La mayoría de los enfoques que se busca a través de los datos de formación de relaciones empíricas tienden a sobreajustar los datos, lo que significa que se pueden identificar las relaciones aparentes en los datos de entrenamiento que no se sostienen en general. Un equipo de prueba es un conjunto de datos que es independiente de los datos de entrenamiento, pero que sigue la misma distribución de probabilidad como los datos de entrenamiento. Si un modelo de ajuste para el conjunto de entrenamiento también se ajusta a la prueba se establece que un sobreajuste mínimo ha tenido lugar. Si el modelo se ajusta el conjunto de entrenamiento mucho mejor de lo que se ajusta a la prueba de conjunto, es probable que la causa se sobreajuste.

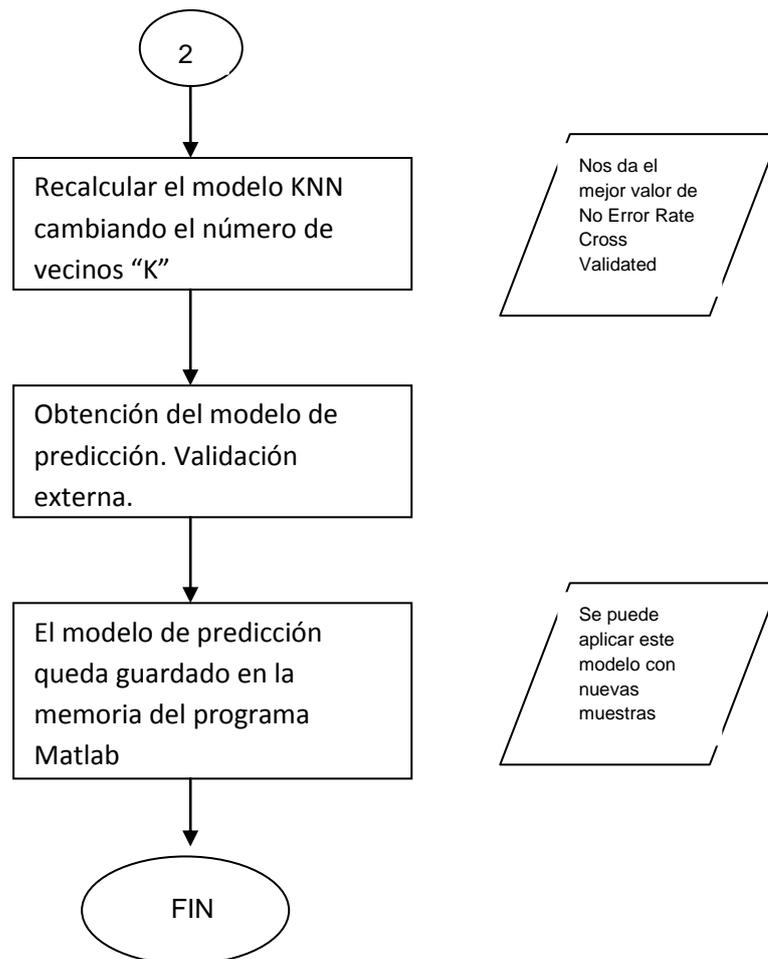
Con el fin de evitar sobreajustes, cuando cualquier parámetro de clasificación necesita ser ajustada, es necesario tener un conjunto de validación, además de los conjuntos de entrenamiento y prueba. (Cohen et al, 2007)

1.6 Modelo de Predicción

Una vez determinados cuales fueron las técnicas utilizadas en el pre tratamiento de los espectros se realizaron los siguientes pasos para obtener el modelo de predicción.







Los métodos de clasificación son métodos que tienen el objetivo de construir, sobre la base de un número de variables independientes (descriptores), un modelo capaz de identificar la clase a la que pertenece cada uno de los objetos. Además los métodos de regresión se utilizan para identificar una relación funcional entre las variables independientes y una respuesta cuantitativa, los métodos de clasificación buscan una relación entre las variables independientes y una respuesta cualitativa (clase). La condición necesaria para que métodos de clasificación sean aplicables es que las clases se definan de antemano y que cada objeto en el conjunto de entrenamiento se asigne a una de las clases definidas (Todeschini, 1998).

Para este estudio se utilizaron 2 clases, las cuales serán revisadas en el siguiente capítulo y en la discusión.

CAPITULO II

RESULTADOS

Los resultados obtenidos aplicando los métodos descritos en el capítulo anterior son los siguientes:

2.1 Análisis microbiológico:

Como se indico anteriormente se realizaron los análisis microbiológicos de Contaje total (mesófilos totales) y bacterias coliformes (coliformes totales y E. coli) en las muestras de carne molida de pollo y cerdo. Se realizaron estos análisis porque son parte de los requisitos de la norma NTE INEN 1338:12 para carnes y productos cárnicos.

No se realizaron análisis de Staphylococcus aureus y Salmonella, ya que E. coli es la bacteria que es endémica en carnes de pollo y cerdo y produce mayor contaminación bacteriana en alimentos crudos y como se explicó en la Introducción, es la responsable de muchas enfermedades y pérdidas económicas en el procesamiento de cárnicos debido a su alto potencial de infección así como de deterioro.

Tabla 1. Resultados de los análisis microbiológicos en las muestras de carne de cerdo

Número de muestreo	Contaje Total en Placa (UFC/gr)					
	Mesófilos Totales		Coliformes Totales		Coliformes Fecales (E.coli)	
	Base 10	Logaritmica	Base 10	Logaritmica	Base 10	Logaritmica
1	200	2,301029996	20	1,301029996	10	1
2	600	2,778151255	300	2,477121255	50	1,698970004
3	1800	3,255272505	500	2,698970004	120	2,079181246
4	2500	3,397940009	1200	3,079181246	190	2,278753601
5	5000	3,698970004	2500	3,42422509	280	2,447158031
6	8000	3,903089987	3000	3,477121255	370	2,568201724
7	14000	4,146128036	7000	3,84509804	500	2,698970004
8	25000	4,397940009	10000	4,000000000	890	2,949390007
9	52000	4,716003344	16000	4,204119983	1600	3,204119983
10	80000	4,903089987	20000	4,301029996	2700	3,431363764
11	120000	5,079181246	78000	4,892094603	3500	3,544068044
12	175000	5,243038049	95000	4,97723605	4500	3,653212514
13	240000	5,380211242	110000	5,041392685	10000	4
14	480000	5,681241237	250000	5,397940009	23000	4,361727836
15	850000	5,929418926	460000	5,662757832	48000	4,681241237
16	1200000	6,079181246	780000	5,892094603	76000	4,880813592
17	2500000	6,397940009	890000	5,949390007	120000	5,079181246
18	3600000	6,556302501	2600000	6,414973348	250000	5,397940009
19	5600000	6,748188027	3400000	6,531478917	68000	4,832508913
20	8900000	6,949390007	4500000	6,653212514	1400000	6,146128036
21	13000000	7,113943352	6000000	6,778151255	1400000	6,146128036
22	28000000	7,447158031	8000000	6,778151255	1400000	6,146128036
23	56000000	7,748188027	6000000	6,778151255	1400000	6,146128036
24	300000000	8,477121255	6000000	6,778151255	1400000	6,146128036
25	2400000000	9,380211242	6000000	6,778151255	1400000	6,146128036
26	2500000000	9,397940009	6000000	6,778151255	1400000	6,146128036
27	20	1,301029996	10	1	10	1
28	300	2,477121255	150	2,176091259	100	2
29	1200	3,079181246	500	2,698970004	100	2,176091259
30	5000	3,698970004	1000	3	300	2,477121255
31	8000	3,903089987	1900	3,278753601	500	2,698970004
32	10000	4	3000	3,477121255	900	2,954242509
33	300	2,477121255	100	2	20	1,301029996
34	800	2,903089987	500	2,698970004	200	2,301029996
35	2000	3,301029996	900	2,954242509	500	2,698970004
36	4900	3,69019608	1500	3,176091259	1200	3,079181246
37	6300	3,799340549	3000	3,477121255	2800	3,447158031
38	12000	4,079181246	7000	3,84509804	5000	3,698970004
39	250	2,397940009	120	2,079181246	80	1,903089987
40	600	2,778151255	400	2,602059991	230	2,361727836
41	3000	3,477121255	1800	3,255272505	950	2,97723605
42	5000	3,698970004	3000	3,477121255	2900	3,462397998
43	50	1,698970004	20	1,301029996	20	1,301029996
44	300	2,477121255	170	2,230448921	100	2
45	1000	3	860	2,934498451	480	2,681241237
46	1800	3,255272505	1000	3	870	2,939519253
47	3600	3,556302501	2700	3,431363764	2000	3,301029996
48	7000	3,84509804	5000	3,698970004	3500	3,544068044
49	200	1,301029996	50	1,698970004	20	1,301029996
50	630	2,799340549	200	2,301029996	90	1,954242509
51	1400	3,146128036	980	2,991226076	700	2,84509804
52	3500	3,544068044	2700	3,431363764	1800	3,255272505
53	6800	3,832508913	3900	3,591064607	2600	3,414973348
54	9000	3,954242509	5000	3,698970004	3900	3,591064607
55	300	2,477121255	100	2	30	1,477121255
56	2300	3,361727836	400	2,602059991	260	2,414973348
57	4600	3,662757832	2500	3,397940009	1000	3
58	6500	3,812913357	4800	3,681241237	2300	3,361727836
59	8900	3,949390007	5600	3,748188027	4900	3,69019608
60	12000	4,079181246	7000	3,84509804	6200	3,792391689
61	300	2,477121255	150	2,176091259	50	1,698970004
62	800	2,903089987	300	2,477121255	160	2,204119983
63	1700	3,230448921	900	2,954242509	700	2,84509804
64	2600	3,414973348	2000	3,301029996	1400	3,446128036
65	4500	3,653212514	4000	3,602059991	2000	3,301029996
66	7000	3,84509804	5800	3,763427994	2300	3,361727836
67	12500	4,096910013	8500	3,929418926	3800	3,579783597
68	18000	4,255272505	10000	4	6000	3,778151255

Tabla 2. Resultados de los análisis microbiológicos en las muestras de carne de pollo

Numero de muestra	Contaje Total en Placa (UFC/gr)						
	Mesofilos Totales		Coliformes Totales		Coliformes Fecales (E.coli)		
	Base 10	Base Logaritmica	Base 10	Base Logaritmica	Base 10	Base Logaritmica	
1	200	2,301029996	50	1,698970004	20	1,301029996	
2	900	2,954242509	180	2,255272505	80	1,903089987	
3	3000	3,477121255	1000		3	2,397940009	
4	150	2,176091259	20	1,301029996	10	1	
5	600	2,77815125	200	2,301029996	80	1,903089987	
6	2500	3,397940009	600	2,77815125	300	2,477121255	
7	5000	3,698970004	2800	3,447158031	500	2,698970004	
8	7500	3,875061263	5000	3,698970004	1000	3	
9	12000	4,079181246	8000	3,903089987	2500	3,397940009	
10	25000	4,397940009	10000		4	3,653212514	
11	38000	4,579783597	18000	4,255272505	8500	3,929418926	
12	90000	4,954242509	25000	4,397940009	12000	4,079181246	
13	125000	5,096910013	36000	4,556302501	20000	4,301029996	
14	100		2	50	1,698970004	20	1,301029996
15	500	2,698970004	300	2,477121255	100	2	
16	2600	3,414973348	700	2,84509804	300	2,477121255	
17	3700	3,568201724	2000	3,301029996	600	2,77815125	
18	4800	3,681241237	3600	3,556302501	1500	3,176091259	
19	7000	3,84509804	5000	3,698970004	3500	3,544068044	
20	9000	3,954242509	7500	3,875061263	5000	3,698970004	
21	15000	4,176091259	12000	4,079181246	6800	3,832508913	
22	21000	4,322219295	18000	4,255272505	8000	3,903089987	
23	100		2	80	1,903089987	30	1,477121255
24	400	2,602059991	350	2,544068044	150	2,176091259	
25	1800	3,255272505	850	2,929418926	420	2,62324929	
26	2900	3,462397998	2700	3,431363764	1800	3,255272505	
27	4500	3,653212514	4200	3,62324929	2900	3,462397998	
28	300	2,477121255	120	2,079181246	50	1,698970004	
29	1500	3,176091259	450	2,653212514	200	2,301029996	
30	3800	3,579783597	2500	3,397940009	1800	3,255272505	
31	5900	3,770852012	3800	3,579783597	3200	3,505149978	
32	8700	3,939519253	5000	3,698970004	7600	3,880813592	
33	200	2,301029996	80	1,903089987	20	1,301029996	
34	800	2,903089987	200	2,301029996	150	2,176091259	
35	2800	3,447158031	1200	3,079181246	300	2,477121255	
36	5000	3,698970004	2900	3,462397998	1500	3,176091259	
37	8300	3,919078092	4200	3,62324929	2800	3,447158031	
38	15000	4,176091259	7000	3,84509804	3900	3,591064607	
39	28000	4,447158031	10000		4	4500	3,653212514
40	45000	4,653212514	15000	4,176091259	6900	3,838849091	
41	60000	4,77815125	21000	4,322219295	8000	3,903089987	
42	100000		5	32000	4,505149978	15000	4,176091259
43	180000	5,255272505	40000	4,602059991	21000	4,322219295	
44	210000	5,322219295	68000	4,832508913	28000	4,447158031	
45	290000	5,462397998	76000	4,880813592	32000	4,505149978	
46	100		2	80	1,903089987	50	1,698970004
47	800	2,903089987	300	2,477121255	150	2,176091259	
48	5000	3,698970004	3000	3,477121255	300	2,477121255	
49	18000	4,255272505	7000	3,84509804	500	2,698970004	
50	300000	5,477121255	15000	4,176091259	1000	3	
51	200	2,301029996	100		2	40	1,602059991
52	600	2,77815125	500	2,698970004	200	2,301029996	
53	8000	3,903089987	2500	3,397940009	300	2,477121255	
54	15000	4,176091259	5600	3,748188027	800	2,903089987	
55	250000	5,397940009	18000	4,255272505	1500	3,176091259	
56	400000	5,602059991	25000	4,397940009	1600	3,204119983	
57	50	1,698970004	20	1,301029996	10	1	
58	900	2,954242509	400	2,602059991	200	2,301029996	
59	3000	3,477121255	2500	3,397940009	500	2,698970004	
60	15000	4,176091259	8000	3,903089987	900	2,954242509	
61	200	2,301029996	120	2,079181246	30	1,477121255	
62	1000		3	300	2,477121255	180	2,255272505
63	2800	3,447158031	1500	3,176091259	500	2,698970004	
64	5900	3,770852012	4900	3,69019608	1200	3,079181246	
65	8700	3,939519253	6000	3,77815125	2900	3,462397998	
66	15000	4,176091259	10000		4	4000	3,602059991
67	300000	5,477121255	260000	5,414973348	250000	5,397940009	
68	380000	5,579783597	300000	5,477121255	320000	5,505149978	
69	420000	5,62324929	410000	5,612783857	400000	5,602059991	
70	460000	5,662757832	520000	5,716003344	480000	5,681241237	
71	500000	5,698970004	630000	5,799340549	560000	5,748188027	

2.2 Resultados del modelo de predicción:

Para determinar el mejor modelo de predicción para la carne de cerdo y pollo, se consiguieron los espectros FT-IR, los cuales como se comentó en el capítulo anterior fueron sometidos a los pre tratamientos de suavización, corrección de la línea de base, derivada segunda y SNV, para poder obtener espectros que puedan ser fácilmente digitalizados y auto escalados.

Con el método de algoritmos genéticos para la construcción del modelo de predicción, se puede seleccionar las longitudes de onda que nos va a permitir obtener la mejor clasificación K-NN. Se determinaron las bandas que fueron seleccionadas por el modelo para las muestras de cerdo y pollo, y las cuales nos indican a que rango en el espectro pertenecen. Ver Tabla 3 y tabla 11.

Se obtuvieron también la tasa de éxito de clasificación, el NER CV (no error rate cross validated) o la tasa de no Error, con validación cruzada para el training set. Tabla 4 y 12.

Gráficamente se puede observar la tasa de éxito de clasificación del modelo en relación a las variables. Se determinó que al aumentar el número de variables la tasa de éxito disminuye considerablemente. Para carne de cerdo ver figura 5, para carne de pollo ver figura 7.

En las tablas 7 y 15 se encuentran la matriz de confusión para las muestras de carne, nos indican los resultados de la clasificación. En esta matriz las filas representan las clases verdaderas o clases de objetos que pertenecen al conjunto de entrenamiento, mientras que las columnas representan las clases asignadas a los objetos después de la aplicación de una técnica de clasificación de clases o clases calculadas anteriormente por medio del training set.

Los parámetros de calidad del modelo de clasificación se pueden obtener a partir de la matriz de confusión del training set, estos se dan para cada una de las clases y son: precisión, sensibilidad y especificidad. Ver tablas 8 y 16.

La precisión: viene dada por la concordancia entre los resultados de sucesivas mediciones de la misma muestra, llevada a cabo bajo ciertas condiciones.

La sensibilidad: define la capacidad de una clase para representar objetos de esa clase.

La especificidad: define la capacidad de una clase de aislar de las otras clases de los objetos de esa clase, es decir, su grado de pureza.

Los resultados del Test Set, que es la validación externa del modelo y el cual nos da la tasa de error real que se puede llegar a obtener cuando este modelo de predicción se utilice para analizar muestras nuevas. Las tablas 9,10 y 17, 18 muestran los parámetros de calidad y la matriz de confusión del modelo para cerdo y pollo.

2.2.1 Resultados de los Análisis de los datos de las muestras de cerdo.

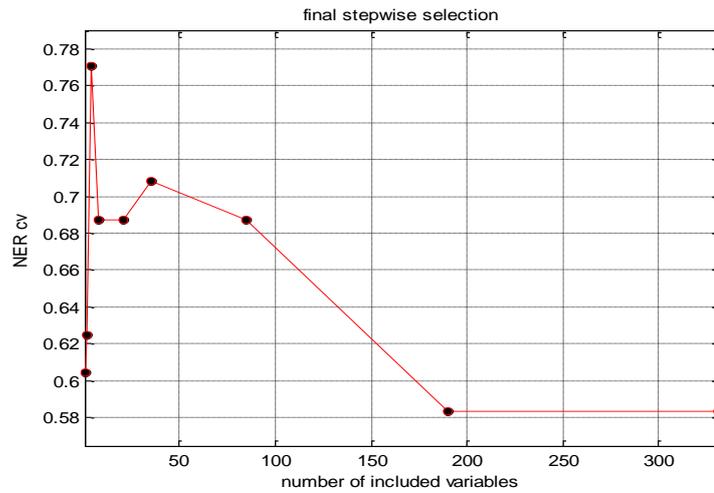


Tabla 5. Resultados del Training set para carne de cerdo

No	cm ⁻¹				Clase verdadera
	1557	1559	901	1663	
	1	2	3	4	
1	-0,46342106	-0,57728191	-0,21190302	-0,29863105	1
2	-1,27331649	-1,54835238	0,22887844	0,15431121	1
3	-0,19937836	-0,20428796	1,57715116	-2,78981344	1
4	0,5532667	0,52883809	1,6290078	-0,97804443	1
5	-0,23269216	-0,3200447	-0,16868915	-0,14765029	1
6	1,08381977	1,00472693	1,0672275	-2,18589044	2
7	0,04739051	-0,03708377	0,51408998	-0,60059255	2
8	0,38052849	0,40021949	-0,13411806	0,15431121	2
9	2,13258748	2,22660369	0,35852005	0,98470534	2
10	0,54092825	0,34877205	-0,25511689	0,07882083	2
11	0,44222071	0,2973246	0,29802063	-0,67608292	2
12	0,65197425	0,60600926	-0,26375966	0,68274384	2
13	2,65080211	2,81824927	-0,70454113	1,58862835	2
14	0,44222071	0,36163391	-0,16868915	0,30529196	2
15	-0,09820312	-0,06280749	1,57715116	-0,52510217	2
16	-0,32646433	-0,38435401	0,39309115	-0,97804443	2
17	0,24480561	0,14298228	-0,05633309	-0,14765029	2
18	0,60262047	0,67031856	-0,20326025	0,22980158	2
19	-0,81136516	-0,97214103	0,55730385	-1,28000593	2
20	-1,57881636	-1,43516801	-1,22310756	1,36215722	1
21	-2,05261259	-1,62938211	-3,64308422	0,38078234	1
22	-2,19820623	-1,9604464	-2,99297478	-0,07215992	1
23	-1,4825765	-1,25896052	-1,00703821	-0,07215992	1
24	-0,51524252	-0,50011075	-0,17733192	0,15431121	1
25	-0,17099994	-0,12711679	-0,75639777	1,06019572	1
26	-1,60842862	-1,52777341	-0,9119677	0,75823421	2
27	-0,14879074	0,06581111	-0,12547528	-0,29863105	2
28	-0,46342106	-0,57728191	-0,21190302	-0,29863105	1
29	-1,15967943	-1,41201666	0,11652238	0,53176309	1
30	-1,27331649	-1,54835238	0,22887844	0,15431121	1
31	-0,19937836	-0,20428796	1,57715116	-2,78981344	2
32	0,5532667	0,52883809	1,6290078	-0,97804443	2
33	-0,23269216	-0,3200447	-0,16868915	-0,14765029	1
34	0,49157448	0,42594321	-0,47118623	1,13568609	1
35	1,08381977	1,00472693	1,0672275	-2,18589044	1
36	0,04739051	-0,03708377	0,51408998	-0,60059255	2
37	0,70132802	0,82466089	1,2660113	1,13568609	2
38	-0,16483072	-0,24287354	-0,50575733	0,45627271	1
39	2,13258748	2,22660369	0,35852005	0,98470534	1
40	0,44222071	0,2973246	0,29802063	-0,67608292	2
41	0,25714405	0,20729158	0,23752122	-0,52510217	2
42	1,24421954	1,09475996	0,44494779	-0,82706367	2
43	0,65197425	0,60600926	-0,26375966	0,68274384	1
44	2,65080211	2,81824927	-0,70454113	1,58862835	1
45	0,44222071	0,36163391	-0,16868915	0,30529196	1
46	-0,09820312	-0,06280749	1,57715116	-0,52510217	2
47	0,24480561	0,14298228	-0,05633309	-0,14765029	2
48	-0,81136516	-0,97214103	0,55730385	-1,28000593	2

Tabla 6. Resultados del Test set para carne de cerdo

No	cm ⁻¹				Clase Verdadera	Clase predecida
	1557	1559	901	1663		
1	0,02271362	0,18156786	1,80186328	-0,29863105	1	2
2	-1,15967943	-1,41201666	0,11652238	0,53176309	1	1
3	0,49157448	0,42594321	-0,47118623	1,13568609	1	1
4	0,70132802	0,82466089	1,2660113	1,13568609	2	2
5	-0,16483072	-0,24287354	-0,50575733	0,45627271	2	2
6	0,25714405	0,20729158	0,23752122	-0,52510217	2	2
7	1,24421954	1,09475996	0,44494779	-0,82706367	2	2
8	0,40520537	0,79893717	-1,68981734	2,41902248	1	1
9	-1,2066889	-1,09818727	-1,16260814	1,58862835	1	1
10	-0,86071894	-0,90525936	-0,21190302	0,22980158	1	1
11	-0,20678143	-0,10139307	-0,93789602	1,28666684	2	1
12	-0,47452565	-0,30718284	-0,52304288	1,28666684	2	1
13	-1,50972107	-1,22166113	-0,79961164	-0,29863105	1	1
14	-1,76389301	-1,61523406	-1,56017573	0,15431121	1	1
15	-0,14879074	0,06581111	-0,12547528	-0,29863105	1	2
16	0,02271362	0,18156786	1,80186328	-0,29863105	1	2
17	0,38052849	0,40021949	-0,13411806	0,15431121	2	2
18	0,54092825	0,34877205	-0,25511689	0,07882083	2	2
19	-0,32646433	-0,38435401	0,39309115	-0,97804443	2	2
20	0,60262047	0,67031856	-0,20326025	0,22980158	2	2

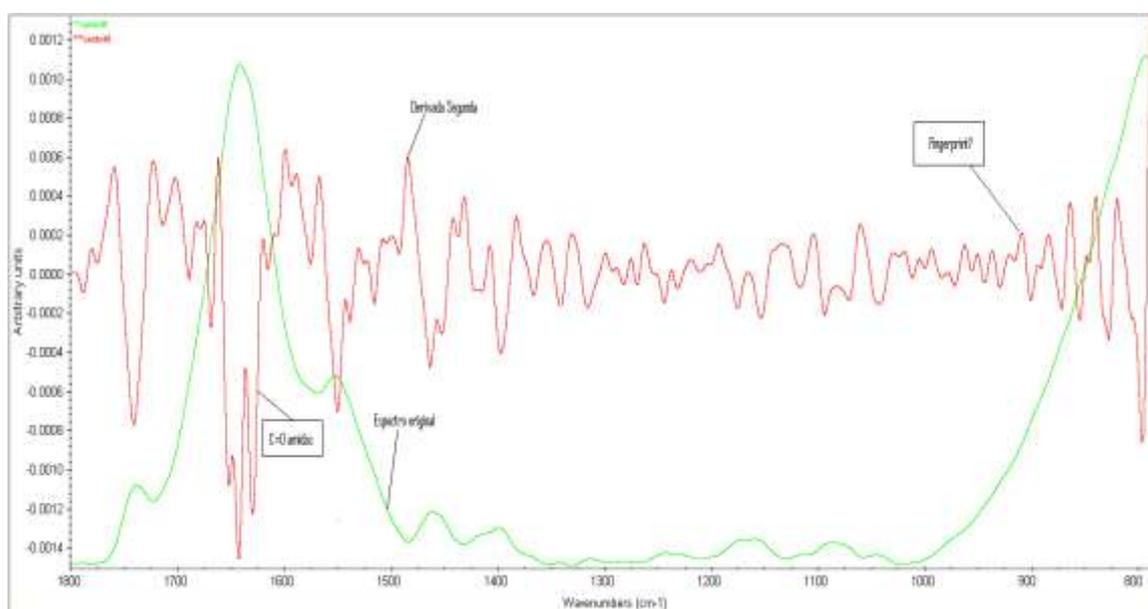


Figura 6. Espectros FT-IR de la muestra de carne de cerdo, en ella se puede observar en color verde la onda del espectro original, de color rojo el espectro tratado con derivada segunda. Además se visualiza la región donde se encuentran las amidas (C=O) a una longitud de onda de aproximadamente 1667 cm⁻¹ y las zona donde se encuentran localizadas las ondas (901 cm⁻¹) de las huellas (fingerprint) de este espectro y que fue clasificado por el algoritmo.

Tabla 7. Matriz de confusión para carne de cerdo

Clase verdadera	External Predicted Class		
	N	1	2
1	22	12	10
2	26	13	13
	48	25	23

Tabla 8. Parámetros de calidad para el training set de carne de cerdo

	Clase1	Clase2
Prec	0,48	0,56521739
Sens	0,54545455	0,5
Spec	0,5	0,54545455

NER: 0,5208

Tabla 9. Parámetros de calidad del modelo para el Test set para carne de cerdo

	Clase1	Clase2
Prec	0,875	0,27272727
Sens	0,7	0,88888889
Spec	0,88888889	0,7

NER: 0,7894

Tabla 10. Matriz de confusión del Test set para carne de cerdo

Clase verdadera	External Predicted Class		
	N	1	2
1	10	7	3
2	9	1	8
	19	8	11

2.2.2 Resultados de los Análisis de los datos de las muestras de pollo.

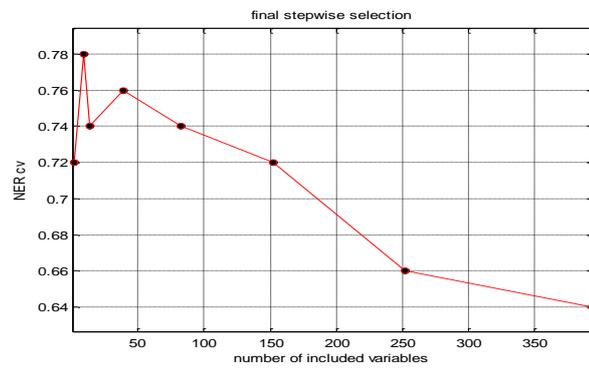


Figura 7. Calidad del modelo en función del número de variables para la carne de pollo

Tabla 11. Bandas seleccionadas por el algoritmo genético para carne de pollo

Nº	Longitud de onda Seleccionada (cm ⁻¹)
1	1255
2	1475
3	895
4	939
5	1017
6	1119
7	1121
8	1203
9	1671

Tabla 12. Parámetros de calidad del modelo de predicción para el training set de carne de pollo

No de objetos en el training set	No variables escogidas	NER CV
50	9	0.78

Tabla 13. Resultados del Training set para carne de pollo

No	cm ⁻¹									Clase verdadera
	1255	1475	895	939	1017	1119	1121	1203	1671	
1	0,23850556	1,70690312	1,06015085	-0,47554916	-1,86685552	-2,10946665	-2,07050727	-1,9032306	-1,0392137	1
2	0,69166612	1,33241297	1,16345684	-1,96234504	-1,23453636	-1,36776342	-1,27270463	-1,18397912	-1,20057876	1
3	0,69166612	1,33241297	1,16345684	-1,96234504	-1,23453636	-1,36776342	-1,27270463	-1,18397912	-1,20057876	1
4	0,9182464	-2,07204302	-0,42548764	1,14848941	1,4212041	1,91798186	1,83147294	2,50218474	1,38126217	1
5	-0,83476946	-3,15295779	-2,82120269	1,13705252	1,92705943	0,33815399	0,32290066	1,60312039	2,67218264	1
6	-0,71551668	0,23447591	-1,05516223	-0,20106377	0,15656579	-0,84857117	-0,83753955	1,42330752	-1,20057876	2
7	-1,90804447	-0,04639171	-1,90128746	0,95406226	0,5991892	-0,92274149	-1,1276496	0,43433672	2,02672241	2
8	-1,43103335	-0,429393	-0,23363366	0,22210121	-0,34928954	2,22208018	2,30290177	0,34443029	-0,03068209	2
9	-0,11925278	0,85578913	0,68136223	-0,18962688	-1,17130445	-1,07108213	-1,05512209	-1,27388555	-0,35341221	1
10	3,31E-15	0,86430027	1,07982818	-0,61279186	-0,91837678	-1,2935931	-1,1276496	-0,73444694	-1,1602375	1
11	0,11925278	0,19192021	0,61249157	-0,38405403	-0,41252146	-1,21942278	-1,05512209	-0,3748212	0,13068297	1
12	-1,31178057	-0,53152668	-0,52879363	0,91975158	0,28302962	-1,14525246	-1,05512209	-0,55463407	-0,03068209	2
13	-0,35775834	0,54087695	0,83878088	0,01623716	-0,41252146	-1,44193375	-1,34523214	-0,46472763	-0,23238841	2
14	-1,19252779	0,06425311	-0,51895496	0,72532443	0,72565303	-1,07108213	-1,1276496	-1,00416625	-0,55511853	2
15	0,47701112	0,14936451	-0,20411767	-0,38405403	-0,53898529	-0,99691181	-0,98259458	-0,28491476	0,29204803	1
16	3,31E-15	0,43023213	-0,28774632	-0,10956864	-0,85514487	-1,66444471	-1,56281468	-0,01519545	-0,43409473	1
17	0,75129251	0,51534353	0,44031492	-0,65853943	-0,6022172	-0,77440084	-0,83753955	-1,18397912	0,41307182	2
18	1,12097613	0,56641037	0,83386154	-0,60135497	-0,79191295	0,11564302	0,25037315	-0,73444694	-0,19204715	1
19	0,72744195	0,36214301	0,59773357	0,40509147	-0,53898529	0,56066496	0,61301071	-1,09407268	0,17102423	2
20	2,07499836	2,07288214	1,67506744	-2,23683043	-1,48746403	-0,18103827	-0,11226442	-0,28491476	-0,79716612	2
21	1,41910807	1,68988084	1,48321347	-2,39694691	-1,42423211	-0,10686794	-0,11226442	-0,28491476	-0,87784865	2
22	-0,35775834	-0,61663808	-1,16830688	0,6338293	0,53595728	-0,77440084	-0,91006706	-0,43433672	0,45341309	1
23	-0,47701112	-0,56557124	0,24354161	-0,20106377	-0,15959379	-0,55188988	-0,69248452	-0,19500833	-0,15170588	1
24	-0,71551668	-0,88899456	-0,54355163	0,17635364	0,28302962	-0,18103827	-0,40237447	0,07471098	0,65511941	1
25	-0,47701112	-0,59110466	-0,62718028	0,39365458	0,28302962	-0,70023052	-0,91006706	-0,10510189	0,09034171	2
26	-0,35775834	-0,71026062	-0,79935693	0,91975158	0,53595728	-0,70023052	-0,69248452	0,07471098	0,00965918	2
27	-0,47701112	-0,6847272	-0,32710098	1,18280008	0,53595728	-0,18103827	-0,40237447	-0,28491476	0,7761432	2
28	-0,47701112	-0,65919378	-0,27298832	0,79394578	0,28302962	-0,6260602	-0,76501204	-0,01519545	-0,11136462	2
29	-1,19252779	-0,65068264	-0,93709824	0,72532443	0,2197977	-0,47771955	-0,5474295	-0,10510189	0,85682573	2
30	-1,66953891	-0,29321477	-0,4943583	1,04555739	1,16827644	-0,47771955	-0,47490198	-0,19500833	0,49375435	2
31	1,59798724	-0,83792722	-0,62226095	-1,13888886	2,19263348	0,56066496	0,17784563	-2,26285635	1,70399229	2
32	0,11925278	0,16638679	0,27797694	-0,25824823	-0,15959379	-0,18103827	-0,32984696	-0,19500833	-0,67614232	1
33	-0,35775834	-1,34008498	-1,03056557	1,06843117	1,67413177	1,15402754	1,19323082	0,34443029	-0,59545979	1
34	0,98979807	-0,40385958	0,57313691	-0,25824823	-0,03312996	0,41232431	0,46795569	0,52424316	-0,91818991	1
35	1,01364862	0,32809845	1,25692416	0,32503323	-0,09636188	0,85734625	0,97564828	1,06368177	-0,15170588	1
36	0,23850556	0,47278783	0,72563622	-0,13244242	-0,6022172	2,07373953	2,1941105	1,42330752	-1,64433267	1
37	-0,11925278	-0,02936943	0,92240953	0,01623716	-0,34928954	1,00568689	0,97564828	0,79396247	-1,846039	1
38	0,11925278	-0,01234715	0,29765427	-0,12100553	-0,09636188	1,15402754	1,12070331	0,43433672	0,2113655	2
39	0,11925278	0,47278783	0,14023563	0,22210121	-0,15959379	0,26398367	0,32290066	-0,01519545	-0,55511853	1
40	3,31E-15	-0,96559482	-0,85346959	0,69101375	1,48443602	0,56066496	0,46795569	0,34443029	0,2113655	1
41	-2,26580281	-0,08894741	0,11071963	1,17136319	-0,66544912	0,85734625	0,46795569	1,33340108	-0,83750738	1
42	0,11925278	0,16638679	0,27797694	-0,25824823	-0,15959379	-0,18103827	-0,32984696	-0,19500833	-0,67614232	1
43	-0,35775834	-1,34008498	-1,03056557	1,06843117	1,67413177	1,15402754	1,19323082	0,34443029	-0,59545979	1
44	-0,23850556	-0,9400614	0,14023563	0,29072256	0,66242111	0,93151657	1,04817579	0,43433672	0,09034171	2
45	0,98979807	-0,40385958	0,57313691	-0,25824823	-0,03312996	0,41232431	0,46795569	0,52424316	-0,91818991	2
46	1,01364862	0,32809845	1,25692416	0,32503323	-0,09636188	0,85734625	0,97564828	1,06368177	-0,15170588	2
47	1,86034336	2,11543784	1,71934144	-2,63712163	-1,23453636	0,56066496	0,46795569	-0,19500833	-0,83750738	2
48	1,4071828	2,32821634	2,0145014	-2,55706339	-1,74039169	-0,03269762	0,10531812	-0,3748212	0,33238929	2
49	1,8364928	2,54950598	1,68490611	-2,51131583	-1,99331936	0,11564302	0,17784563	-0,6445405	-1,07955497	2
50	0,83476946	0,89834483	0,49934692	0,50802349	-1,29776828	0,7090056	0,75806574	-0,91425981	0,53409562	2

Tabla 14. Resultado del Test set para carne de pollo

No	cm ⁻¹									Clase verdadera	Clase Predecida
	1255	1475	895	939	1017	1119	1121	1203	1671		
1	-1,90804447	-0,5996158	-1,09943623	0,33647012	1,10504452	-0,6260602	-0,5474295	-0,55463407	2,87388896	1	2
2	-1,43103335	-0,97410596	-2,1324961	1,80839804	1,86382752	-0,40354923	-0,25731944	0,79396247	2,10740494	1	2
3	-1,43103335	-0,5996158	-1,78322348	0,46227593	1,35797219	1,30236818	1,19323082	1,87283969	-1,40228509	1	1
4	-0,11925278	-0,08043627	-1,68975615	1,44013014	-0,15959379	0,85734625	0,83059325	2,32237187	2,47047632	2	1
5	1,10905085	-0,48897098	-0,72556694	-0,15531621	-0,9816087	1,95506702	2,10707749	1,78293326	0,45341309	2	2
6	-1,07327501	-0,52301554	-0,78459893	0,85113023	0,72565303	-0,70023052	-0,69248452	-1,18397912	1,13921459	1	2
7	-1,31178057	0,08127539	-0,12048901	0,82825645	0,47272537	-0,99691181	-0,91006706	-1,27388555	0,13068297	2	2
8	-1,55028613	-0,62514922	-0,66161561	1,07986806	0,85211686	-0,47771955	-0,40237447	-0,6445405	0,69546067	2	2
9	-0,11925278	-0,12299197	0,69612023	0,24497499	-0,15959379	-0,70023052	-0,61995701	-0,46472763	0,13068297	1	1
10	0,23850556	0,79621115	-0,02702169	-0,88727725	-0,91837678	-1,51610407	-1,34523214	0,07471098	0,81648447	2	1
11	1,81264225	1,17921245	1,59143879	-1,03595684	-0,91837678	-0,03269762	0,10531812	-1,45369842	-0,59545979	1	1
12	-0,47701112	-1,22092902	-1,3355642	0,8968778	0,72565303	-0,47771955	-0,47490198	0,16461742	0,25170676	2	2
13	3,31E-15	0,54938809	0,95192553	-0,62422875	-0,47575337	1,36776342	-1,34523214	-0,28491476	0,00965918	2	1
14	1,58606197	-0,83792772	-0,62226095	-1,13888886	2,1799871	0,56066496	0,17784563	-2,26285635	1,70399229	2	2
15	0,5962639	-0,36130388	-0,14508567	0,11916919	0,03010195	1,07985721	1,04817579	0,97377534	-0,91818991	1	1
16	-0,23850556	-0,9400614	0,14023563	0,29072256	0,66242111	0,93151657	1,04817579	0,43433672	0,09034171	1	2
17	0,11925278	0,52385467	0,55345958	-0,13244242	-0,91837678	1,70288792	-1,87498944	1,51321395	-0,27272968	1	1
18	3,31E-15	-0,96559482	-0,85346959	0,69101375	1,48443602	0,56066496	0,46795569	0,34443029	0,2113655	2	1
19	0,11925278	-0,04639171	0,31733161	-0,09813175	0,09333387	0,41232431	0,46795569	0,70405603	-0,87784865	1	1
20	0,5962639	-0,36130388	-0,14508567	0,11916919	0,03010195	1,07985721	1,04817579	0,97377534	-0,91818991	1	1
21	-0,5962639	1,13665675	0,21402562	0,32503323	-0,9816087	0,7090056	0,75806574	-1,09407268	-0,55511853	2	1

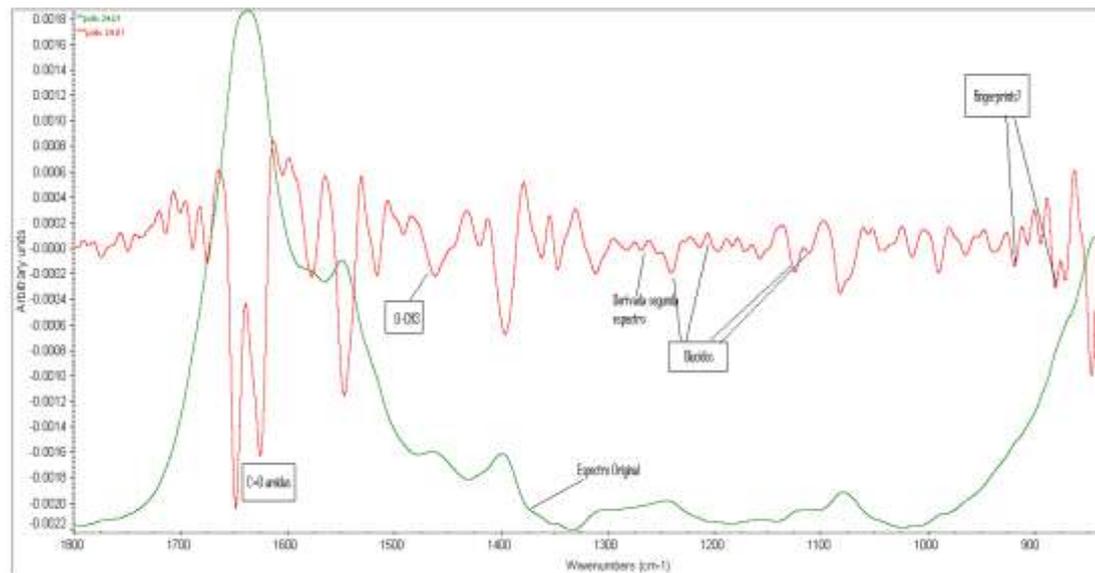


Figura 8. Espectro FT-IR de la muestra de la carne de pollo, se observa de color verde el espectro original, de rojo el espectro que ha sido tratado con Derivada segunda como pre tratamiento. También se observa las zonas donde se encuentran las ondas pertenecientes a Glúcidos, amidas C=O y a los O-CH₃, además de los fingerprint (huellas) detectadas por el algoritmo.

Tabla 15. Matriz de confusión para carne de pollo

Clase verdadera	N	External Predicted Class	
		1	2
1	25	19	6
2	25	5	20
	50	24	26

Tabla 16. Parámetros de calidad para el training set de carne de pollo

	Clase1	Clase2
Prec	0,79166667	0,76923077
Sens	0,76	0,8
Spec	0,8	0,76

NER: 0,78

Tabla 17. Parámetros de calidad del modelo para el Test set para carne de pollo

	Clase1	Clase2
Prec	0,58333333	0,55555556
Sens	0,63636364	0,5
Spec	0,5	0,63636364

NER: 0,6

Tabla 18. Matriz de confusión del Test set para carne de pollo

Clase verdadera	External Predicted Class		
	N	1	2
1	11	7	4
2	10	5	5
	21	12	9

Para aplicar el modelo de predicción en nuevas muestras repetir todo el proceso de pretratamiento a los nuevos espectros y seguir los pasos descritos en el diagrama de flujo, del punto 1.6. Este proceso toma cerca de una hora llevar a cabo para poder predecir si la carne de cerdo o pollo pasan o no de acuerdo a la norma INEN 1338:12, en cuanto al requisito de E. coli se refiere y poder ser utilizada para procesamiento.

CAPITULO III

DISCUSIÓN

El método convencional de microbiología de alimentos, es un método que aunque ha cambiado en los últimos años con materiales más compactos e inclusive con el medio de cultivo adicionado de manera liofilizada en las cajas de análisis bacteriológicos, como es el caso de las compact dry, es un método que tarda como mínimo 24 horas antes de poder tener una idea del grado de contaminación de los productos.

La microbiología moderna esta enrumbándose a nuevas tecnologías de detección microbiana, Está surgiendo la automatización de los laboratorios y los procesos se hacen más rápidos que nunca, con más pruebas estandarizadas y comparables, pero sigue siendo un problema el tiempo de respuesta, que en el caso de los alimentos para proceso no se puede esperar para saber si pasa o no la materia prima desde el punto de vista microbiológico.

El uso de equipos como el espectrofotómetro IR del rango medio, nos ha dado la oportunidad de estudiar de cerca el comportamiento a determinada temperatura (22 a 25°C) del deterioro progresivo de la carne de cerdo y pollo en un tiempo de horas.

Al mismo tiempo que se realizaban los análisis en el IR se realizaron los análisis microbiológicos cuyos resultados se muestran en las tablas 1 y 2.

Para realizar el modelo de predicción se utilizó el método de clasificación KNN en combinación con el método de algoritmos genéticos, para determinar las longitudes de onda (variables) que sean las mejores para la clasificación.

Para este estudio se definió que las clases se designarían de la siguiente manera: Clase 1, menos de 10^2 UFC / gr. o < 2 log y mayor a 10^3 UFC/gr. o 3 log para la clase 2, la clasificación se realizó con la bacteria *Escherichia coli*, ya que es la bacteria que se decidió sea estudiada para este trabajo, aunque es un microorganismo peligroso es muy fácil de detectar. El rango se tomo de la norma INEN 1338:12, requisitos microbiológicos para carnes crudas.

Las bandas seleccionadas (en la carne de cerdo) 1557, 1559 y 1663 cm^{-1} y la banda 1671 cm^{-1} en el pollo, pertenecen al grupo de las amidas (C=O), las cuales son parte de las proteínas.

El resto de bandas seleccionadas en ambos casos son huellas dactilares (fingerprint) de los espectros, así como también detectó otros tipos de radicales que pueden ser parte de las degradaciones de las proteínas o formar parte de los constituyentes normales de la carne, como los glúcidos y O=CH₃.

El algoritmo genético detectó el grupo de las amidas que como se indicó son compuestos de las proteínas, lo cual nos indica que el modelo de predicción nos permitirá ver en nuevas muestras su clasificación. Es decir pasa (clase 1) o no pasa (clase 2).

El NER cv nos da el cálculo del error del modelo predictivo, pero para poder obtener el error verdadero el método KNN se autovalida aplicando la validación cruzada y para mejorar la predicción del modelo se debe realizar una validación externa. A través de esta validación se evalúa el desempeño con un conjunto de muestras conocidas no utilizadas y se determina su capacidad de predicción para muestras conocidas (Lavine, 2009)

La bondad del modelo se puede determinar a través del NER cv, que en este estudio ha sido de 78% para la clasificación de la contaminación por E. coli en la carne de cerdo con un 22% de error real. Para el pollo es similar al anterior con un NER cv de 78% y con un error real de 22%.

A pesar de que el error es un poco alto, esto se debe a que el test set externo sorteja los datos, y estos al no ser suficientes no logra un mejor control externo lo cual provoca un error mayor.

Otro inconveniente en el momento de realizar la clasificación se debió a que los datos son en base logarítmica debido a que son análisis microbiológicos, lo cual dificulta el mejor desempeño de la clasificación.

De la matriz de confusión para el training set (tablas 7 y 15) se observa que las muestras han sido clasificadas dentro de las dos clases, esta matriz nos ayuda a ver la calidad del modelo de predicción.

En la precisión se determina el porcentaje de clasificación asignada por el clasificador, para el caso de la contaminación en la carne de cerdo la clase 1 tiene el 48% de asignación de las muestras en esta clase, para la clase 2 es del 56,5 %. La sensibilidad que nos permite ver el porcentaje de clasificación correcta del clasificador, es alrededor del 50% para ambas clases, de igual manera la especificidad, que es el porcentaje que el objeto de la clase considera asignado a la clase, fue del 50% para los dos casos.

En el caso de la contaminación de la carne de pollo la calidad de la clasificación que realiza el modelo de predicción es en precisión de un 79% para la clase 1 y de un 76% para la clase 2. La sensibilidad está entre el 77 al 78% y la especificidad cercana al 80%, tanto para la clase 1 como la clase 2.

Para la validación externa (test set) se revisa los parámetros de calidad de las tablas 9 y 17, en las que se puede observar que la tasa de NER es del 0,6 para la carne de cerdo y 0,52 para la carne de pollo, por lo tanto el error real de los modelos es del 40% y 48% para cerdo y pollo, respectivamente. La sensibilidad del modelo en el cerdo para la clase 1 es de 0,7 y

para la clase 2 es de 0,888. La especificidad tiene valores de 0,888 en la clase 1 y de 0,7 en la clase 2.

Para el pollo la sensibilidad se encuentra en 0,6363 para la clase 1 y de 0,5 en la clase 2. La especificidad nos da valores de 0,5 clase 1 y de 0,6363 para la clase 2.

La validación externa dio un NER de un poca más del 50% tanto para clasificación de clases en la contaminación por E. coli en cerdo y pollo, esto se debe a que hay que realizar mayor número de muestras para que el clasificador se desempeñe mejor. Además es importante recalcar que la contaminación en la carne de pollo tiende al infinito en los análisis microbiológicos en un tiempo más corto que la carne de cerdo, por lo que se tenían más datos del cerdo que del pollo.

De todas maneras el modelo de predicción nos da un buen resultado para poder trabajar en muestras futuras y poder clasificarla en clase 1 o 2, y poder aprobar o rechazar la muestra.

CONCLUSIONES

- El método de infrarrojo permite detectar las longitudes de onda de los compuestos del nitrógeno, propios de la carne que son quienes sufren transformaciones cuando se deteriora.
- La espectroscopia de infrarrojo es una técnica simple y económica, frente a otras técnicas rápidas del mercado que tienen costos excesivos tanto al inicio como durante el transcurso del tiempo.
- A través de la clasificación KNN acoplado al algoritmo genético se pudo tener dos clases bien definidas que permiten clasificar las nuevas muestras y determinar si pasan o no de acuerdo a la clase en la que encasillen.
- Las clases se definieron de los requisitos microbiológicos máximos y mínimos de la norma INEN 1338:12 para carnes crudas, escogiéndose E. coli como microorganismo de estudio.
- Este método rápido de detección nos dice si la carne de cerdo o pollo se encuentra por debajo de 10^{-2} ufc/gr o 2 log o si se encuentra por encima de 10^{-3} o 3 log de bacterias E.coli, estos parámetros serán los que determinan si la carne pasa o no y si se puede utilizar de acuerdo a esta contaminación bacteriana.
- Se debería realizar nuevamente este estudio pero con un mayor cantidad de muestras y realizar corridas continuas de por lo menos 12 horas.
- Este trabajo se podría replicar con las mismas muestras de cerdo y pollo pero identificando los rangos microbiológicos para Staphylococcus aureus y para mesófilos totales, ya que son los microorganismos identificados por la norma INEN como requisitos para determinar el tiempo de vida útil.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Badui, Salvador. *Química de los Alimentos*. México D.F. (México). Pearson Education. 2006. 736 p.

Da-Wen Sun. *Infrared Spectroscopy for Food quality Analysis and Control*. Dublin (Ireland). Elsevier Inc. cop. 2009. 424p

Forsythe S.J, Hayes P.R. *Higiene de los Alimentos, Microbiología y HACCP*. USA. Springer US. 2010. 468p.

INEN. Carne y sus productos cárnicos. NTE INEN 1338. Tercera revisión. Quito. INEN 2012

Kohler A.; Zimonja M. and Segtnan V.; Martens H. "Standard Normal Variate, Multiplicative Signal Correction and Extended Multiplicative Signal Correction Preprocessing in Biospectroscopy". En: *SD Chemometrics*. Norway. Elsevier B.V. cop. 2009.

Madigan M.T, Martinko J.M., Parker J. *Brock. Biología de los Microorganismos*. Madrid (España). Pearson Educación. 2004. 1096 p.

Leardi R. "Genetic Algorithms". En: *SD Chemometrics*.. Elsevier B.V. cop. 2009. 631-651p, 1 vol.

Lavine B. K. and Rayens W.S. "Classification: Basic Concepts". En: *SD Chemometrics* Elsevier B.V. cop. 2009. 507-514p, 3 vol.

Lavine B.k. "Validation of Classifiers". En: *SD Chemometrics*. Elsevier B.V. cop 2009.587-598p,3 vol.

Lavine B. K. "Feature Selection: Introduction". En: *SD Chemometrics*. Elsevier B.V. cop. 2009. 601-605p. 3 vol.

Lavine B.K. and Davison C.E. "Multivariate Approaches to Classification using Genetic Algorithms". En: *SD Chemometrics*. Elsevier B.V. cop 2009. 619-644p, 3 vol.

Stuart, Barbara. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. England. Jhon Wiley and Sons Ltda., 2004. 208 p.

Skoog Douglas A., Crouch Stanley R., Holler F. James. *Principios de Análisis Instrumental*. Mexico D.F. (Mexico). Cengage Learning. 2008. 1038 p.

Todeschini Roberto. *Introduzione alla Chemiometria*. Napoli (Italia). EdiSES s.r.l. 1998. 309 p.

Trygg J.; Gabrielsson J.; Lundstedt T. "Background Estimation, Denoising, and Preprocessing". En: *SD Chemometrics*. Elsevier B.V. cop.2009. 1-6 p, 2 vol.

Zeaiter M. and Rutledge. "Preprocessing Methods". En: *SD Chemometrics*. Elsevier B.V. cop. 2009. 123-179p, 3 vol.

REFERENCIAS ELECTRONICAS

Espectroscopia infrarroja (en línea). <http://www.slideshare.net/cajarampa/espectroscopia-infrarroja>. (Consulta: 20 de mayo 2013)

Gómez R, Murillo R. “Espectroscopia Infrarroja”. (En línea). <http://sistemas.fciencias.unam.mx/~fam/Infrarroja.pdf>. (Consulta: 4 junio 2013)

La AOAC y la aprobación de métodos oficiales (en línea). <http://www.innova-uy.info/docs/presentaciones/20111013/MarinaTorres.pdf>. (Consulta: 6 de junio del 2013)

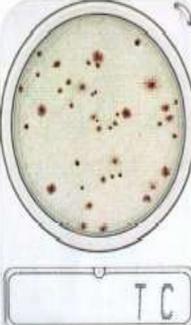
Ministerio de Salud Pública. Gaceta Epidemiológica Semanal (en línea). <http://www.salud.gob.ec/gaceta-epidemiologica-ecuador-sive-alerta-2013/> (Consulta: 10 de junio del 2013)

T. Theophanides. “Fourier Transform Infrared Spectroscopy. Química Industrial y Aplicaciones Bioquímicas”. (En línea). <http://link.springer.com/book/10.1007/978-94-009-6418-1/page/1>. (Consulta: 20 de mayo del 2013).

ANEXOS

ANEXO 1

Compact Dry TC



Es una placa cromogenica lista para usar para el recuento total de gérmenes vivos Compact Dry TC es un medio que contiene agar de cultivo estándar y que sirve para comprobar el recuento total. Debido a la sal de tetrazolio, indicador redox, las colonias de bacterias presentan una coloración roja, pudiéndose con ello distinguir muy fácilmente de posibles restos de alimentos.

Tratamiento previo de las muestras
Cantidad de gérmenes vivos en el agua o en alimentos líquidos
 Aplique 1 ml de la muestra (dilúyala en caso necesario) en el centro de la placa Compact Dry.

Cantidad de gérmenes vivos en alimentos sólidos
 Agregue una solución búfer a la prueba y homogenícela en el Stomacher®, Aplique 1 ml de la muestra (dilúyala en caso necesario) en el centro de la lámina seca de la placa Compact Dry.

Cantidad de gérmenes vivos en la muestra de la prueba de hisopo
 Frote la superficie con el hisopo y colóquelo en el dispositivo con la solución de absorción. Aplique 1 ml de la solución de absorción (dilúyala en caso necesario) en el centro de la placa Compact Dry.

Instrucciones para la prueba

1. Abra la cubierta y deje caer una gota de la muestra sobre la parte central de la placa Compact Dry.
2. La muestra se dispersa automática y homogéneamente sobre la lámina, y transforma la lámina seca en un gel en pocos segundos.
3. Vuelva a colocar la cubierta sobre la placa y anote la información necesaria en la sección de memorando.
4. Gire la placa cerrada y colóquela en la incubadora.
5. Después de la incubación, cuente el número de colonias coloreadas en la parte posterior de la placa. El papel blanco colocado debajo de la placa le ayudará a contar las colonias.

Tiempo de incubación 48 ± 3 horas

Temperatura de incubación 35 ± 2 °C (AOAC) 30 ± 2 °C (NordVal, MicroVal)

También puede utilizar el tiempo/temperatura de incubación recomendados en las reglamentaciones nacionales para el recuento total de gérmenes vivos.

Interpretación de los resultados
 Casi todas las colonias que crecen son de color rojo. Las colonias rojas, junto con las de otros colores, arrojan el recuento total

Conservación y vida en almacenaje
 Consérvese a temperatura ambiente (+ 1 a +30 ° C). Vida en almacenaje total después de la fabricación: 18 meses

Notas

- Es posible que algunas colonias no presenten un color rojo claramente definido.
- Las altas concentraciones en las placas hacen que toda el área de crecimiento se vuelva roja/rosa. En este caso, diluya la muestra.
- Después del uso, tenga en cuenta las regulaciones vigentes sobre la eliminación de residuos.
- El área de crecimiento es de 20 cm². En la parte posterior de la placa hay una cuadrícula de 1 cm. x 1 cm. gravada para facilitar el recuento de las colonias. Si tiene dificultades en contar las colonias debido a que existe un gran número de ellas, el recuento total de gérmenes vivos se puede obtener multiplicando por 20 el número promedio de colonias por cuadrícula de varias cuadrículas.
- Las placas Compact Dry se producen en una ubicación certificada según ISO 9001.

• AOAC approval No. 010404
 • MicroVal approval No.0703-001LR
 • NordVal approval No. 033

ITEM	ESPECIFICACION	OBSERVACIONES
Apariencia	Hoja de amarillo claro. No presenta partículas	Control visual
pH	6.8 – 7.2	Medida con pHmetro
Perdida por desecación	Menor al 10%	Control visual
Prueba de esterilidad	No hay crecimiento de colonias si se incuban a 30C por 5 días	Control visual
Rendimiento	Las siguientes cepas de prueba se inocularon y se incubaron a 35 C durante 44- 48 horas, debe observarse buen crecimiento de: <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Control Visual

ANEXO 2

Tabla de correlaciones en espectroscopia infrarroja

Enlace	Tipo de enlace	Tipo específico de enlace	Rango e intensidad de absorción
C-H	alquilo	metilo	1380 cm ⁻¹ (débil), 1460 cm ⁻¹ (fuerte) y 2870, 2960 cm ⁻¹ (ambos, de fuerte a medio)
		metileno	1470 cm ⁻¹ (fuerte) y 2850, 2925 cm ⁻¹ (ambos, de fuerte a medio)
		metino	2890 cm ⁻¹ (débil)
	vinilo	C=CH ₂	900 cm ⁻¹ (fuerte) y 2975, 3080 cm ⁻¹ (medio)
		C=CH	3020 cm ⁻¹ (medio)
		alqueno monosustituido	900, 990 cm ⁻¹ (ambos fuerte)
		alqueno cis-disustituido	670-700 cm ⁻¹ (fuerte)
		alqueno trans-disustituido	965 cm ⁻¹ (fuerte)
		alqueno trisustituido	800-840 cm ⁻¹ (fuerte a medio)
	aromático	benceno /benceno sustituido	3070 cm ⁻¹ (débil)
		benceno monosustituido	700-750 cm ⁻¹ (fuerte) y 700±10 cm ⁻¹ (fuerte)
		benceno orto-disustituido	750 cm ⁻¹ (fuerte)
		benceno meta-disustituido	750-800 cm ⁻¹ (fuerte) y 860-900 cm ⁻¹ (fuerte)
		benceno para-disustituido	800-860 cm ⁻¹ (fuerte)
		alquino	
aldehído		2720, 2820 cm ⁻¹ (medio)	
C=C	C=C acíclico	alqueno monosustituido	1645 cm ⁻¹ (medio)
		alqueno 1,1-disustituido	1655 cm ⁻¹ (medio)
		alqueno cis-1,2-disustituido	1660 cm ⁻¹ (medio)
		alqueno trans-1,2-disustituido	1675 cm ⁻¹ (medio)
		alqueno tri y tetrasustituido	1670 cm ⁻¹ (débil)
	C=C conjugado	dienos	1600, 1650 cm ⁻¹ (fuerte)
		con anillo de benceno	1625 cm ⁻¹ (fuerte)
		con C=O	1600 cm ⁻¹ (fuerte)
		C=C aromático	1450, 1500, 1580, 1600 cm ⁻¹ (fuerte a débil) - siempre los 4

	$C\equiv C$	alquino terminal	2100-2140 cm^{-1} (débil)
		alquino disustituido	2190-2260 cm^{-1} (muy débil, a veces no visible)
C=O	cetona/aldehído	alifáticos saturados/ciclos de 6 miembros	1720 cm^{-1}
		α,β -insaturado	1685 cm^{-1} (también va para cetonas aromáticas)
		ciclo de 5 miembros	1750 cm^{-1}
		ciclo de 4 miembros	1775 cm^{-1}
		aldehído	1725 cm^{-1} (influencia de la conjugación como en las cetonas)
	derivados de ácido carboxílico	ácido carboxílico saturado	1710 cm^{-1}
		ácido carboxílico insaturado/aromático	1680-1690 cm^{-1}
		ésteres y lactonas	1735 cm^{-1} (influencia de la conjugación y el tamaño del anillo como en las cetonas)
		anhídridos	1760 y 1820 cm^{-1} (ambos)
		halogenuros	1800 cm^{-1}
		amidas	1650 cm^{-1} (amidas asociadas)
		sales de carboxilatos	1550-1610 cm^{-1} (también va para zwitteriones aminoácidos)
O-H	alcoholes, fenoles		3610-3670 cm^{-1} (la concentración de la muestra ensancha la absorción y la mueve a 3200-3400 cm^{-1})
	ácidos carboxílicos		3500-3560 cm^{-1} (la concentración de la muestra ensancha la absorción y la mueve a 3000 cm^{-1})
N-H	aminas primarias		doblete entre 3400-3500 cm^{-1} y 1560-1640 cm^{-1} (fuerte)
	aminas secundarias		sobre 3000 cm^{-1} (medio a débil)
	iones amonio		se ensancha con múltiples picos entre 2400-3200 cm^{-1}
C-O	alcoholes	primarios	1050±10 cm^{-1}
		secundarios	alrededor de 1100 cm^{-1}
		terciarios	1150-1200 cm^{-1}
	fenoles		1200 cm^{-1}
	éteres	alifáticos	1120 cm^{-1}
		aromáticos	1220-1260 cm^{-1}
	ácidos carboxílicos		1250-1300 cm^{-1}
	ésteres		1100-1300 cm^{-1}

C-N	aminas alifáticas		1020-1220 cm^{-1} (frecuentemente sobrepuestas)
	C=N		1615-1700 cm^{-1} (efectos de conjugación similares a C=O)
	nitrilos (enlace triple C-N)		2210-2260 cm^{-1} (no conjugado 2250, conjugado 2230 cm^{-1})
	isonitrilos (enlace R-N-C)		2165-2110 cm^{-1} (2140 - 1990 cm^{-1} para R-N=C=S)
C-X (X=F, Cl, Br, I)	fluoroalcanos	ordinarios	1000-1100 cm^{-1}
		trifluorometilo	dos fuertes, se ensancha entre 1100-1200 cm^{-1}
	cloroalcanos		540-760 cm^{-1} (medio to débil)
	bromoalcanos		below 600 cm^{-1}
	iodoalcanos		below 600 cm^{-1}
N-O	compuestos nitro	alifático	1540 cm^{-1} (más fuerte) y 1380 cm^{-1} (más débil) - Siempre ambas.
		aromático	1520, 1350 cm^{-1} (la conjugación usualmente baja el número de onda)

Las absorciones en este rango no se aplican 'solamente' a enlaces en moléculas orgánicas. La espectroscopia IR es útil cuando se refiere al análisis de compuestos inorgánicos (tales como complejos metálicos o fluoromanganatos).

http://es.wikipedia.org/wiki/Anexo:Tabla_de_correlaciones_en_espectroscopia_infrarroja