



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ingeniería

Doctorado en Ingeniería de Biosistemas

Determinación No Invasiva de Grasa y Proteína en Leche Mediante
Procesamiento de Señales Ópticas

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Doctor en Ingeniería de Biosistemas

Presenta

M. en C. Abraham Gastélum Barrios

Dirigido por:

Dr. Genaro Martín Soto Zarazúa

Co-dirigido por:

Dr. Daniel Jáuregui Vázquez

Dr. Genaro Martín Soto Zarazúa
Presidente

Firma

Dr. Daniel Jáuregui Vázquez
Secretario

Firma

Dr. Manuel Toledano Ayala
Vocal

Firma

Dr. Edgar Alejandro Rivas Araiza
Suplente

Firma

Dr. Juan Fernando García Trejo
Suplente

Firma

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Octubre del 2020

Resumen

La calidad de la leche puede cuantificarse estudiando su composición, principalmente el contenido de grasa y proteína. Realizar un constante monitoreo de estos parámetros, es una actividad crucial para mantener un hato en buen estado de salud, prevenir enfermedades como mastitis y cetosis y realizar ajustes al manejo y dietas alimenticias de las mismas. Usualmente, la calidad de la leche es determinada utilizando métodos invasivos que requieren del uso de reactivos químicos, equipos y personal altamente especializados incrementando el tiempo de análisis. Como solución, se han desarrollado nuevos métodos basados en la espectroscopía, permitiendo generar sistemas no invasivos, rápidos y de un costo relativamente menor que los sistemas de laboratorio actuales. En esta investigación, se describe un nuevo método para la determinación del contenido de grasa y proteína en leche cruda de vaca mediante un arreglo óptico basado en un interferómetro Fabry-Perot en respuesta dual. El sistema es capaz de determinar el contenido de grasa y proteína en la banda de los 500 nm con una sensibilidad de 616 pm/% de grasa y un coeficiente de $r^2 = 0.9763$ para grasas; y con una sensibilidad de 4.571 nm/% de proteína y un coeficiente de $r^2 = 0.8780$ para proteínas. El nuevo método representa una alternativa para el desarrollo de sistemas no invasivos, de bajo costo y fáciles de implementar en sistemas de determinación de parámetros de la calidad de leche en línea.

Palabras clave: interferómetros Fabry-Perot; modulación por fase; sensor óptico de grasa; leche cruda

Abstract

The quality of milk can be quantified by studying its composition, principally the fat and protein content. Performing constant monitoring of these parameters, is a crucial activity to maintain a herd in good health, prevent illnesses such as mastitis and ketosis, and make properly adjustments to their handling and diets. The quality of milk is usually determined using invasive methods that require the use of highly specialized chemical reagents and equipment, and highly trained personnel, increasing the analysis time. As a solution, new method based on spectroscopy have been developed, allowing the development of non-invasive systems, fast determination, and low-cost alternatives to the actual laboratory equipment. In this research, a new method to determine fat and protein content in raw cow's milk is described using an optical arrangement based on a Fabry-Perot interferometer working on dual response. The system is capable of determine the fat and protein content in the 500 nm band with a sensitivity of 616 pm/%fat and a coefficient of $r^2 = 0.9763$ for the fat estimation; and with a sensitivity of 4.571 nm/%protein and a coefficient of $r^2 = 0.9763$ for protein estimation. The new method represents an alternative for the development of low-cost, non-invasive, and easy to implement in online and dedicated milk quality parameter determination systems.

Keywords: Fabry-Perot interferometer; phase modulation; optical fat sensor; raw milk

Dedicatorias

Para Emma, el más grande regalo...

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Agradecimientos

Le agradezco a mi esposa Adriana y a mi hija Emma por siempre brindarme su apoyo, su inspiración y su amor, sin ustedes esto no habría sido posible. Le agradezco enormemente a mi familia mi mamá, mi hermana, mis suegros y también mi cuñada, cada uno de ustedes me estuvieron apoyando de distintas maneras y les estaré eternamente agradecido.

A mis asesores el Dr. Genaro Martín Soto Zarazúa, por todo el apoyo brindado; a mi co-director el Dr. Daniel Jáuregui Vázquez, por toda la paciencia, el aprendizaje y el apoyo brindado de inicio a fin en este trabajo; a los doctores Dr. Manuel Toledano Ayala, Dr. Edgar Rivas Araiza y al Dr. Juan Fernando García Trejo, por sus apreciables comentarios, retroalimentación y apoyos brindados, sobre todo en la etapa de pruebas de laboratorio.

A mis amigos y compañeros de estudio por brindarme su apoyo y amistad durante todos estos años, llenos de trabajo, pero siempre con la excelente actitud.

También a la Universidad Autónoma de Querétaro y a la Universidad de Guanajuato por abrirme las puertas de sus aulas y laboratorios, sin su apoyo e infraestructura, este trabajo no habría sido posible.

Gracias también a mis maestros que siempre me estuvieron impulsando a obtener mis resultados.

Se agradece también al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la Beca No. 449071 para la realización de este trabajo de investigación.

Índice

Resumen	I
Abstract	II
Dedicatorias.....	III
Agradecimientos.....	IV
Índice	V
Índice de Tablas.....	VII
Índice de Figuras.....	VIII

1. Introducción	1
1.1. Descripción del problema	3
1.2. Justificación	4
1.3. Hipótesis.....	6
1.4. Objetivos.....	6
1.4.1. Objetivo General	6
1.4.2. Objetivos Específicos.....	6
2. Revisión de Literatura	7
2.1. Antecedentes.....	7
2.1.1. Propiedades ópticas de la leche	7
2.1.2. Técnicas espectroscópicas para la determinación de la calidad de la leche.....	9
2.1.2.1. Técnicas en el rango UV	10
2.1.2.2. Técnicas en el rango VIS	11
2.1.2.3. Técnicas en el rango IR	12
2.1.2.4. Revisión de patentes.....	18
2.1.2.5. Antecedentes tecnológicos	20
2.2. Marco teórico.....	27
2.2.1. Grasas.....	27
2.2.1.1. Tipos De Grasas	28
2.2.1.2. Métodos De Laboratorio Para Determinar Grasas.....	28
2.2.2. Proteínas	29
2.2.2.1. Métodos De Laboratorio Para Determinar Proteínas	30
2.2.3. Interferometría.....	30
2.2.3.1. Interferómetro Fabry-Perot.....	33

2.3.	Generalidades de la fibra óptica.....	34
3.	Metodología	36
3.1.	Descripción de los materiales.....	36
3.2.	Preparación del experimento.....	40
3.3.	Preparación de las muestras.....	43
3.4.	Modelo teórico	45
4.	Resultados y discusión	51
4.1.	Proceso de homogenización	51
4.2.	Prueba de absorbancia	52
4.3.	Experimento en sistema óptico	55
4.4.	Análisis de respuesta en frecuencia.....	65
	Conclusiones y Recomendaciones	71
	Bibliografía.....	73

Índice de Tablas

Tabla 1 Composición de grasas simples individuales y fosfolípidos totales en leche de algunas especies (% de grasa total), creada con datos de (Fox et al., 2015).	28
Tabla 2 - Muestras de leche utilizadas en el experimento.	44
Tabla 3 - Regresiones de segundo orden de las regiones centrales a través del interferograma. Adaptado de (A. Gastélum-Barrios et al., 2019).....	60

Dirección General de Bibliotecas UAG

Índice de Figuras

Figura 1 - Efectos de dispersión causados por las partículas de grasa y proteína en la leche. La longitud de onda incidente es mas pequeña que el diámetro de las partículas. En la vista ampliada, se representa la anisotropía de dispersión de Mie. Adaptado de (Gastélum-Barrios et al., 2020). ...	8
Figura 2 - Diagrama general de los métodos espectrofotométricos. Adaptado de (Gastélum-Barrios et al., 2020).....	9
Figura 3 - Sistema automático AfiLab Milk Analyzer ® para la detección de grasa proteína y lactosa en leche de vaca (Afimilk, 2020).	21
Figura 4 - Analizador de leche en línea TIDAS P Milk Inspector ® (J & M Analytik, 2020).	22
Figura 5 - Sistemas Lactomat Rapid BP ® y Master Pro Touch ®. Adaptado de (Milkotester, 2020).	23
Figura 6 - Sistema Lactoscan MCCWS ® de Milkotronic Ltd (Milkotronic, 2020).....	24
Figura 7 - Equipo LactiCheck ® para determinaciones rápidas de parámetros de calidad en leche (Weber Scientific, 2020).	25
Figura 8 - Ekomilk TOTAL ®, analizador ultrasónico de leche (EON, 2020).	26
Figura 9 - Analizador de leche BOECO Milk Analyzer LAC-SP ® (Boeco, 2020).....	26
Figura 10 - Milk Fat Analyzer LAMA-B10 (Labtron, 2020).....	27
Figura 11 - Parámetros de una onda electromagnética linealmente polarizada (Saldaña Sanchez, 2018).	31
Figura 12 - Etalón Fabry-Perot (Hecht, 2017).	34
Figura 13 - Fuente de banda ancha en el rango VIS MBB1F1 (Thorlabs, 2020).	37
Figura 14 - Espectro de emisión de la fuente MBB1F1. Elaborado a partir de datos de (Thorlabs, 2020).	37
Figura 15 - Controlador LEDD1B (Thorlabs, 2020a).	38
Figura 16 - Conector de fibra óptica multimodal 2x2 modelo TM200R5S2A (Thorlabs, 2020b).	39
Figura 17 - Base para celda de cuarzo CUV-FL-DA (Ocean Optics, 2020).....	39
Figura 18 - Analizar de espectros ópticos USB2000+ (Ocean Insight, 2020).	40
Figura 19 - Diagrama esquemático de la preparación experimental. OSA: analizador de espectros ópticos. Adaptado de (A. Gastélum-Barrios et al., 2019).	41
Figura 20 - Disposición mecánica de los conectores SMA para generar la cavidad.....	42
Figura 21 - Imagen del esquema implementado.	43
Figura 22 - Captura de la pantalla de la interface visual del software OOIBase32 para la representación del espectro electromagnético.....	43
Figura 23 - Equipos para el tratamiento de las muestras de leche.	45

Figura 24 - Arreglo de fibra óptica y su análisis de paso de la luz. El conector mecánico está representado por A y el soporte de cubetas de cuarzo por B. La vista aumentada muestra el análisis de respuesta dual. Adaptado de (A. Gastélum-Barrios et al., 2019).	46
Figura 25 - Representación visual de la luz incidente y los rayos dispersos a través de la muestra de leche en la celda de cuarzo. Adaptado de (A. Gastélum-Barrios et al., 2019).	48
Figura 26 - Espectro de salida del modelo de aproximación. Adaptado de (A. Gastélum-Barrios et al., 2019).	50
Figura 27 - Resultado de la homogenización de las muestras de leche a 37 °C sin homogenizar y a los 20 min de aplicarle el baño ultrasónico.	52
Figura 28 - Muestra de leche y sus distintas diluciones.	53
Figura 29 - Resultados de absorbancia del barrido UV-VIS-NIR con el Multiskan GO ®.	54
Figura 30 - Resultados de transmitancia del barrido UV-VIS-NIR con el Multiskan GO ®.	55
Figura 31 - Espectro de reflexión de la fuente de luz y la respuesta de interferencia óptica. El inserto es la señal de reflexión. Adaptado de (A. Gastélum-Barrios et al., 2019).	56
Figura 32 - (a) Espectro de interferencia para variaciones de grasa. El inserto es una vista amplificada de la región central (R2). (b) Análisis de desplazamiento de las tres regiones con una regresión lineal. Adaptado de (A. Gastélum-Barrios et al., 2019).	59
Figura 33 - Regiones centrales del interferograma. Adaptado de (A. Gastélum-Barrios et al., 2019).	60
Figura 34 - Resultados de validación del modelo para el análisis de grasas totales. Adaptado de (A. Gastélum-Barrios et al., 2019).	62
Figura 35 - Vista amplificada de la región R2 para la estimación de proteína. El inserto es el ajuste cuadrático del desplazamiento con respecto al espectro inicial. Adaptado de (A. Gastélum-Barrios et al., 2019).	63
Figura 36 - Respuestas de intensidad y longitud de onda cuando (a) se modifica la temperatura de la muestra de leche y (b) cuando la temperatura exterior se modifica. Adaptado de (A. Gastélum-Barrios et al., 2019).	64
Figura 37 - Comparación entre la intensidad y el desplazamiento en longitud de onda para la prueba de repetitividad. (A. Gastélum-Barrios et al., 2019).	65
Figura 38 - Respuesta en frecuencia de la fuente de luz blanca. R1 representa el análisis del espectro comprendido entre los 450-550 nm, R2 en el rango de los 550-650 nm y R3 en el rango de los 650-750 nm.	66
Figura 39 - (a) Respuesta en magnitud de la región R1 comprendida de los 450-550 nm. (b) Vista ampliada de la respuesta en magnitud centrada en la frecuencia espacial de siete. (c) Respuesta en fase centrada en 50 unidades.	68

Figura 40 - (a) Respuesta en magnitud de la Región R2 comprendida de los 550-650 nm. **(b)** Vista ampliada de la respuesta en magnitud centrada en la frecuencia espacial de siete. **(c)** Respuesta en fase centrada en 50 unidades. 69

Figura 41 - (a) Respuesta en magnitud de la región R3 comprendida de los 650-750 nm. **(b)** Vista ampliada de la respuesta en magnitud centrada en la frecuencia espacial de siete. **(c)** Respuesta en fase centrada en 50 unidades. 70

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Capítulo 1

1. Introducción

La leche es un alimento nutritivo popularmente consumido alrededor del mundo, su calidad afecta directamente a la salud humana y su consumo incrementa año con año (Alves da Rocha et al., 2015). México produce más de 11.3 millones de toneladas de leche al año, con un crecimiento del 2.5% (SIAP, 2016).

La calidad de la leche de vaca para consumo humano está basada principalmente en la determinación del contenido de grasa y proteína, parámetros que determinan el precio en el mercado (Ohtani et al., 2005). Por otro lado, el correcto y constante monitoreo de la calidad de la leche permite a los productores conocer el estado de salud de su hato, prevenir enfermedades y otorga una referencia para el control de la calidad (Ragni et al., 2016). La leche es una emulsión diluida que está conformada por dos fases, una dispersa de aceite y grasa, y una fase acuosa coloidal continua (Fox et al., 2015).. En general, la leche de vacas de alta producción, está compuesta de agua (87%), grasa (3.8%), proteína (3.4%), lactosa (4.5%) y otros sólidos totales como minerales, vitaminas y enzimas (1.3%) (Pinto et al., 1998). La cantidad de grasa en la leche varía entre un 1 y 6%, se encuentra presente en forma de glóbulos rodeados por una capa membranosa de grasas y proteínas. La proteína contenida en la leche tiene la función de suministrar a los mamíferos de los aminoácidos esenciales requeridos para el desarrollo muscular y otros tejidos. La cantidad de proteína en leche de bovino es de aproximadamente 3.5% y su concentración varía significativamente durante la lactancia, sobre todo durante los primeros días después del parto (Fox et al., 2015).

La mejor manera de monitorear la salud de la vaca es realizando análisis regulares de la leche producida, evaluando la relación entre grasa y proteína se pueden determinar problemas de salud como mastitis, cetosis, acidosis ruminal, entre otras (Aernouts et al., 2011, 2015).

Durante las últimas décadas, distintas técnicas se han estudiado para determinar estos parámetros, y se pueden diferenciar dos grandes ramas: análisis químicos y utilizando instrumentos ópticos. El primero requiere de equipos de laboratorio y personal altamente especializados, destrucción de las muestras analizadas, consumen mucho tiempo para los análisis, y se utilizan reactivos químicos peligrosos en su manejo y contaminantes para el medio ambiente. Por lo que el desarrollo se ha enfocado en las técnicas que no requieren agentes químicos, optando por la segunda opción. Los análisis utilizando instrumentos ópticos se basan en el principio de la interacción entre la luz y las partículas de leche, y es aquí donde muchas propuestas se han reportado (Aernouts et al., 2015; A. Bogomolov y Melenteva, 2013; dong Feng et al., 2013; Kucheryavskiy et al., 2014; Li et al., 2016; Niero et al., 2016). Una de las técnicas más atractivas es la basada en la espectroscopía (Burns y Ciurczak, 2007), la cual analiza el espectro de transmisión de la luz que atraviesa la muestra líquida. Utilizando la ley de Beer-Lambert-Bouguer, es posible obtener la absorbancia y correlacionarla con los componentes de la muestra (Regnima et al., 2017). A pesar de que este método ha sido ampliamente utilizado, la técnica tiene efectos de dispersión de la luz no deseados, los cuales se producen en líquidos ópticamente densos como la leche (Regnima et al., 2017). Por otro lado, las técnicas de espectroscopía pueden combinarse con fibras ópticas utilizando distintas longitudes de onda de operación como el espectro ultravioleta (UV), visible (VIS), o infrarrojo cercano (NIR). Se ha reportado que al utilizar sensores de fibra óptica, los sistemas desarrollados pueden incrementar la sensibilidad en las detecciones (Gowri et al., 2019). Dentro de las técnicas reportadas, podemos destacar el uso de fuentes de iluminación en el NIR donde se analiza el espectro de transmisión (Kawasaki et al., 2008; Zhu et al., 2016), otros

trabajos donde se utiliza la relación entre el índice de refracción (RI, por sus siglas en inglés de "*Refractive Index*") y el contenido de grasas totales (Gowri et al., 2019).

En esta investigación se presenta el diseño e implementación de un sistema basado en fibra óptica multimodal con un arreglo de EFPI de doble respuesta para detectar el contenido de grasa y proteína en leche de vaca. El sistema genera un espectro de interferencia al interactuar con las muestras de leche, produciendo un desplazamiento en las longitudes de onda en una región específica haciendo posible la detección de los cambios de grasa y proteína. El contenido de la investigación está dividido en distintos capítulos. En el Capítulo 1 se presenta la Introducción de la investigación, la descripción del problema, justificación del desarrollo, la pregunta de investigación, así como los objetivos que se cumplieron con el desarrollo del trabajo. En el Capítulo 2 se encuentra la revisión de la literatura, dividido en Antecedentes y Marco Teórico. Los Antecedentes muestran el estado del arte en el que se encuentra el tema de investigación tanto técnicos, como comerciales. En el Marco Teórico se incluye toda la fundamentación que sirvió como base para el desarrollo de presente trabajo. En el Capítulo 3 se presentan los métodos y materiales de la investigación, presentando el modelo teórico del cual se partió para el desarrollo. En el Capítulo 4 se encuentran los principales resultados y discusiones, así como las comparaciones de los resultados contra otras investigaciones. En el Capítulo 5 se presentan las Conclusiones y Recomendaciones. Finalmente, en el Capítulo 6 se encuentran las referencias bibliográficas utilizadas para el desarrollo de este documento.

1.1. Descripción del problema

Conocer la composición de la leche producida es de alta importancia para los productores, ya que determina el valor económico y permite obtener información acerca del metabolismo de la vaca, así como de la salud y del estado nutricional, manteniendo con esto, un adecuado manejo del hato (El-Abassy et al., 2011).

Una mala alimentación se refleja en un bajo contenido de grasas y proteínas en la leche producida. Con el monitoreo constante de estos parámetros, es posible

detectar desórdenes de fermentación como la acidosis ruminal (SARA, por sus siglas en inglés). En Estados Unidos de América, las pérdidas relacionadas por SARA se encuentran entre los 500 y los 1,000 millones de dólares al año, esto es aproximadamente 1.12 dólares americanos por vaca diariamente. De igual manera, es posible determinar mastitis y cetosis con anticipación. Las pérdidas económicas relacionadas por mastitis se estiman en 1.8 billones de dólares en EUA (10% de las ventas).

La leche producida se almacena directamente en tanques para su conservación; sin embargo, si la leche que se inserta no es previamente analizada, se corre con el riesgo de perder el lote debido a combinaciones con leche que presente anomalías como presencia de sangre, con calostro, o provenientes de vacas en tratamiento de antibióticos. Además, la correcta separación de leche de bajo, o alto contenido de grasa, permitirá la venta de lotes con distintos precios de mercado, en lugar de combinar toda la producción disminuyendo el margen de ganancia.

Por lo anterior, es de suma importancia mantener un constante y adecuado monitoreo de los parámetros de la calidad de la leche; sin embargo, la tecnología actual no es capaz de llegar a la mayoría de los productores debido a su alta especialización y su alto costo. Pequeños y medianos productores dependerán de la contratación de laboratorios especializados para la ejecución de los análisis de calidad.

Para el desarrollo de nuevas técnicas que permitan la evolución y, por ende, aumentar el acceso a la tecnología, es necesaria la investigación básica para la demostración de nuevas técnicas para la determinación de estos parámetros de una manera no invasiva, más económica y que el desarrollo de sistemas sea accesible para los distintos estratos de producción.

1.2. Justificación

Es importante destacar que el tamaño de los glóbulos de grasa son de un diámetro promedio de 3 μm y el tamaño de las partículas de proteína son de un

diámetro promedio de 120 nm; cuando la luz incide en ellas, se producen los efectos de dispersión, donde una parte de la luz que incide es reflejada, otra transmitida y otra absorbida (Zhu et al., 2016). Cuando la muestra de leche es homogenizada, el tamaño de las partículas de grasa se reducen aproximadamente a 1 μm y los micelios de proteína no son afectados de manera significativa (Andrey Bogomolov et al., 2013).

Los análisis utilizando espectrofotometría en infrarrojo cercano o mediano, y análisis ultrasónicos, a pesar de ser simples y no destruir las muestras, presentan la desventaja de no poder ser implementados en aplicaciones en línea debido principalmente al procesamiento de grandes cantidades de datos (Zhu et al., 2016). Además, de acuerdo con nuestra revisión de la literatura, la mayoría de los trabajos se basan en analizar la modulación en la intensidad del espectro para relacionar el contenido de grasas en leche de vaca cruda; sin embargo, este análisis es sensible a dobleces en la fibra óptica y variaciones en la potencia de la fuente de luz utilizada. En contraste, la modulación por fase ofrece inmunidad a los efectos mencionados. En nuestro conocimiento, solo algunos trabajos se han reportado utilizando esta técnica para detectar grasas y proteínas en leche. Una de las técnicas utilizadas para detectar cambios en la composición de una muestra utilizando la modulación por fase, es la interferometría. Dentro de estos, se encuentran los interferómetros Fabry-Perot extrínsecos (EFPI, por sus siglas en inglés de *extrinsic Fabry-Perot interferometer*), que ofrecen una baja complejidad en la implementación, una buena relación costo-beneficio y un modo de operación en reflexión. Con algunas desventajas como la calibración en la operación, un proceso complicado de demodulación y sensibilidad a la temperatura.

Resultado de lo anterior, detectamos un área de oportunidad para el desarrollo de nuevas técnicas aplicadas a la determinación de los parámetros principales de la calidad de la leche. Determinando que es necesario el desarrollo de una técnica no invasiva para la estimación de grasa y proteína en leche cruda de vaca, con la capacidad de poder ser implementada tanto en un sistema en línea, como en instrumentos de determinación fuera de línea. Con el desarrollo de técnicas

fáciles de implementar, de bajo costo y con alta exactitud, es posible generar sistemas de estimación de costo apropiado para el sector de los pequeños productores, así como la generación de equipos altamente especializados para laboratorio.

1.3. Hipótesis

Un sistema no invasivo de procesamiento de señales ópticas basado en un interferómetro tipo Fabry-Perot es capaz de estimar el contenido de grasa y proteína en leche de vaca con una exactitud sin diferencia significativa comparado con los métodos de laboratorio.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo General

Diseñar y desarrollar un sistema no invasivo de procesamiento de señales ópticas basado en un interferómetro tipo Fabry-Perot para estimar el contenido de grasa y proteína en leche de vaca.

1.4.2. Objetivos Específicos

1. Desarrollar un sistema no invasivo de procesamiento de señales ópticas basado en interferómetro Fabry-Perot para estimar el contenido de grasa y proteína en leche de vaca.
2. Implementar el sistema de procesamiento de señales ópticas basado en interferómetro Fabry-Perot para estimar el contenido de grasa y proteína en leche de vaca.
3. Validar el sistema de procesamiento de señales ópticas basado en interferómetro Fabry-Perot para estimar el contenido de grasa y proteína en leche de vaca.

Capítulo 2

2. Revisión de Literatura

En esta sección se presentan los hallazgos encontrados en la literatura actual tanto en un ámbito nacional como internacional. La información se presenta en dos partes: antecedentes y marco teórico. En los antecedentes se encuentra el estado del arte, revisando las técnicas publicadas para la determinación de la composición de la leche, los registros de patentes relacionados con sistemas para la detección de los principales parámetros de calidad en leche de vaca y, por último, los productos comerciales para la determinación de la calidad de la leche. En el marco teórico se pueden consultar las definiciones y técnicas principales relacionadas con las técnicas para la determinación de grasas y proteínas en leche de vaca, así como una introducción a la técnica de interferometría.

2.1. Antecedentes

2.1.1. Propiedades ópticas de la leche

La interacción entre la luz y la leche está gobernada por una relación entre el tamaño de las partículas suspendidas y la longitud de onda de la luz que incide en ella (Aernouts et al., 2015; C. Crofcheck et al., 2005; Yin et al., 2015). Considerando que las grasas tienen un diámetro entre 0.1 y 10 μm (C. L. Crofcheck et al., 2002; Stocker et al., 2016), y las proteínas tienen un diámetro entre los 50 y 650 nm (Stocker et al., 2016), la interacción estará descrita por la teoría Lorenz-Mie (Regnima et al., 2017). Esto considera que las moléculas involucradas son como una partícula esférica y la longitud de onda de la luz incidente es más pequeña que

el tamaño de ellas, relación descrita por $0.1 \lambda < P < \lambda$, donde P es el tamaño de la partícula, y λ es la longitud de onda de la luz incidente (Hulst y van de Hulst, 1981; Mäntele y Deniz, 2017). Como consecuencia, la luz dispersada por la leche contiene información relevante acerca de esas partículas y puede ser utilizada para determinar la calidad de la muestra de leche. La mayoría de la luz dispersada se realiza en dirección frontal con respecto de la luz incidente (Figura 1); además, la temperatura de la leche cuando sale de la ubre es de aproximadamente $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, por lo que las partículas se encuentran lentamente suspendidas y el movimiento Browniano puede ser descartado (Regnima et al., 2017).

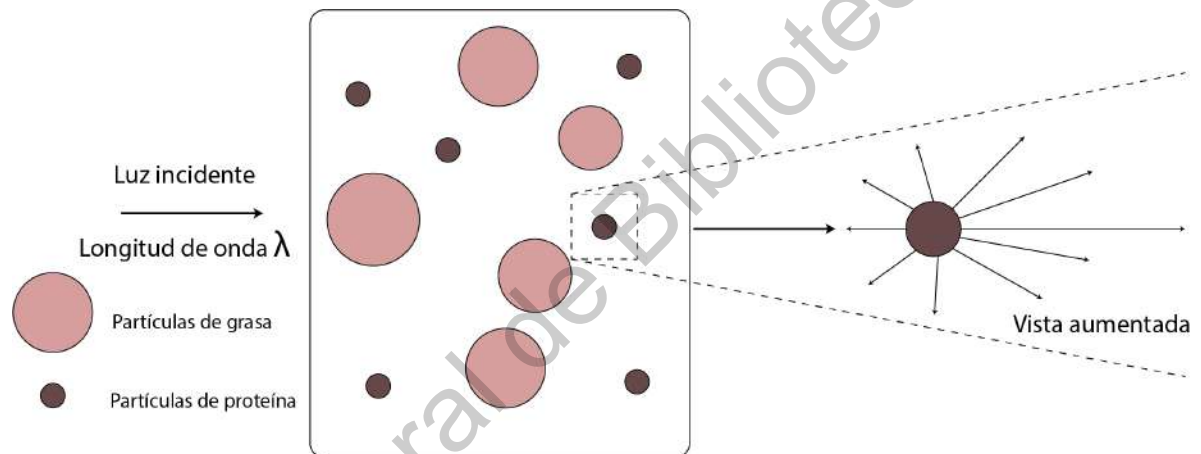


Figura 1 - Efectos de dispersión causados por las partículas de grasa y proteína en la leche. La longitud de onda incidente es mas pequeña que el diámetro de las partículas. En la vista ampliada, se representa la anisotropía de dispersión de Mie.

Adaptado de (Gastélum-Barrios et al., 2020).

Es importante mencionar que la concentración y el tamaño de las partículas que se encuentran en la leche, la convierten en un medio turbio y opaco. Sin embargo, la intensidad de la dispersión en dirección frontal de la luz transmitida (I_s), cuya aportación es la mayor en la dirección de la dispersión, puede ser descrita por (Xin et al., 2006)

$$I_s = I_o e^{-\mu_s * d}, \quad (1)$$

dónde I_o es la intensidad de la luz incidente, μ_s es el coeficiente de dispersión del medio, y d es la longitud del contenedor de la muestra de leche (la distancia de interacción luz-leche).

2.1.2. Técnicas espectroscópicas para la determinación de la calidad de la leche

Las interacciones entre la luz y las partículas que componen la leche pueden ser estudiadas por la espectroscopía, aquí diversos fenómenos pueden ser evaluados (Penner, 2017). La espectrofotometría está compuesta por tres partes principales: la fuente de luz, la muestra y el detector (Figura 2). La fuente de luz puede variar desde una lámpara de tungsteno, láser, diodo emisor de luz (LED, por sus siglas en inglés), o una fuente de luz supercontinuo. La luz generada viaja a través de la fibra óptica hasta el detector, que puede ser un analizador de espectros ópticos, una termopila o un fotodetector. La muestra por analizar es depositada en un contenedor, usualmente se utiliza una celda de cuarzo de 1 mm de paso. En casos específicos, puede ser necesario agregar acoplamientos que modifiquen las propiedades de la luz como los atenuadores o lentes (Valle-Atilano et al., 2016). En este punto, muchas configuraciones pueden ser utilizadas, destacando los interferómetros, con los que es posible separar y recombinar el haz de luz (mas adelante se discutirá sobre ellos).

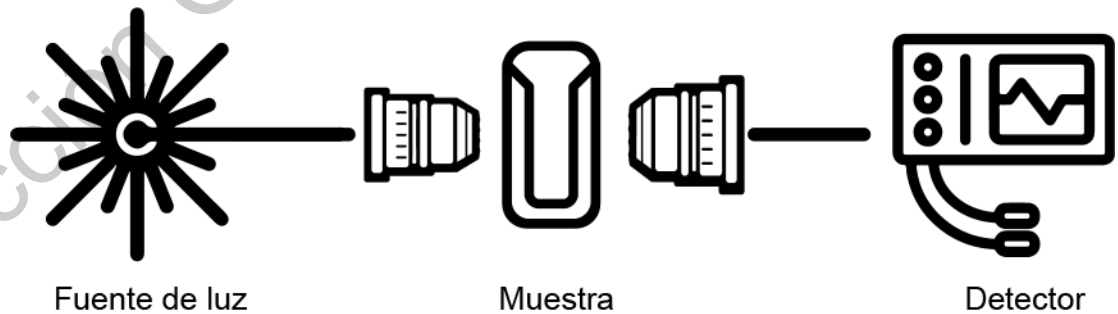


Figura 2 - Diagrama general de los métodos espectrofotométricos. Adaptado de (Gastélum-Barrios et al., 2020).

A continuación, las técnicas encontradas en la revisión de la literatura serán mostradas de acuerdo con la longitud de onda y solamente se mencionarán las que involucran interacciones entre la luz y la leche para determinar y/o estimar parámetros de su composición.

2.1.2.1. Técnicas en el rango UV

Los primeros usos de la luz UV están relacionados con los procesos de pre-homogenización de las muestras de leche cruda (Nakai y Le, 1970). Aquí, una mezcla de reactivos se utiliza para dispersar los glóbulos de grasa y realizar una espectrofotometría para la determinación de grasas y proteínas. Para la estimación de proteínas totales, los autores midieron la absorbancia a 280 nm después de añadir 5 mL de ácido acético diluido al 97% de volumen en 0.05 mL de leche. Para la determinación de grasas, los autores añadieron una solución de 20% de urea y 0.2% de imidazol, midiendo la absorbancia a 400 nm. El uso de reactivos elimina la necesidad de previamente aplicar la homogenización de la muestra, sin embargo, existen un riesgo de irritación en la piel por la manipulación de ellos.

Posteriormente, Kuaye (1994), presentó un método basado en el uso de una solución alcalina para cambiar la respuesta óptica de la tirosina, demostrando que la absorción puede ser desplazada a otras longitudes de onda en el rango de 248 a 256 nm, generando una relación lineal para estimar proteínas. Antes de realizar la prueba, la muestra debe ser filtrada.

Algunos años después, Lüthi-Peng y Puhan (1999), desarrollaron una técnica simple y rápida para determinar el contenido de proteínas y caseínas en leche de vaca basados en la espectrofotometría en las bandas de 283.5 y 294.5 nm. Además, si el método se compara con el de Kjeldahl (International Dairy Federation, 2001), no se reportan diferencias significativas. Sin embargo, para utilizar la técnica, es necesario realizar una preparación de la muestra, que consiste en calentar, homogenizar y preservar la muestra, convirtiendo el método en uno de alto consumo de tiempo.

Forcato et al. (2005) propusieron un método alternativo para estimar el contenido de grasas en leche basado en la espectrofotometría en el rango UV desde los 208 hasta los 215 nm. Los autores utilizaron una mezcla de 3 mL de etanol para precipitar las proteínas y evitando que estas interfirieran con el análisis. La mezcla luego es guardada por 1 h a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, luego centrifugada por 15 min a 13,000 rpm. Los resultados fueron comparados con el Milko-Scan, instrumento mayormente utilizado en la industria lechera, mostrando precisión y exactitud aceptable.

2.1.2.2. Técnicas en el rango VIS

Los métodos turbidimétricos fueron utilizados en los análisis de laboratorio hasta que G. Haugaard and J. D. Pettinati (1959), presentaron el primer método fotométrico basado en la dispersión de la luz a 600 nm para estimar el contenido de grasas.

Xin et al. (2006), presentaron un método para determinar grasas y proteínas de leche basados en un rayo láser a 632.8 nm. Las muestras de leche fueron preparadas añadiendo una mezcla de reactivos químicos para diluir la leche, además de aplicar un proceso de homogenización. Las partículas de grasa y proteína permanecen de un tamaño de 2,000 y 120 nm respectivamente. Los autores aseguran que el resto de las partículas que componen la leche, como lactosa, sales, entre otros, pueden ser ignoradas ya que sus tamaños permanecen muy por debajo del tamaño de las partículas de grasa y proteína.

Por otra parte, Muniz et al. (2009), mencionaron el beneficio de los sistemas desarrollados en el rango VIS debido a su bajo costo (comparándolo con el resto de los rangos de la luz). Añaden, además, el beneficio de utilizar análisis matemáticos como mínimos cuadrados parciales (PLS, por sus siglas en inglés), o regresión de componentes principales (PCR, por sus siglas en inglés), mostrando que los resultados pueden mejorarse.

Algunos años después, Andrey Bogomolov et al. (2012), desarrollaron una técnica para estimar la cantidad de grasas y proteínas totales. Demostraron que la dispersión de la luz en el rango visible predomina para las grasas y proteínas. Los

autores capturaron el espectro de absorción desde los 400 hasta los 1,000 nm, asegurando que el rango es apropiado para implementarse en un sistema online. Sin embargo, el diseño experimental tuvo un rango corto, la variación de la proteína de las muestras fue entre 2.60 y 3.20%, mientras que para las muestras de grasa fue entre 3.02 y 3.98%. Por esta razón, una implementación en un ambiente real no podría ser confiable.

En una aproximación totalmente distinta, Kucheryavskiy et al. (2014), analizaron la transmisión de la luz a través de muestras de leche correlacionándolas con grasas y proteínas totales utilizando procesamiento de imágenes. Las imágenes fueron adquiridas por una cámara convencional, se utilizaron LEDs rojo, verde y azul, dentro de una cabina totalmente oscura. Antes de que las imágenes fueran adquiridas, los autores ajustaron el tiempo de exposición de la cámara, dando oportunidad al sensor de capturar más luz. Ellos aseguran que es posible correlacionar la cantidad de grasa y proteína en leche cruda de vaca analizando los aros concéntricos que se generan con el sistema. Este método provee el desarrollo de un sistema práctico y de bajo costo para ser implementado en sistemas online.

Más recientemente, Gowri et al. (2019), desarrollaron una sonda de fibra óptica para estimar el contenido de grasa en leche. Experimentalmente ellos demostraron que las alteraciones con agua en muestras de leche pueden ser detectadas analizando los cambios en el RI. La luz que se absorbe se reduce cuando la cantidad de agua aumenta en la muestra de leche. A 530 nm, los mejores resultados fueron obtenidos con una sensibilidad de 0.15 abs/% de grasa. Esta técnica se destaca como una solución fácil de establecer para determinaciones rápidas del contenido de grasa; sin embargo, la sonda debe ser limpiada durante 3 min después de cada determinación.

2.1.2.3. Técnicas en el rango IR

La opacidad en la leche es causada por la dispersión creada por las longitudes de onda más pequeñas que los glóbulos de grasa en la región VIS. Este fenómeno no ocurre en el rango infrarrojo cercano (NIR, por sus siglas en inglés),

debido a que las ondas electromagnéticas en este rango son de mayor tamaño que el diámetro de los glóbulos de grasa. Basado en esta premisa, Goulden (1964), presentó los principios de un método para realizar un análisis cuantitativo de la grasa, proteína, lactosa, sólidos totales y sólidos no-grasos de la leche utilizando absorción infrarroja (IR, por sus siglas en inglés). Casi tres décadas después, Luinge et al. (1993), propusieron el uso de la transformada de Fourier (FT, por sus siglas en inglés) en la espectrometría IR como una alternativa para las determinaciones de grasa, proteína y lactosa. De acuerdo con los autores, la espectroscopía IR utilizando FT (FTIR), en combinación con algún método de regresión como PLS o PCR, es recomendado para el análisis online de grasa, proteína y lactosa.

En este sentido, Šašić y Ozaki (2001), presentaron un estudio donde las muestras de leche cruda fueron analizadas en el rango de 700 a 1,100 nm, conocido como infrarrojo cercano de onda corta (SWNIR, por sus siglas en inglés). Presentaron el potencial de las longitudes de onda en el SWNIR para realizar tanto análisis cuantitativos como cualitativos. Se utilizaron modelos de calibración PLS para realizar predicciones de grasa, proteína y lactosa; sin embargo, los autores solamente obtuvieron resultados fiables para grasa y proteína. La banda de los 930 nm presentó el mejor resultado para los modelos de calibración aplicados a grasa. Para proteína, las bandas de los 906, 926, 950, 864 y 1,032 nm obtuvieron los mejores resultados.

Tomando las ventajas de las técnicas de espectroscopía de transmisión, Woo et al. (2002), desarrollaron una unidad de medición llamada MilkSpec-1 que determina el contenido de grasa, proteína y lactosa en un ensayo no destructivo. Las muestras de leche cruda no se homogenizaron y se insertaron en un sistema utilizando tubos cristalinos de uso genérico. El espectro NIR obtenido con el sistema es pre tratado con la corrección de dispersión multiplicativa (MSC, por sus siglas en inglés), y es derivada para disminuir los efectos de dispersión causados por los glóbulos de grasa y los micelios de caseína. Los autores encontraron variaciones del contenido de grasa en la banda de los 926 nm en el espectro MSC, y absorción

en la banda de los 1,020 nm del espectro MSC con la segunda derivada para los cambios de proteína.

Un par de años mas tarde, Etzion et al. (2004), determinaron el contenido de proteínas en leche cruda basados en las mediciones de absorbancia en dos rangos de longitudes de onda: 5,882-6,666 y 9,090-9,433 nm. En la banda al rededor de los 6,097 nm puede encontrarse la presencia de agua, y para evitar esta absorción se aplica una extracción del espectro (Rahmelow y Hübner, 1997). Para la cuantificación de la proteína, tres métodos de procesamiento de datos fueron implementados: la integración del espectro de las bandas amidas, PLS, y análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) con redes neuronales artificiales (ANN, por sus siglas en inglés). Los autores destacan que, utilizando los parámetros de grasa y lactosa como variables de entradas, las predicciones de proteína resultan con un menor error. A pesar de que el error en las predicciones es bajo (menos del 0.5%), los rangos de proteína de las muestras utilizadas son cortos, de 2.47 a 3.95%; por esto, al aplicar este método en un sistema real, las muestras de leche podrían resultar fuera de este rango y los modelos de calibración no serían capaces de realizar estas estimaciones de manera confiable.

Kawamura et al. (2007), reportaron un sistema de monitoreo online para la estimación de grasa, proteína y lactosa en el rango de los 600 a los 1,050 nm. El sistema recolecta una muestra de 230 mL de leche dentro de una cámara donde un sensor obtiene el espectro de transmisión cada 10 s. Los autores integraron modelos de calibración aplicando PLS sin realizar pre-procesamiento al espectro. Los resultados muestran un error de predicción (SEP, por sus siglas en inglés) para grasa, proteína y lactosa de $r^2 = 0.95$, $SEP = 0.42\%$; $r^2 = 0.91$, $SEP = 0.09\%$; y $r^2 = 0.94$, $SEP = 0.05\%$, respectivamente. Los autores mostraron que, para una estimación online, no es necesario realizar homogenización a las muestras de leche, ni pre-tratamientos al espectro obtenido. Un año después, Kawasaki et al. (2008), mejoraron el desarrollo. Sin embargo, los autores destacan que es necesario mantener los modelos matemáticos actualizados de manera periódica para obtener resultados confiables.

Posteriormente, basándose en las longitudes de onda VIS y NIR, y analizando el espectro de reflexión y transmisión, Aernouts et al. (2011), investigaron la mejor técnica para estimar grasa, proteína, lactosa y urea en leche cruda de vaca. Los resultados presentados muestran que el espectro de reflexión es preciso para estimar grasa y proteína, y el espectro de transmisión para estimaciones de lactosa. Ninguno de los espectros (reflexión ni transmisión) mostraron resultados adecuados para estimar el contenido de urea. Los autores destacan que el rango de longitudes de onda comprendido de los 400 a los 1,000 nm no contiene información precisa para estimar el contenido de grasa, por lo que todo el rango VIS fue descartado para mejorar los modelos de predicción.

Algunos meses después, Muñoz-Ossa et al. (2011), desarrollaron un sensor adelgazado ("*taper*") de fibra óptica para medir el contenido de grasa en leche fresca. El *taper* consiste en adelgazar una sección de la fibra para incrementar la sensibilidad con el medio que la rodea. Como resultado, los micelios de grasa se abarrotan en la región adelgazada y la potencia óptica de la señal es atenuada. La señal decrece a razón de 0.00425 mW cada que el contenido de grasa aumenta en 1%. Este método invasivo puede mejorar la linealidad del resultado con un *taper* de mayor diámetro, pero bajaría la sensibilidad.

Por otro lado, Melfsen et al. (2012), diseñaron y evaluaron un sistema en línea para predecir las concentraciones de grasa, proteína, lactosa, urea y conteo de células somáticas. El sistema analiza el espectro en el rango de 851 a 1,649 nm, durante el proceso de ordeña. Antes de que las muestras sean medidas, se obtiene un espectro de referencia oscuro y blanco. El espectro es medido varias veces durante el proceso de ordeña cada 500 ms en una capa con un espesor de 30 mm y cada 2 kg de leche analizada, el espectro es promediado. Los autores muestran que durante el proceso de ordeña el espectro está cambiando, y la intensidad de la reflexión incrementa con el incremento del tiempo de ordeña. Este cambio en el espectro es atribuido a los efectos de dispersión provocados por el tamaño de las partículas. Para evitar los desplazamientos en intensidad, el espectro es normalizado. Sin embargo, este procesamiento del espectro puede desprestigiar datos

importantes que pueden estar relacionados a los parámetros de interés. Por otro lado, los autores mencionan que este tipo de análisis (procesamiento en el NIR) no obtendrán resultados de la exactitud recomendada para un análisis de laboratorio.

Al siguiente año, Feng et al. (2013), basándose en la espectrometría en el rango NIR no-disperso de onda-corta desde los 600 a los 1,100 nm y regresiones PLS, determinaron grasa, proteína y lactosa de muestras de leche no homogenizadas. El analizador está compuesto por un rayo simple, y puede realizar estimaciones cada minuto, donde 30 s son utilizados para calentar la muestra de leche y 30 s para realizar la medición. En este procedimiento se utiliza la absorbancia de las longitudes de ondas seleccionadas de acuerdo con la banda de probabilidad de determinación que se asignó para cada componente.

Las propiedades ópticas en masa de la leche cruda de vaca pueden servir para relacionar su composición en grasa, proteína, lactosa, entre otras, con las propiedades físicas como la distribución de glóbulos de grasa y el tamaño de los micelios de caseína (B. Aernouts et al., 2015). Lo anterior fue utilizado por Aernouts et al. (2015) para el desarrollo de un sistema óptico para medir la reflexión y transmisión total de muestras de leche en una cubeta de cuarzo de 600 μm de paso, sistema compuesto por un laser supercontinuo en el rango de los 550 a los 2,250 nm. Los autores encontraron una correlación máxima de $r = 0.762$ entre el contenido de grasa y el coeficiente de absorción en masa en el rango NIR, y una correlación máxima de $r = 0.975$ entre la grasa y el coeficiente de dispersión en masa en el rango de los 1,300 a los 1,400 nm. Demostrando que el estudio de las propiedades ópticas en masa puede servir para describir la interacción entre la fuente de luz y un medio turbio, en este caso la leche.

Con el uso de un sensor de fibra óptica con forma de W, Zhu et al. (2016), desarrollaron un método para la determinación rápida de grasa en leche cruda. El sistema evaluó la leche en distintas temperaturas, encontrando como óptimo el análisis a 40 °C. El sistema está equipado con una fuente de luz con una longitud de onda centrada en los 1,060 nm, dividiendo el haz de luz y viajando por la fibra en forma de W. Un rayo interactúa con la superficie de la leche, y el segundo con agua

destilada. Después, la luz reflejada es capturada por dos detectores. Los autores muestran un error de $\pm 3\%$; sin embargo, el rango de las muestras de leche utilizadas como referencia, muestran una composición de grasa entre 0.17 y 0.23%. Por otro lado, el rango de temperaturas utilizadas para el análisis no muestra diferencias significativas entre los tratamientos (25, 30, 35, 40 y 45 °C).

Con el apoyo del análisis de PLS, Niero et al. (2016), investigaron la capacidad del rango infrarrojo medio para predecir el contenido de proteínas en leche de vaca. Las muestras fueron preservadas con una mezcla y almacenadas a 4 °C. Se obtuvieron los espectros de 110 muestras con el instrumento MilkoScan FT6000 (Foss Electric A/S, Hullerød, Dinamarca), y la absorbancia fue calculada y se obtuvieron modelos de calibración eliminando las regiones del espectro donde el agua absorbe luz. Los autores reportan como la mejor predicción de los modelos para estimar proteínas con una $R^2 = 0.88$. Para ser utilizado como un método fiable de correlación, es necesario actualizar los modelos de calibración constantemente.

Ragni et al. (2016), presentaron un sistema fácil de implementar y de bajo costo basado en la luz que emite un material y que es detectado por un fotodiodo en el rango NIR. Se utiliza una lámpara de tungsteno la cual varía su intensidad con una señal digital de referencia, y el fotodiodo captura la luz transmitida a través de la muestra de leche. Los autores atribuyen una alta influencia del contenido de grasa a los efectos de dispersión de la luz, destacando la región entre los 800 y 900 nm como la región con mejor correlación. Cuando el contenido de grasa en la leche aumenta, la irradiación detectada por el fotodiodo disminuye. Al sistema le fue adherido una ANN, reportando una predicción con una $R^2 = 0.992$. A pesar de los resultados reportados, los efectos de la temperatura representan un problema para el sistema ya que no presentan inmunidad. Por otro lado, se requieren de calibraciones constantes de los modelos de predicción, así como reemplazos constantes de la lámpara, ya que la modulación por amplitud se verá afectada con la degradación de esta.

Durante el mismo año, Li et al. (2016), presentaron una determinación rápida de grasa y proteína en leche cruda de vaca, aplicando diferentes técnicas como

eliminación de ruido en el espectro para remover los efectos de las partículas sólidas, la dispersión en la superficie, se aplicaron algoritmos genéticos y PLS para la construcción de juegos de calibración de las muestras seleccionadas. Los resultados de validación muestran para proteína una $R^2 = 0.8010$ y para el contenido de grasa una $R^2 = 0.91$. A pesar de los resultados, el rango de las composiciones de las concentraciones de proteínas y grasas de las muestras fue bastante corto (2.82-3.39% y 3.28-4.18%, correspondientemente), además de que el rango de longitudes de onda utilizado (2,564 a 25,000 nm) es donde la presencia de agua muestra interferencia, así como otros componentes de la leche. Las muestras de leche no fueron homogenizadas y los efectos de dispersión no fueron tomados en cuenta.

2.1.2.4. Revisión de patentes

Dentro de las patentes relacionadas con técnicas para la determinación de grasa y proteína en la leche, podemos destacar las siguientes.

La patente US2112374A del año 1938, describe la invención para la determinación del contenido de grasa en leche, crema y productos lácteos. El autor destaca que el método puede ser aplicado por personal sin experiencia de manera rápida, fácil y en cualquier parte sin la necesidad de alguna preparación especial, ni el uso de equipo especializado como una máquina centrífuga, baño maría, o el uso del ácido sulfúrico —el cual ha sido utilizado en otras técnicas más antiguas—. La característica principal del método es que la muestra de leche se agita y mezcla con otros solventes como alcohol, en un butirómetro.

La patente US4663530A concedida en el año 1987, detalla un método para la determinación cuantitativa del contenido de grasa en productos lácteos. Basados en la técnica por el análisis del espectro de transmisión/absorción en el IR, correlacionan los enlaces de carbón hidrógeno en la banda de los 6,840 nm. Este método no necesita la dilución de las muestras de leche, lo cual lo convierte en un método rápido. Los autores destacan la ventaja de medir la concentración de grasa

en este rango espectral debido a la baja interferencia debido a la absorbancia producida por el contenido de agua y otros minerales.

La patente US4980295A del año 1990, describe un método para determinar de manera rápida y precisa el contenido de grasa tanto en productos lácteos como otros. El método se basa en la solubilización de la grasa del producto a analizar, en tetracloroetileno. Posteriormente, se disuelve la solución anterior con un solvente polar orgánico como el ácido acético, para obtener una suspensión que finalmente es analizada mediante dispersión óptica. La luz dispersada a una máxima turbidez de la muestra se compara con una curva estándar generada con una muestra pura de grasa.

Por otro lado, la patente WO1992017767A1 publicada en el año 1992, describe un método para la determinación cuantitativa del contenido de grasa en una emulsión con partículas de grasa. El método utiliza la absorción de la luz en el rango IR, midiendo la absorbancia específica en el rango entre 8403.36 y 8620.69 nm. Cuando este método se aplica a muestras de leche o subproductos, el efecto de la lactosa se debe tomar en cuenta como factor de corrección. Los autores mencionan que este método no requiere de una pre-homogenización de la muestra.

La patente con número US7704744B2 y publicada en el año 2010, describe la aplicación de dos métodos basados en la absorbancia en el IR para determinar el contenido de caseína en leche. El método consiste en medir el espectro de absorción antes y después de la separación de la caseína en la muestra, posteriormente los datos recolectados se analizan tomando como referencia el método de determinación Kjeldahl. Una de las grandes características de este método, comparado con otros, es la necesidad de añadir ácidos específicos para realizar la separación de los micelios de caseína; la obtención de los datos espectrales se realiza con instrumentos independientes; se requiere de la aplicación de un factor de corrección debido a la dilución de las muestras de leche; y el análisis de los datos espectrales tiene que realizarse con un programa independiente.

Para el año 2015, la patente con número de publicación WO2015191002A1, describe un método para relacionar la intensidad de fluorescencia con el contenido

de grasa en leche. El método realiza una dilución de la muestra de leche en combinación con un componente químico haciendo que la mezcla, después de ser incubada por una cantidad de tiempo suficiente, emita fluorescencia. Esta irradiación, se puede detectar y cuantificar, comparándose con una mezcla sin la adición de leche; es entonces cuando se puede realizar una medición correlacionando la intensidad de la fluorescencia con el contenido de grasa en la muestra de leche. La fluorescencia se puede detectar en el rango de los 530 a los 700 nm analizando los cambios de colores producidos: el cambio de color en la fluorescencia a un color amarillo indica la presencia de leche entera en el medio líquido; el cambio a un color rosado-anaranjado, indica la presencia de leche baja en grasas; el cambio en el color de la fluorescencia a un rosa pálido, indica la presencia de leche descremada en el medio líquido.

Durante el mismo año, se encuentra publicada la patente WO2015040626A1, describiendo un análisis cuantitativo de los componentes en muestras de leche. Este analizador de leche contiene una sonda de fibra óptica implementada en modo de reflexión difuso aunado a un espectrómetro NIR. La sonda de fibra óptica transmite una luz en una longitud de onda pre-seleccionada en el rango entre los 600 y los 1,100 nm hacia la muestra de leche recibiendo la reflexión de la luz desde la muestra de leche. Todos los componentes se encuentran integrados en un sistema compacto, incluyendo un controlador y una pequeña pantalla para visualizar los resultados del análisis del espectro. El sistema analiza durante dos segundos el espectro de reflexión aplicando técnicas espectrofotométricas. Una vez que se analiza la muestra, el sistema debe ser purgado y lavado para poder realizar un siguiente análisis.

2.1.2.5. Antecedentes tecnológicos

Dentro del mercado actual, podemos encontrar diversos sistemas comerciales para la determinación de los principales parámetros de la calidad en leche de vaca, dentro de estos parámetros encontramos las grasas y las proteínas totales.

La empresa Afimilk Ltd. (Kibbutz Afikim, Israel), desarrolló un sistema para la determinación en línea de la cantidad de grasa, proteína y lactosa de cada vaca instalado directamente en una estación de ordeña llamado Afilab Milk Analyzer[®] (Figura 3). Mediante el análisis de los componentes de la leche, el sistema es capaz de generar información anticipada para detectar enfermedades y condiciones genéticas como cetosis, mastitis y acidosis ruminal. Los datos analizados se envían a un sistema central, permitiendo al productor tomar decisiones inmediatamente después de que la vaca abandona el puesto de ordeño. Asimismo, con la ayuda del software especializado con el que cuentan, el sistema es capaz de detectar la presencia de sangre en la leche conforme se realiza la ordeña, deteniendo de inmediato el ciclo de ordeña para evitar la contaminación de los contenedores de leche.



Figura 3 - Sistema automático AfiLab Milk Analyzer[®] para la detección de grasa proteína y lactosa en leche de vaca (Afimilk, 2020).

Otro instrumento desarrollado es el llamado TIDAS P Milk Inspector[®] (J & M Analytik AG, Alemania), el cual tiene la capacidad de medir el porcentaje de grasa, proteína y masa seca en leche a un bajo costo (Figura 4). Las mediciones se realizan de manera continua durante el proceso de ordeña. El sistema utiliza el principio de espectroscopía en el rango de los 380 a los 1,050 nm tomando en

cuenta la dispersión de la luz causada por las propiedades de la leche. Los fabricantes reportan que el sistema tiene una desviación en sus predicciones de 0.05% para grasa y 0.03% para proteínas.



Figura 4 - Analizador de leche en línea TIDAS P Milk Inspector® (J & M Analytik, 2020).

La empresa Milkotester Ltd. (Belovo, Bulgaria), ofrece una gama de productos relacionados con el análisis de la calidad de la leche. Por mencionar algunos, se encuentran la línea *Lactomat* y *Master*, por ejemplo el Lactomat Rapid BP® y el Master Pro Touch® (Figura 5), ambos con la capacidad de analizar grasa, proteína, sólidos no grasos, densidad, lactosa, sales, entre otros parámetros, utilizando el principio de ultrasonido. Los sistemas pueden realizar una determinación en un tiempo desde los 18 hasta los 60 s (dependiendo el modelo y el tipo de leche a analizar) y en un rango de temperaturas de la muestra de 1 a 45 °C. Ambos sistemas son capaces de analizar leche de vaca, borrego, cabra, mezclas, descremada, suero de leche y otros tipos y derivados.



Figura 5 - Sistemas Lactomat Rapid BP® y Master Pro Touch®. Adaptado de (Milkotester, 2020).

Por otro lado, la compañía Milkotronic Ltd. (Nova Zagora, Bulgaria), desarrolló diversos equipos divididos como modelos básicos, avanzados y de laboratorio. Por mencionar uno, el Lactoscan MCCWS® (Figura 6), puede realizar mediciones cada 60 s de leche de vaca, borrego, cabra, búfalo, entre otras, utilizando el principio de ultrasonido. El sistema entrega el contenido de grasa, sólidos no grasos, densidad, proteína, lactosa, contenido de agua, entre otros parámetros.



Figura 6 - Sistema Lactoscan MCCWS[®] de Milkotronic Ltd (Milkotronic, 2020).

El equipo nombrado LactiCheck[®] mostrado en la Figura 7 (Weber Scientific, Nueva Jersey, EUA), es capaz de realizar una medición multi-paramétrica en 40 s. Aplicando técnicas ultrasónicas, el equipo muestra resultados del contenido de grasa, sólidos, proteína, densidad y lactosa, ya sea de leche de vaca, cabra, búfalo o borrego. El fabricante asegura una precisión de 0.3% para el análisis de grasa.



Figura 7 - Equipo LactiCheck® para determinaciones rápidas de parámetros de calidad en leche (Weber Scientific, 2020).

Utilizando el principio de ultrasonido, la empresa EON Trading Inc. (Sofia, Bulgaria), desarrolló una diversa gama de equipos analizadores de los principales parámetros en la calidad de la leche. Por mencionar uno, el Ekomilk TOTAL® (Figura 8) es un analizador ultrasónico capaz de determinar grasa, proteína, sólidos no grasos, lactosa, densidad, punto de congelación, agua añadida, pH, temperatura y conductividad en leche fresca de vaca, borrego y/o búfalo en 40 s.



Figura 8 - Ekomilk TOTAL ®, analizador ultrasónico de leche (EON, 2020).

La empresa alemana Boeco (Hamburgo, Alemania), desarrolló dos equipos para la determinación de parámetros de calidad en la leche. El más destacado, es el BOECO Milk Analyzer LAC-SP ® (Figura 9), capaz de determinar grasa, sólidos no grasos, densidad, lactosa, proteína, entre otros parámetros, de leche de vaca, borrego, borrego, cabra, búfalo, suero, crema y ultrapasteurizada. Este analizador utiliza el principio de ultrasonido para realizar las mediciones en una muestra de 25 mL de leche.



Figura 9 - Analizador de leche BOECO Milk Analyzer LAC-SP ® (Boeco, 2020).

Por otro lado, el equipo nombrado Milk Fat Analyzer LAMA-B10® (Figura 10) por la compañía Labtron Equipment Ltd. (Surrey, Reino Unido), se basa en el sistema de extracción en Soxhlet para la determinación de grasa y sólidos no grasos en leche. Este equipo integra todos los procesos como remojo, extracción, calentamiento, condensación y recuperación de solventes —como si fuera un laboratorio—, todo de manera automatizada y hasta en seis muestras simultáneas con un tiempo de análisis de 120 min.



Figura 10 - Milk Fat Analyzer LAMA-B10 (Labtron, 2020).

2.2. Marco teórico

2.2.1. Grasas

La leche de todos los mamíferos contiene grasas donde la concentración de esta varía entre especies del 2 al 50%. La principal función es servir como fuente de energía para el recién nacido. Son una importante fuente de ácidos grasos esenciales (que no pueden ser sintetizados por los animales superiores), vitaminas solubles en grasa (A, D, E, K), por el sabor y las propiedades reológicas de los productos lácteos y comidas en los que se utilizan.

La leche de bovino típicamente contiene ~3.5% de grasa, pero el nivel puede variar extensamente, dependiendo de distintos factores como la raza, la alimentación, la individualidad del animal, etapa de lactancia, temporada, nivel nutricional, salud, edad del animal, intervalos entre ordeñas y el punto en el que la

muestra es tomada. En las razas comunes europeas, las vacas Jersey tienen los más altos niveles de grasas y las Holstein/Fresian la mínima. El contenido de grasas en una vaca disminuye durante las primeras 4-6 semanas después del parto e incrementa continuamente durante el resto de la lactancia, especialmente hacia el final (Fox et al., 2015).

2.2.1.1. Tipos De Grasas

Los triglicéridos representan del 97 % al 98 % del total de grasas en la leche de la mayoría de especies (Fox et al., 2015). En la Tabla 1 podemos observar los distintos tipos de grasas y su cantidad para distintas especies.

Tabla 1 Composición de grasas simples individuales y fosfolípidos totales en leche de algunas especies (% de grasa total), creada con datos de (Fox et al., 2015).

Tipo de grasa	Vaca	Búfalo	Humano	Cerdo	Rata	Visón
Triglicéridos	97.5	98.6	98.2	96.8	87.5	81.3
Diglicéridos	0.36	0.7	0.7	2.9	-	1.7
Monoglicéridos	0.027	R	0.1	0.4	-	R
Ésteres de colesterol	R	0.1	R	0.06	-	R
Colesterol	0.31	0.3	0.25	0.6	1.6	R
Ácidos grasos libres	0.027	0.5	0.4	0.2	3.1	1.3
Fosfolípidos	0.6	0.5	0.26	1.6	0.7	15.3

R Rastro.

2.2.1.2. Métodos De Laboratorio Para Determinar Grasas

El primer método analítico para la determinación de grasa en alimentos fue desarrollado por Franz Soxhlet en el año 1879, el cual sigue siendo utilizado como un método de referencia. Una muestra previamente pesada de comida es puesta sobre un filtro de papel, donde se van haciendo extracciones con éter etílico hasta que la extracción de grasa está completa en un tiempo de 24 horas; el éter es

evaporado y el residuo de grasa es pesado en un frasco. Este método no es adecuado para líquidos, incluyendo la leche. Posteriormente, B. Röse en 1884 realizó unas modificaciones al método para después ser tomado por E. Gottlieb en 1892 y convertirlo en el método llamado Röse-Gottlieb, convirtiéndose en un método estándar para determinar grasa en leche y productos lácteos (aunque el procedimiento requiere de 8 horas). A pesar de que posteriormente, Mojonier en 1922, modificó este método agregando un aparato que permite acortar el tiempo de análisis, seguía siendo impráctico para el análisis de muchas muestras. En 1890, Babcock desarrolló un método donde se involucra el uso de ácido sulfúrico para disolver la proteína y medir el volumen de la grasa en un tubo de cristal especialmente calibrado, llamado butirómetro. En 1891, el Dr. N. Gerber desarrolló un método similar en principio al anterior, pero él incluía n-butanol para clarificar la columna de grasa y utilizaba distintos butirómetros, éste último método es muy usual para la determinación de grasa en Europa. Debido a la alta corrosividad del ácido sulfúrico, alrededor de 1960, un método turbidimétrico fue desarrollado, utilizado extensivamente hasta el desarrollo del método por espectroscopía infrarroja, alrededor del año de 1970 (Fox et al., 2015).

2.2.2. Proteínas

La función principal que tiene la proteína de la leche es la de suministrar a los pequeños mamíferos los aminoácidos esenciales que requieren para el desarrollo muscular y de otros tejidos. La leche de vaca contiene alrededor del 3.5 % de proteína. La concentración de la misma varía significativamente durante el periodo de lactancia, sobre todo en los primeros días posparto (Fox et al., 2015). Aproximadamente el 80 % de la proteína contenida en la leche de vaca corresponde a la caseína (Ng-Kwai-Hang et al., 1986), el otro 20 % de las proteínas encontradas en la leche, se encuentran en el suero. La caseína pertenece a las fosfoproteínas, conteniendo en promedio 0.85 % de fósforo, donde se destaca que los grupos fosfatos son los responsables de brindar muchas de las características importantes relacionadas a la caseína, especialmente la habilidad de enlazar grandes

cantidades de calcio, creando una proteína nutricionalmente muy valorada, principalmente para los mamíferos jóvenes. La caseína es sintetizada en las glándulas mamarias y no es encontrada en ningún otro lado de la naturaleza (Fox et al., 2015).

2.2.2.1. Métodos De Laboratorio Para Determinar Proteínas

El primer método para la determinación del contenido de proteínas en alimentos y tejidos fue desarrollado por Johan Kjeldahl en los Laboratorios Carlsberg, Copenhague, en el año de 1883. El método conocido como Kjeldahl sigue siendo el método estándar de referencia para determinar proteína en alimentos. Sin embargo, el método es lento y potencialmente peligroso, requiere equipo especializado incluyendo una campana de extracción de gases principalmente el dióxido de azufre que se desprende, y no es un método adecuado para un número grande de pruebas. Los aminoácidos tirosina y triptófano, absorben la luz ultravioleta (UV) a los 280 nm, permitiendo utilizarse para determinar la concentración de proteína en una muestra. A pesar de que la absorbancia UV es utilizada ampliamente en la bioquímica para determinar proteína, los micelios de caseína y los glóbulos de grasa hacen inadecuado éste método para determinaciones en leche (Fox et al., 2015).

Un método ampliamente utilizado en los laboratorios dedicados a estudios de la leche es el método de Lowry et al. (1951), el cual fue mejorado por Shen et al. (2013).

2.2.3. Interferometría

Una onda electromagnética está compuesta por un campo eléctrico \vec{E} y un campo magnético \vec{B} perpendiculares entre sí. Estos campos pueden considerarse como dos aspectos de un solo fenómeno físico, el campo electromagnético, cuya fuente es una carga en movimiento. Cuando la perturbación se genera en el campo

electromagnético, será una onda sin atadura que se moverá más allá de su fuente, donde los campos magnéticos y eléctricos se regenerarán uno al otro en un ciclo sin fin. Esto podemos visualizarlo en la Figura 11. La onda puede considerarse que viaja a una velocidad determinada v en dirección x , posicionada en un tiempo $t = 0$, puede representarse mediante la forma:

$$f(x, t) = A \cos[k(x - vt) + \phi], \quad (2)$$

donde A es la amplitud de la onda, ϕ es la fase de la onda, k representa la frecuencia de la oscilación de la onda y kx es el argumento de desplazamiento de la onda.

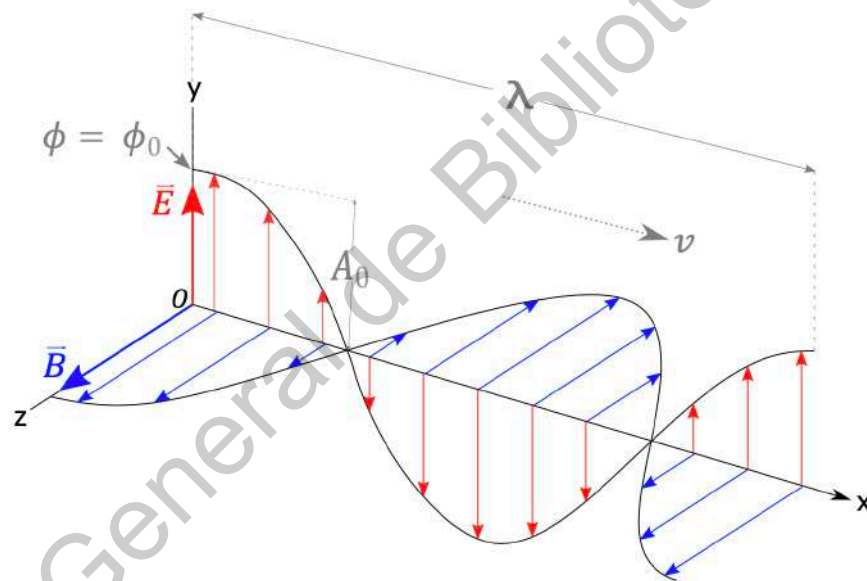


Figura 11 - Parámetros de una onda electromagnética linealmente polarizada (Saldaña Sanchez, 2018).

Cuando dos (o más) ondas se superponen, el resultado de esta interacción puede resultar en una anulación mutua en parte o por completo; sin embargo, en esta interacción podría resultar que en ciertas regiones donde las crestas o los valles resulten más pronunciadas que como originalmente las ondas involucradas las tenían. Una vez que la interacción de superposición ha concluido, las ondas individuales se separan y siguen su camino sin sufrir finalmente alteración alguna. Este principio es el de superposición: "la intensidad del campo eléctrico resultante

\vec{E} , en un punto en el espacio donde dos o más ondas de luz se superponen, es igual a la suma vectorial de las perturbaciones individuales" (Hecht, 2017); por lo tanto, la interferencia óptica será equivalente a la interacción de dos o más ondas de luz produciendo una irradiancia total resultante que se desvía de la suma de las irradiancias de los componentes. Para examinar su comportamiento, los sistemas interferométricos se dividen en dos tipos:

- División del frente de onda: se puede utilizar el frente de onda primario (dividiendo o separando el frente de onda) o fuentes independientes coherentes para emitir ondas secundarias que se reúnen para generar la interferencia.
- División de amplitud: la onda primaria se secciona en dos segmentos donde cada uno viajará por caminos distintos para finalmente recombinarse e interferir. Algunos ejemplos de este método son los interferómetros tipo Sagnac, Michelson, Mach-Zehnder y Fabry-Perot.

La diferencia de fase en el caso en donde los rayos provenientes de la misma fuente recorren diferentes caminos antes de interferir es:

$$\theta = k_0(DCO), \quad (3)$$

donde k_0 es el número de propagación de la onda en el vacío y DCO es la diferencia del camino óptico; es decir, la diferencia existente entre los trayectos por donde se propaga la energía. Por lo tanto, la irradiancia total I luego de ocurrir la interferencia queda descrita con la ecuación:

$$I = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cos\theta, \quad (4)$$

donde I_1 e I_2 son las irradiancias de cada rayo de luz. El término $I_{12} = 2\sqrt{I_1 I_2} \cos\theta$ se conoce como el término de interferencia (Hecht, 2017).

La irradiancia resultante puede ser mayor, menor o igual a la suma de las irradiancias individuales, y esto dependerá del término de interferencia. Es entonces, cuando esta interferencia generada, puede ser constructiva o destructiva y se puede calcular mediante el parámetro visibilidad definido por:

$$V = \frac{I_{max} - I_{min}}{I_{max} + I_{min}}, \quad (5)$$

donde I_{max} es la máxima amplitud e I_{min} es la mínima amplitud de la onda.

Si dos haces de luz deben interferir para producir una distribución estable, sus frecuencias deberían de ser casi iguales, ya que, si existe una diferencia entre sus frecuencias, produciría un desfase variación rápida, haciendo con esto que el término de interferencia I_{12} se promedie a cero durante el intervalo de detección. Por otro lado, cuando dos fuentes de luz blanca (luz con componentes rojas, verdes y azules) interfieren, las componentes rojas interferirán con las rojas, las verdes con las verdes y las azules con las azules. Para poder observar una distribución de franjas, las fases de los dos rayos de luz deberían de ser distintas; con esto, se obtendría una figura de interferencia ligeramente desplazada pero idéntica si entre las fuentes existe un desfase inicial, siempre que permanezca constante. A este fenómeno se le conoce como coherencia.

2.2.3.1. Interferómetro Fabry-Perot

Si bien se ha mencionado que existen cuatro tipos de interferómetros, en este trabajo se introduce al tipo Fabry-Perot —debido a la aplicación más adelante.

Este instrumento, en su forma más simple, consta de dos superficies planas paralelas, altamente reflectoras y que se encuentran separadas a una distancia d . Cuando la distancia entre las dos superficies reflectoras se puede variar mecánicamente al desplazar una de ellas, al arreglo se le conoce como interferómetro. Cuando las dos superficies (o espejos) se mantienen fijas, y se ajustan en paralelo con un tornillo, se le denomina etalón —a fin de cuentas, interferómetro en el sentido más amplio. En la Figura 12 se puede observar el interferómetro Fabry-Perot genérico. Cuando la luz entra a la placa, se refleja varias veces dentro de la cavidad, donde a su vez, una parte se transmite y otra se vuelve a reflejar, repitiendo este proceso. Cuando los rayos de luz que salen de la cavidad se dirigen hacia el lente convergente, y enfocados sobre una pantalla, interfieren formando un punto brillante u oscuro. Cualquier otro rayo S_2 , paralelo al original y

en el mismo plano de incidencia, formará un punto en el mismo punto P . Las múltiples ondas generadas en la cavidad y que finalmente llegarán a P , ya sea de S_1 o de S_2 , son coherentes entre sí. Sin embargo, los rayos S_1 y S_2 son incoherentes entre sí, por lo que no hay interferencia mutua, por lo que la contribución a la irradiancia total en el punto P será la suma de las contribuciones de las dos irradiancias.

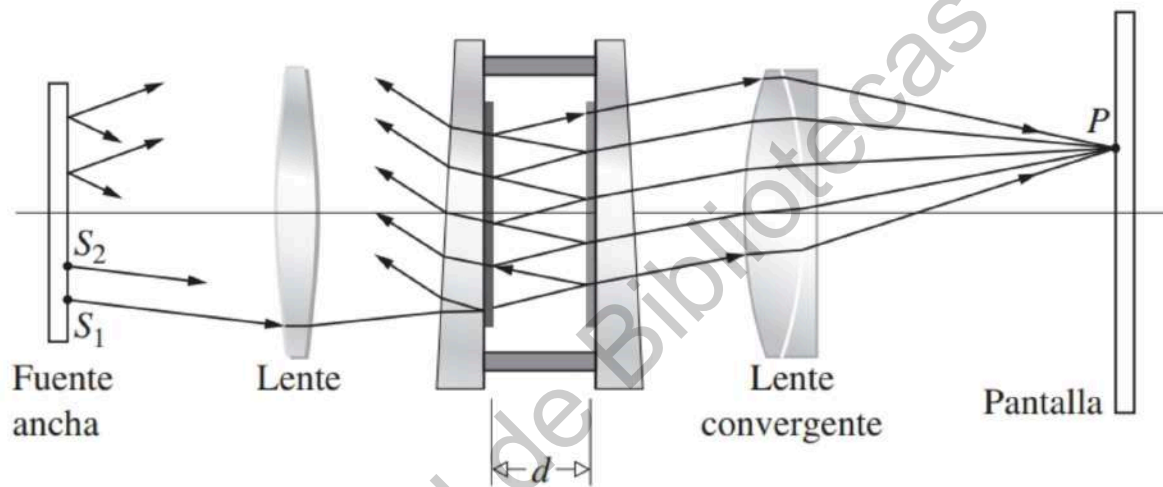


Figura 12 - Etalón Fabry-Perot (Hecht, 2017).

A medida que cambia la fase de las dos componentes presentes en la fuente (S_1 y S_2), los picos de la onda electromagnética se separarán. La diferencia de longitud de onda en la cual tiene lugar la superposición, $(\Delta\lambda_0)_{FSR}$, se denomina rango espectral libre (FSR, por sus siglas en inglés de "*Free Spectral Range*").

2.3. Generalidades de la fibra óptica

La fibra óptica es un fino hilo fabricado a partir de vidrio o plástico, por el cual es posible enviar señales ópticas (luz), guiadas internamente a través de una sección interna conocida como núcleo, siendo toda la parte externa (revestimiento) la encargada de mantener la luz dentro de la fibra reflejando la luz hacia el centro. Las fibras fabricadas con vidrio tienen menos pérdidas al compararse con las fabricadas de plástico.

Algunas de las ventajas de utilizar fibras ópticas es que al tener bajas pérdidas, se pueden utilizar con un menor número de repetidores; al tener un amplio ancho de banda, el costo por canal se reduce; poseen inmunidad a interferencias electromagnéticas y de radiofrecuencia; tienen la propiedad de tener alta sensibilidad y bajo tiempo de respuesta, por lo que son ampliamente utilizadas en la fabricación de sensores (Saldaña Sanchez, 2018).

Existen diferentes tipos de fibras, siendo las monomodo (SMF, por sus siglas en inglés de "*Single Mode Fiber*"), las caracterizadas por tener solamente un núcleo, siendo capaz de trasladar un haz de luz de forma axial a través de ella. Se compone de una región central de forma cilíndrica que posee un RI n_1 , un revestimiento el cual tiene un RI n_2 y su respectivo recubrimiento. Para que exista una reflexión total interna, se debe cumplir que $n_2 < n_1$ (Ley de Snell). Con estas fibras es posible alcanzar grandes distancias de transmisión con pocas pérdidas.

Similar a las anteriores, existen las fibras ópticas multimodo, que a diferencia de las monomodo, el núcleo es de mayor tamaño permitiendo que existan diferentes trayectorias para que la luz pueda viajar a través de ella. Por lo anterior, este tipo de fibras son muy utilizadas en sistemas de comunicación de alta velocidad (Howard R. Stuart, 2000).

Otro tipo de fibra son las llamadas fibra de cristal fotónico (PCF, por sus siglas en inglés de "*Photonic Crystal Fiber*"). Está caracterizada por tener un arreglo interno de agujeros de aire espaciados de forma específica por toda la longitud de la fibra. Este tipo de fibras no son utilizadas para el envío de señales a largas distancias; por el contrario, se aprovecha su configuración para ser utilizadas en aplicaciones para la fabricación de sensores, generador de supercontinuo, como amplificador de señales, entre otras.

La luz puede viajar dentro del núcleo de una fibra basado en la reflexión total interna. La trayectoria que sigue el rayo de luz por el interior de la fibra óptica se conoce como modo de propagación, y la trayectoria que puede seguir al insertarse en el núcleo, dependerá del ángulo de llegada.

Capítulo 3

3. Metodología

Con el objetivo de investigación dirigida hacia el desarrollo de un nuevo método no invasivo para la determinación de grasa y proteína en leche de vaca, se estudiaron diversos acercamientos basados en óptica. Después de revisar las técnicas existentes en la literatura, se determinó que, si se desarrollan sensores ópticos en el rango VIS, resultarían en equipos más económicos y accesibles en comparación con el desarrollo de equipos en el rango UV, NIR u otros. De igual manera, se determinó que las técnicas de espectrofotometría resultan una opción viable para el desarrollo de equipos no invasivos para la determinación de componentes en muestras de tipo líquido. Apegado a lo anterior, a continuación, se muestra la propuesta de un sistema no invasivo para la determinación de la cantidad de grasa y proteína en leche de vaca fresca a partir del análisis espectral en el rango VIS.

3.1. Descripción de los materiales

Para el desarrollo del sistema óptico, se utilizaron distintos materiales y equipos delimitados por un rango de trabajo en el espectro VIS.

La fuente de luz blanca (Figura 13) utilizada es el modelo MBB1F1 (Thorlabs Inc., EUA), la cual se trata de una fuente LED de banda ancha que emite una luz blanca en el rango espectral de los 470 a los 850 nm (ver Figura 14). La fuente cuenta con una conexión directa a fibra óptica (conector SMA) con una distancia mínima entre el LED emisor y la fibra al conectarse, para reducir al máximo las pérdidas.



Figura 13 - Fuente de banda ancha en el rango VIS MBB1F1 (Thorlabs, 2020).

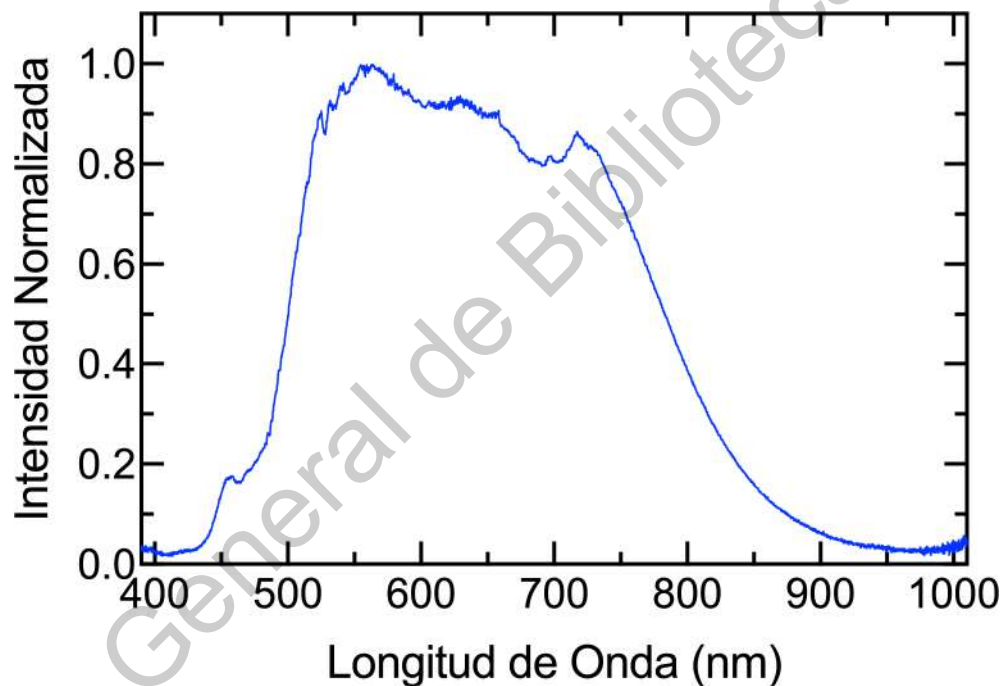


Figura 14 - Espectro de emisión de la fuente MBB1F1. Elaborado a partir de datos de (Thorlabs, 2020).

La fuente posee una potencia de mínimo 0.8 mW, y se encuentra montada en un disipador de calor. El LED de la fuente necesita de un suministro constante de corriente eléctrica sin exceder los 500 mA. Además, la fuente contiene una memoria de tipo EEPROM para operarla en distintos modos de operación, como pulsante, constante, o personalizado. Por lo anterior, esta fuente LED necesita de un módulo controlador, para lo que se acudió al controlador LEDD1B (Thorlabs, EUA), el cual puede controlar y operar fuentes LED de hasta 1,200 mA. Mediante

una perilla manual, la potencia de salida puede ser controlada (ver Figura 15) y modulada utilizando una señal de disparo externa. Puede trabajar en tres modos distintos: continuo, modulación y disparo. En el modo continuo el LED que controla siempre estará encendido regulando la potencia con la perilla. En modulación, una señal externa controla la intensidad de la corriente y el brillo del LED. En modo disparo podemos encender y apagar el LED de manera estroboscópica o para controlar el promedio de potencia mediante una señal modulada por ancho de pulsos (PWM, por sus siglas en inglés de "*Pulse Width Modulation*").



Figura 15 - Controlador LEDD1B (Thorlabs, 2020a).

Para las conexiones de fibra óptica y para la construcción del camino óptico, se utilizó un conector multimodal de fibra óptica 2×2 para fibras de 200 μm de diámetro modelo TM200R5S2A (Figura 16). Este conector opera en un rango espectral de 400 a 900 nm, por lo que trabaja en el rango VIS. El conector mantiene una relación de acoplamiento de 50:50 y cuenta con cuatro puertos con conectores tipo SMA905. Este conector realiza la función de insertar las distintas ondas de luz generadas, mezclarlas y redirigirlas hacia otra parte del sistema.

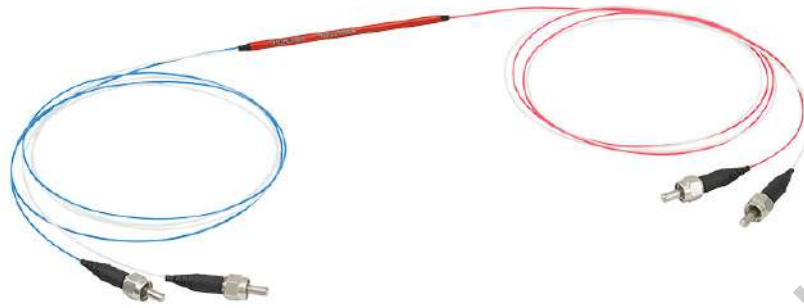


Figura 16 - Conector de fibra óptica multimodal 2×2 modelo TM200R5S2A (Thorlabs, 2020b).

De igual manera, se utiliza un conector de fibra óptica multimodal 2×2 modelo TM105R2S2A, que, a diferencia del anterior, este posee una relación de acoplamiento de 90:10.

Para insertar la muestra de leche y que la luz la atravesase, se utilizó una base para celdas de cuarzo modelo CUV-FL-DA (Ocean Optics Inc., EUA). Tiene la característica de poseer dos conectores SMA (Figura 17) donde se acoplan de manera directa las fibras. Esta base para celdas está optimizada para trabajar en el rango de los 200 a los 2,000 nm y puede sostener celdas de 1 cm². La base además cuenta con un lente colimador de cada lado, haciendo que la luz incida directamente hacia la muestra colocada en la celda y al ser transmitida, acoplarse nuevamente a la fibra óptica en la salida.



Figura 17 - Base para celda de cuarzo CUV-FL-DA (Ocean Optics, 2020).

Para analizar el espectro de la luz, se utilizó un analizador de espectros ópticos (OSA por sus siglas en inglés de "*Optical Spectrum Analyzer*"). El

instrumento utilizado (ver Figura 18) fue el modelo USB2000+ (Ocean Insight Inc., EUA), que es capaz de detectar el espectro electromagnético en el rango UV-VIS-NIR para absorción, transmisión, reflexión, emisión, color y otras aplicaciones. Para acoplarse a la fibra óptica cuenta con un conector tipo SMA y un espejo para enfocar la luz incidente directamente al espectrómetro. Los datos que adquiere el sistema los transmite hacia una computadora mediante el protocolo USB cada 25 ms.



Figura 18 - Analizar de espectros ópticos USB2000+ (Ocean Insight, 2020).

3.2. Preparación del experimento

El sistema se muestra en la Figura 19 y está compuesto por una fuente de luz blanca LED acoplada a fibra óptica (MBB1F1, Thorlabs Inc., EUA) que entrega una señal en el rango VIS desde los 470 hasta los 850 nm, incluye un controlador LED (LEDD1B, Thorlabs Inc., EUA) en modo continuo. La señal de luz es insertada al sistema mediante un conector de fibra multimodal 50:50 de 3 dB 2x2 (TM200R5S2A, Thorlabs Inc., EUA). La señal desde la fuente de luz viaja hasta por la fibra y es separada en dos ramas (A1 y A2). La rama A1 contiene un EFPI formado por dos conectores de fibra óptica SMA905 (Thorlabs Inc., EUA) los cuales fueron dispuestos de manera tal que el ángulo de acoplamiento pudiera modificarse (ver Figura 20).



Figura 19 - Diagrama esquemático de la preparación experimental. OSA: analizador de espectros ópticos. Adaptado de (A. Gastélum-Barrios et al., 2019).

La rama A2 está compuesta por un conector mecánico continuo de fibra óptica. La luz transmitida por el EFPI y la rama A2 son acopladas en un bucle desbalanceado de fibra, donde el bucle se implementó utilizando un conector 90:10 2x2 de fibra óptica (TM105R2S2A, Thorlabs Inc., EUA). En el centro de este bucle, se colocó un soporte para cubetas de cuarzo (CUV-FL-DA, Ocean Optics Inc., EUA), compuesto por dos lentes colimadores de índice graduado (GRIN, por sus siglas en inglés) de 5 mm de diámetro y de 10 mm de longitud focal colocados en ambos lados del soporte. La luz blanca es enfocada directamente en la muestra de leche, y el espectro transmitido se enfoca hacia la fibra óptica. La luz que recircula en el bucle regresa hacia las ramas A1 y A2 y posteriormente es recombinada por el conector inicial. La respuesta del sistema es monitoreada por el puerto residual del conector inicial de 3 dB, el cual está conectado a un OSA (USB2000+, Ocean Optics Inc., EUA, —ahora Ocean Insight Inc.—). Los datos que entrega el OSA son procesados por una computadora.



Figura 20 - Disposición mecánica de los conectores SMA para generar la cavidad.

La Figura 21 muestra el esquema implementado. Se pueden observar todos los componentes utilizados y su disposición sobre la mesa de trabajo. La celda de cuarzo queda posicionada de manera tal que el espacio entre la entrada y la salida de la luz, sea mínima. El OSA se encuentra conectado en una computadora de escritorio con el software OOIBase32 (Ocean Optics Inc., EUA) donde se procesa la información y se despliega en la pantalla (Figura 22). El software se configuró con los parámetros:

- Tiempo de integración: 4 ms
- Promedio: 50
- Boxcar: 10
- Retardo del destello (*flash delay*): 10 ms

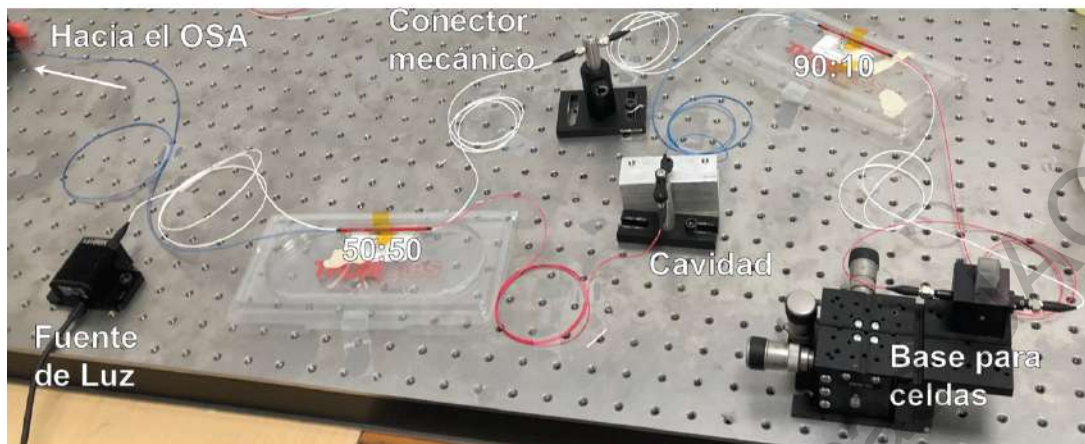


Figura 21 - Imagen del esquema implementado.

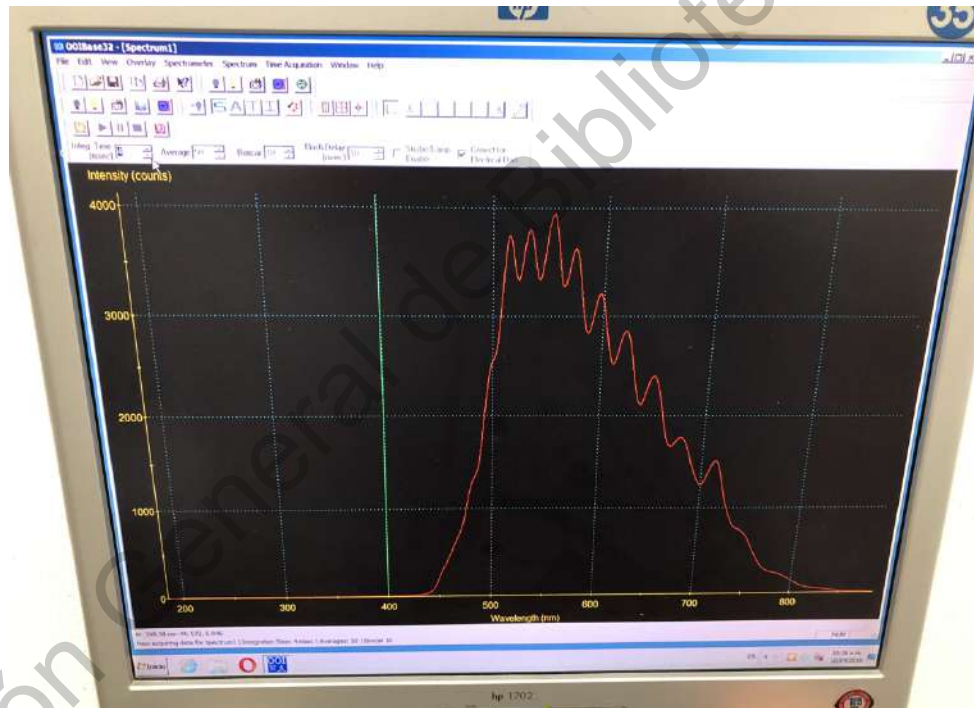


Figura 22 - Captura de la pantalla de la interface visual del software OOIbase32 para la representación del espectro electromagnético.

3.3. Preparación de las muestras

Se obtuvieron 16 muestras de leche de vaca ordeñadas de manera manual y fueron refrigeradas a 4 °C por un día. Posteriormente fueron calentadas a 37 °C [temperatura aproximada de la leche cuando abandona la ubre (Bylund y Tetra Pak

Processing Systems AB, 1995)] con un agitador con placa calefactora (Thermo Scientific Inc., USA) y se homogenizó por 20 min utilizando un baño ultrasónico (Bransonic 2800 MH, Branson Ultrasonic, EUA). Después, utilizando un analizador comercial de leche (Lactoscan S, Milkotronic Ltd., Bulgaria) se terminó la grasa y proteína total. Las muestras de leche fueron analizadas con el esquema descrito anteriormente para determinar el espectro resultante de acuerdo con el contenido de grasa y proteína. Las composiciones de las muestras seleccionadas para el análisis se muestran en la Tabla 2, destacando que las muestra contienen una cantidad de proteína casi constante. Los equipos y las muestras de leche pueden ser observadas en la Figura 23.

Tabla 2 - Muestras de leche utilizadas en el experimento.

Muestra	Grasa (%)	Proteína (%)
F1	0.97	3.16
F2	1.06	3.17
F3	1.71	3.05
F4	2.16	3.21
F5	2.28	3.20
F6	3.71	3.08
F7	4.36	3.23

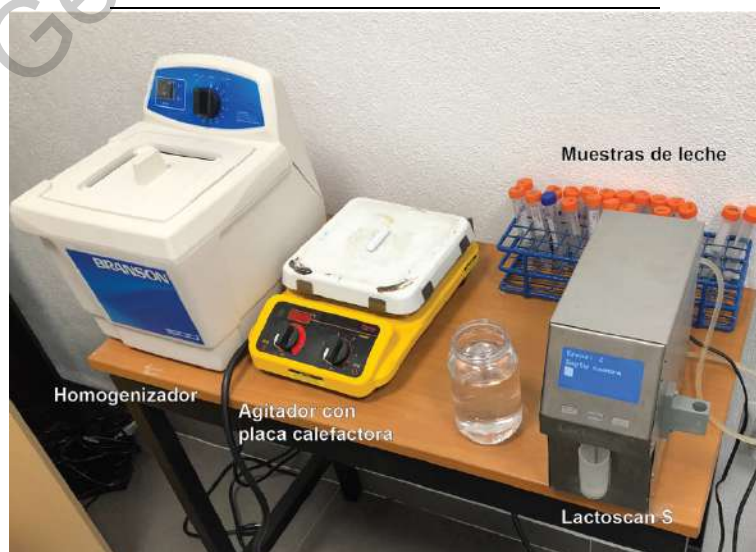


Figura 23 - Equipos para el tratamiento de las muestras de leche.

3.4. Modelo teórico

El método propuesto se basa en una cavidad Fabry-Perot dual de baja coherencia (Deutsch et al., 2010; Lee y Taylor, 1991; Yang et al., 2007). El paso de la luz y la interacción están presentadas en la Figura 24. La luz es separada en dos rayos (E_1 y E_2) por el conector de 3 dB (conector 1). De ahí, E_1 viaja al segundo conector (A) sin sufrir ningún cambio. Mientras tanto, E_2 viaja a través del EFPI, donde una parte de la luz es transmitida (E'_2) y el resto se refleja. De acuerdo con la vista aumentada de la Figura 24, cuando el campo eléctrico E_2 interactúa en la cavidad Fabry-Perot, se genera un espectro de interferencia de baja coherencia ($I_{r1} = |E_{2r}/E_2|^2$) descrita por:

$$I_{r1} = R_1 + (1 - R_1)^2 R_2 + 2(1 - R_1)\sqrt{R_1 R_2}(\cos 2\phi). \quad (6)$$

La interferencia es generada por dos conectores SMA905 alineados. Para nuestro caso, la separación de ambos conectores se fijó en 8 μm . La reflectividad (R_1 y R_2) es generada por el RI de las interfaces, donde el RI de la fibra óptica n_F (1.458) y el RI del material en la cavidad n_C (aire = 1.0) proveen la reflexión gobernada por:

$$R = R_1 = R_2 = \left(\frac{n_F - n_C}{n_F + n_C}\right)^2. \quad (7)$$

Consideramos ambas reflexiones similares ya que el mismo RI está involucrado en las interfaces de la cavidad. La fase de la interferencia generada por la cavidad Fabry-Perot puede ser expresada por:

$$\phi = \frac{2\pi n_C L}{\lambda}, \quad (8)$$

donde n_C representa el RI de la cavidad, L es la longitud de la cavidad y λ es la longitud de onda de la luz incidente. En nuestro sistema, una vez que el espectro de baja coherencia es generado, el campo eléctrico transmitido E_1 y E'_2 están acoplados por el conector de fibra óptica 90:10 (conector 2). Como resultado, dos

campos eléctricos son generados por la correspondiente suma de las señales de entrada: $E_L = E'_1 + E'_2$ y $E'_L = E''_1 + E''_2$.

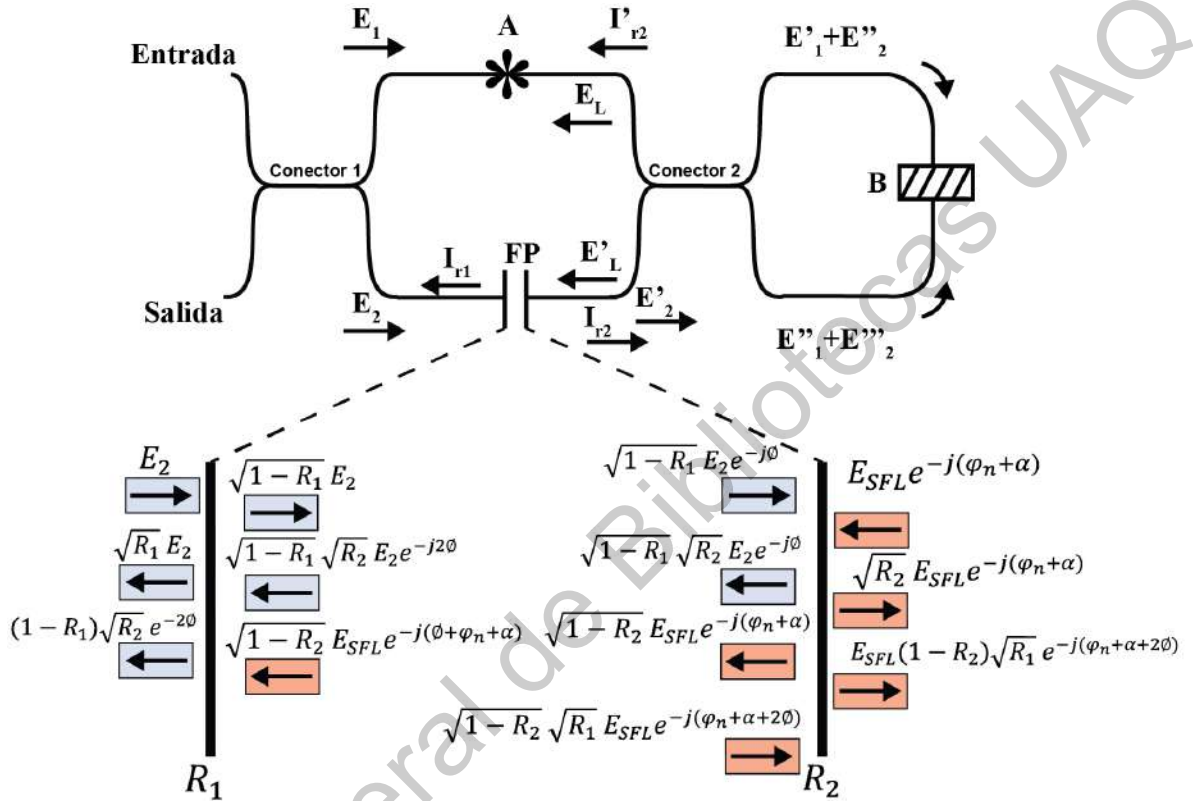


Figura 24 - Arreglo de fibra óptica y su análisis de paso de la luz. El conector mecánico está representado por A y el soporte de cubetas de cuarzo por B. La vista aumentada muestra el análisis de respuesta dual. Adaptado de (A. Gastélum-Barrios et al., 2019).

Estos campos eléctricos recirculan en direcciones opuestas por el bucle de fibra. En este punto, la luz llega hasta B donde la interacción luz-leche produce dispersión, RI y efectos de absorbancia (C. Crofcheck et al., 2005; C. L. Crofcheck et al., 2002; Regnima et al., 2017; Sabrina Stocker et al., 2017). Debido a que la muestra de leche está iluminada en dos direcciones, se emiten múltiples rayos de dispersión y la absorbancia se presenta en todas las direcciones de dispersión (Figura 25) antes de que la extinción se presente. Recordando que el RI y la dispersión se atribuyen a los glóbulos de grasa y los micelios de proteína (Regnima

et al., 2017). El tamaño de los glóbulos de grasa después de la homogenización es mayor que la longitud de onda de la luz utilizada en este estudio, lo que hace que la teoría de dispersión de Mie se pueda aplicar (Jain y Sarma, 2015). Como resultado, diversos rayos dispersos se generan y la señal de resultado es enfocada de regreso al sistema de fibra óptica. El campo eléctrico disperso puede ser descrito por (Shapiro et al., 1994):

$$E_s(z) = E_0 \frac{k^2}{z} (\vec{l} - \hat{k}\hat{k}) \sum_{n=1}^N e^{j\varphi_n} \alpha_n \cdot E_n, \quad (9)$$

donde \vec{l} y $\hat{k}\hat{k}$ son la dirección perpendicular y el resultado del producto de la luz dispersada, respectivamente. El campo eléctrico disperso generado y la polarización están representados por E_n y α_n . El vector distancia desde el campo eléctrico dispersado hacia el detector y la longitud incidente están considerados por z y λ , respectivamente. La fase entre los rayos generados están definidos por $\varphi_n = (\mu_{s1}\chi_{s1} + \mu_{s2}\chi_{s2})d$ (Xin et al., 2006), donde d es la longitud de la celda, μ_{s1} es el coeficiente de dispersión de la grasa, y χ_{s1} representa la concentración de grasa, respectivamente. Mientras que, μ_{s2} y χ_{s2} describen el coeficiente de dispersión y la concentración de proteína, respectivamente. Debido a la incidencia simultánea de E_L y E'_L , distintos campos eléctricos en dirección frontal y en retroceso ($E_s(z)$) se generan. Estos rayos, están gobernados por la Ecuación (6), y se enfocan de regreso al bucle de fibra óptica (ver Figura 25). Es importante recordar que la absorción y la dispersión están fuertemente relacionadas con el tamaño de los glóbulos de grasa y los micelios de proteínas.

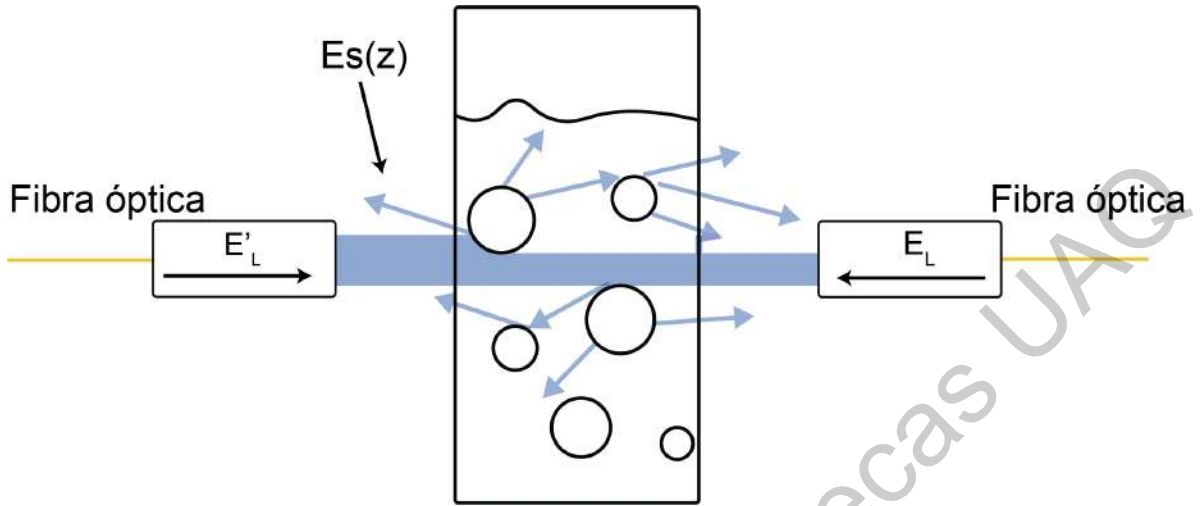


Figura 25 - Representación visual de la luz incidente y los rayos dispersos a través de la muestra de leche en la celda de cuarzo. Adaptado de (A. Gastélum-Barrios et al., 2019).

El campo eléctrico dentro del bucle excita distintos modos de la fibra. Estos modos recirculan dentro del bucle. El campo eléctrico de las trayectorias modales dentro del bucle puede ser descrito por (Medjadba et al., 2011)

$$E_{SFL}(z) = E_0 \frac{k^2}{z} (\vec{l} - \hat{k}\hat{k}) \sum_{n=1}^N \sum_{m=1}^M \alpha_n \cdot E_n \cdot C_{nm} e^{j(\varphi_n + \alpha)}, \quad (10)$$

donde C_{nm} es el coeficiente de acoplamiento de los modos involucrados y α es la fase entre las trayectorias modales dentro del bucle desbalanceado de fibra óptica. La presencia de los efectos de la interferencia está limitada por distintos factores, como el amplio número de modos, la longitud corta del bucle (1.6 m), relación desbalanceada del acoplamiento (90:10), y la longitud de onda de operación (400-800 nm) (Medjadba et al., 2011). Sin embargo, cuando el campo eléctrico $E_{SFL}(z)$ llega al EFPI por el puerto residual del conector 2, una parte de la luz es transmitida y el resto es reflejada al bucle. Un espectro de interferencia se genera como resultado de: $I_{r2} = |E_{SFLr}/E_{SFL}|^2$,

$$I_{r2} = R_1 + (1 - R_1)^2 R_2 + 2(1 - R_1) \sqrt{R_1 R_2} (\cos((2\phi + \varphi_n + \alpha))). \quad (11)$$

Es importante mencionar que las variaciones de intensidad del vector del campo eléctrico están fuertemente relacionadas a las reflexiones de la cavidad del EFPI. Las interferencias generadas (I_{r1} e I_{r2}) proporcionadas por el EFPI y la misma cavidad generan una respuesta dual por las direcciones del campo eléctrico (Yang et al., 2007). Sin embargo, cuando la señal de interferencia está circulando en el bucle, la luz vuelve a ser afectada por la muestra de leche. No obstante, las trayectorias descritas en la Figura 24 solamente son aquellas que se consideran para la contribución en fase. Ya que I_{r2} está directamente hacia el conector 1, la señal de reflexión total capturada por el OSA puede ser expresada por la relación:

$$: It = I_{r1} + I_{r2},$$

$$It = 2[R + (1 - R)^2R] + 2(1 - R)R(\cos(2\phi) + \cos(2\phi + \varphi_n + \alpha)). \quad (12)$$

Para simplificar la expresión, ambas reflexiones fueron consideradas del mismo valor. La interferencia generada está relacionada con la contribución en la fase debido a la dispersión de la leche y al bucle de fibra óptica (A. Gastélum-Barrios et al., 2019; Xin et al., 2006). Debido a que el RI de la fibra óptica y el aire mencionados anteriormente, y debido a que la longitud de la cavidad fue de 8 μm , se realizó una aproximación a un modelo matemático descrito en la Ecuación (2). En la Figura 26, se puede observar la señal de salida donde el rango espectral libre $\Delta\lambda$ (FSR, por sus siglas en inglés) fue de 13.2 a 36.8 nm. La aproximación fue procesada sin considerar φ_n ni α , solamente la respuesta dual del EFPI fue integrada en el modelo de simulación. Es importante mencionar que los efectos de polarización están representados por la interacción luz-leche y estos pueden ser estudiados por la matriz de dispersión (C. Crofcheck et al., 2005), donde la intensidad es solamente considerada en el vector de Stokes. Sin embargo, en este trabajo, solamente nos enfocamos en emplear la modulación por fase para la detección de grasas y proteínas totales en leche de vaca.

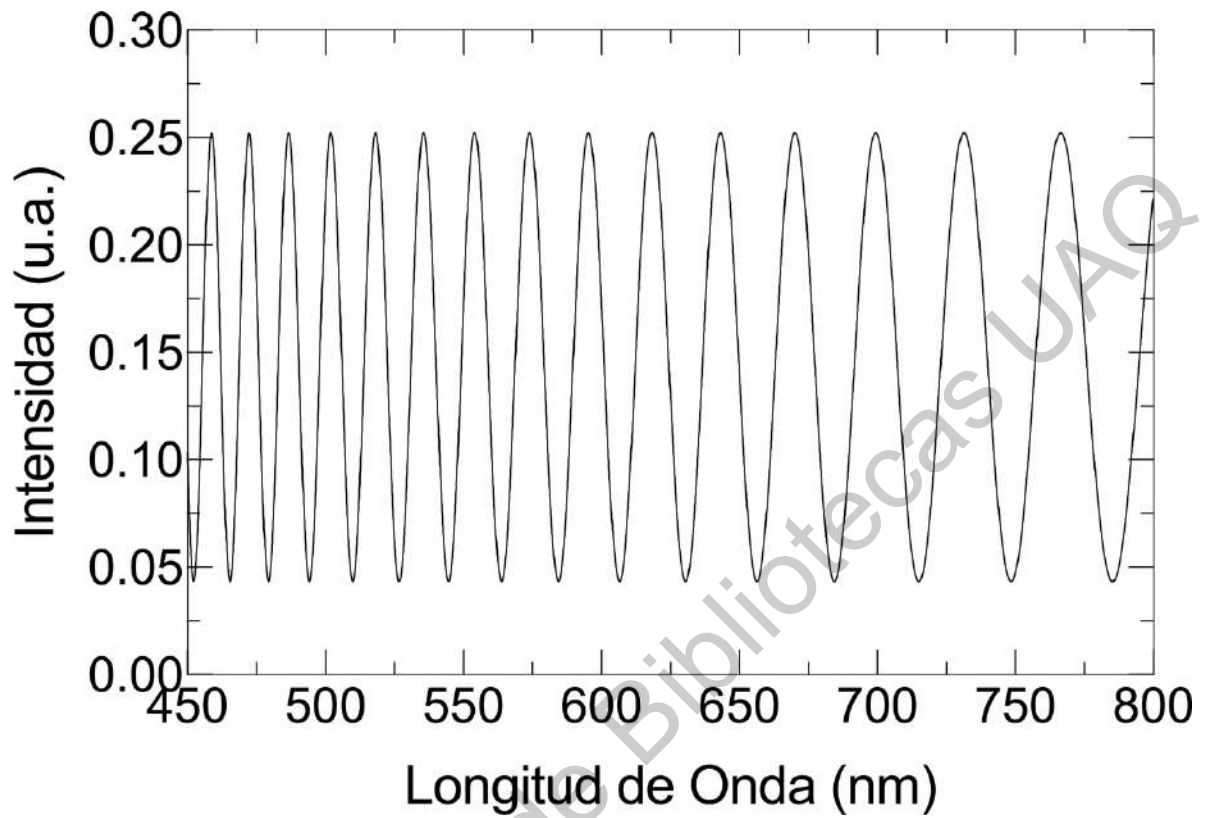


Figura 26 - Espectro de salida del modelo de aproximación. Adaptado de (A. Gastélum-Barrios et al., 2019).

Capítulo 4

4. Resultados y discusión

4.1. Proceso de homogenización

Durante el tratamiento de las muestras de leche, la homogenización resulta ser un paso importante para el correcto análisis de las repuestas en el espectro electromagnético. Como se ha mencionado anteriormente, el tamaño de las partículas de grasa y proteína producen dispersión de la luz, en este sentido, al utilizar muestras de leche que fueron almacenadas y enfriadas, es necesario realizar un proceso de homogenización para la correcta distribución de las partículas en el medio, además de dividir en partículas más pequeñas los glóbulos de grasa y proteína.

Algunos autores recomiendan el uso de distintos métodos de homogenización como el de sonda ultrasónica, por presión; y tiempos de tratamiento desde los 20 s, hasta los 20 min (Ben Aernouts et al., 2015; A Bogomolov y Melenteva, 2013; Hongyu et al., 2000; Qi et al., 2015). En nuestro caso, realizamos distintas pruebas de homogenización utilizando un baño ultrasónico y observando el tamaño y la distribución de las partículas mediante un microscopio. La Figura 27 muestra el resultado de aplicar durante 20 min el baño ultrasónico. Puede observarse que después del tratamiento de homogenización a una temperatura de 37 °C, los glóbulos muestran una división de las partículas en toda la muestra.

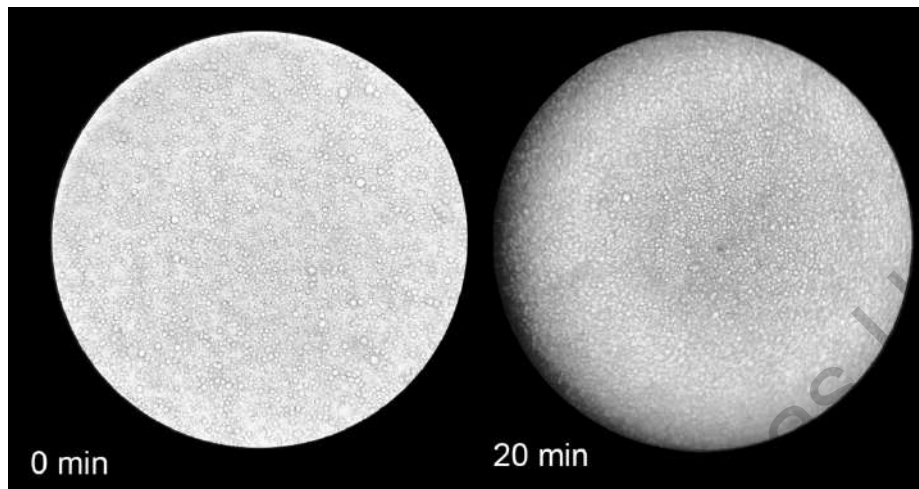


Figura 27 - Resultado de la homogenización de las muestras de leche a 37 °C sin homogenizar y a los 20 min de aplicarle el baño ultrasónico.

Este experimento, nos hace concluir que para analizar la respuesta de la interacción de la luz con las muestras de leche, es necesario realizar un proceso de homogenización por baño ultrasónico por 20 min. Los resultados mostrados en este documento, considerarán en todo momento este pre-tratamiento.

4.2. Prueba de absorbancia

Como anteriormente es mencionado en la revisión de la literatura, la mayoría de los métodos existentes utilizan la absorbancia para relacionar la respuesta de la interacción de la luz con las muestras de leche y su contenido de grasas y/o proteínas. Con el objetivo de verificar la respuesta de absorbancia y el espectro electromagnético, se utilizó un Multiskan GO® (Thermo Scientific, EUA) para realizar un barrido desde el rango UV hasta el NIR (de los 200 hasta los 1,000 nm), analizando tanto absorbancia como transmitancia de una muestra de leche fresca de vaca y diluciones 10:1, 10:2, y así sucesivamente hasta 10:15 partes de leche por partes de agua destilada (Figura 28).

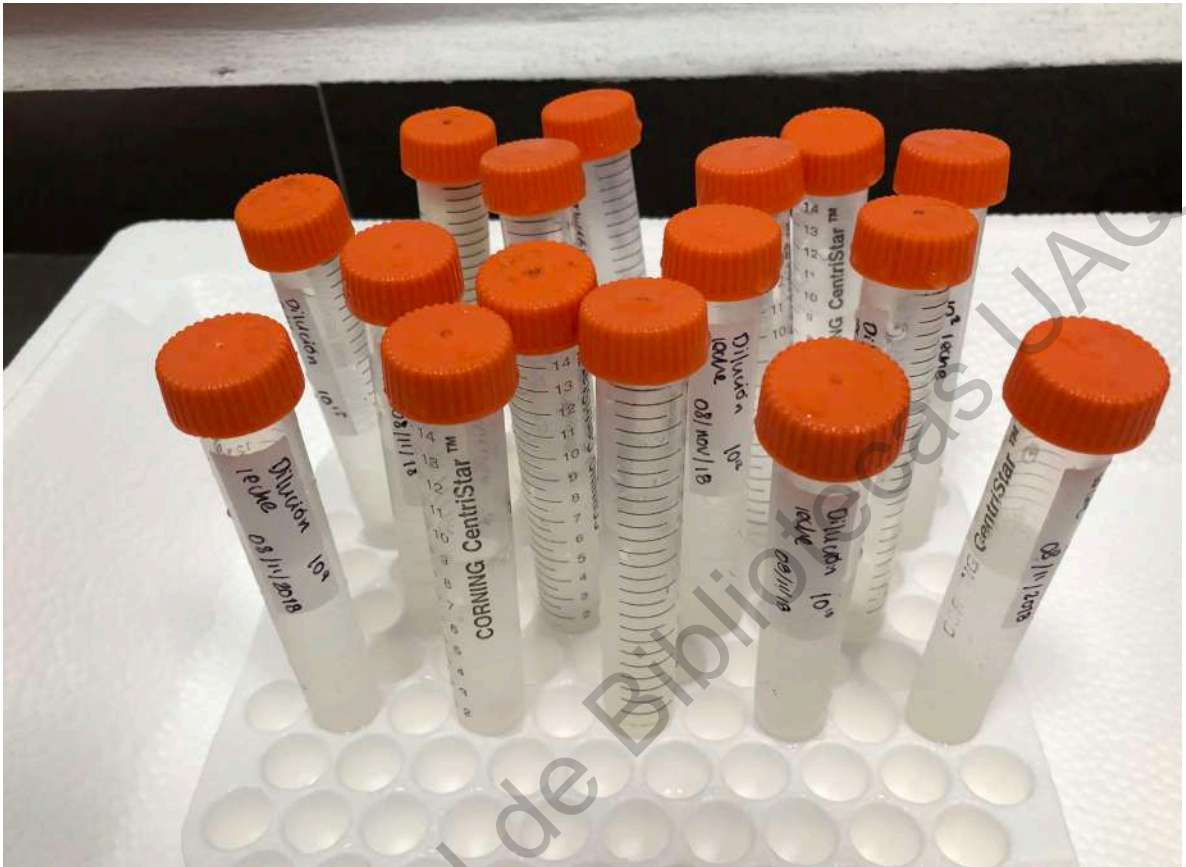


Figura 28 - Muestra de leche y sus distintas diluciones.

Los resultados de absorbancia se muestran en la Figura 29, donde se pueden destacar distintas características. En la zona UV (200-400 nm), se observan distintas amplitudes a través del rango; sin embargo, es a partir de la muestra de leche 10:2 donde se destaca una posible correlación entre la absorbancia y la cantidad de agua destilada que contiene la muestra, esto nos permite aseverar que a mayor cantidad de agua en la muestra la absorbancia es menor. Probablemente se podrían obtener algunas correlaciones en este rango entre absorbancia y cantidad de grasa y/o proteínas, ya que al diluir las muestras, se reduce también la cantidad de estos compuestos. El análisis en este rango (UV) está fuera del alcance de esta investigación; sin embargo, se deja como un área de trabajo futuro. Por otro lado, en el rango VIS (400-700 nm), a grandes rasgos se observa que a medida que la muestra incrementa el contenido de agua destilada, la absorbancia cae radicalmente, este resultado podría ser un indicador para el desarrollo de un método

para la detección de adulteraciones en leche, similar a lo estudiado por otros autores (Dave et al., 2017; Kimbahune et al., 2016; Mabood et al., 2017). Cabe mencionar que la muestra de leche entera, no muestra un comportamiento deseable, sino por el contrario, muestra una respuesta similar a señales con ruido.

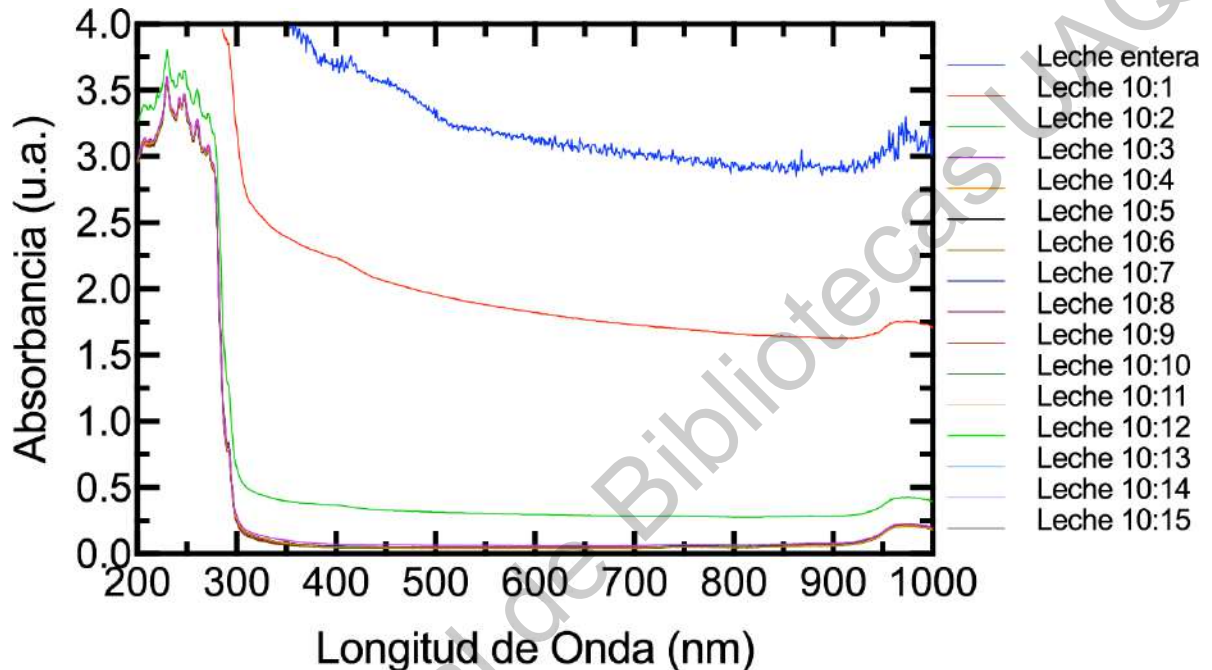


Figura 29 - Resultados de absorción del barrido UV-VIS-NIR con el Multiskan GO®.

Lo anterior, nos deja con la conclusión de que el rango VIS es posible detectar adulteraciones (agua añadida) en la composición de muestras de leche analizando el espectro de absorción. De manera similar, se analizó el espectro de transmisión el cual se muestra en la Figura 30. Se puede observar que de manera esperada, la amplitud en transmisión aumenta a medida que la muestra aumenta su cantidad de agua, ya que el espectro de transmisión resulta tener un comportamiento inverso al espectro de absorción —al menos en el rango VIS-NIR—. En el rango UV, el instrumento nos entrega resultados con muy baja amplitud, y esto se debe a que las absorbancias en este rango son muy altas. Similar a lo concluido para los resultados de absorción, es posible utilizar el espectro de transmisión como una alternativa para la detección de adulteraciones en muestras de leche cruda.

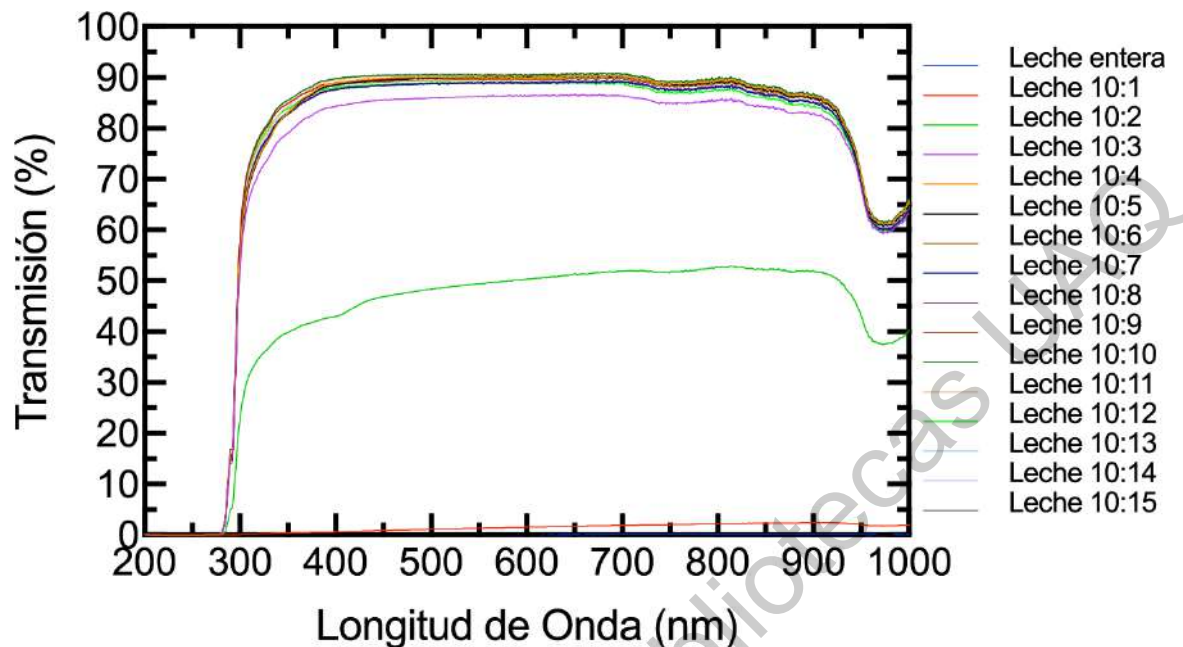


Figura 30 - Resultados de transmitancia del barrido UV-VIS-NIR con el Multiskan GO®.

Si bien ambos resultados, a simple vista, parecen tener un buen desempeño, nos hace suponer que si deseáramos analizar distintas muestras de leche (sin diluir) a distintas concentraciones de grasa y/o proteína no podríamos detectar sus variaciones en el espectro ya que si analizamos la respuesta de absorbancia para la muestra nombrada "Leche entera", se empiezan a registrar valores a partir de la banda de los 380 nm aproximadamente y en el resto del espectro se muestra "ruidosa"; y para el espectro de transmisión, su amplitud resulta ser prácticamente 0%; por lo que esperaríamos que distintas muestras de leche entera se mantendrían en esta misma respuesta.

4.3. Experimento en sistema óptico

Con el objetivo de aumentar la sensibilidad del espectro con respecto a diferencias en las concentraciones de grasa y proteína en muestras de leche cruda, se implementó un sistema de sensado óptico basado en el rango VIS, como fue descrito en el apartado 3.2.

La respuesta del sistema de sensado sin la celda de cuarzo ni las muestras de leche, se presenta en la Figura 31. El espectro de interferencia tiene una visibilidad máxima y mínima de 5.03 y 1.55 dB, respectivamente. Más aún, la señal de reflexión en algunas partes muestra un incremento en la intensidad en comparación con la señal de la fuente de luz, debido a la superficie metálica del conector de fibra óptica. El espectro de reflexión muestra un FSR oscilante con valores mínimos y máximos de 17.77 y 35.13 nm —muy cercanos a los previamente presentados en el modelo de aproximación.

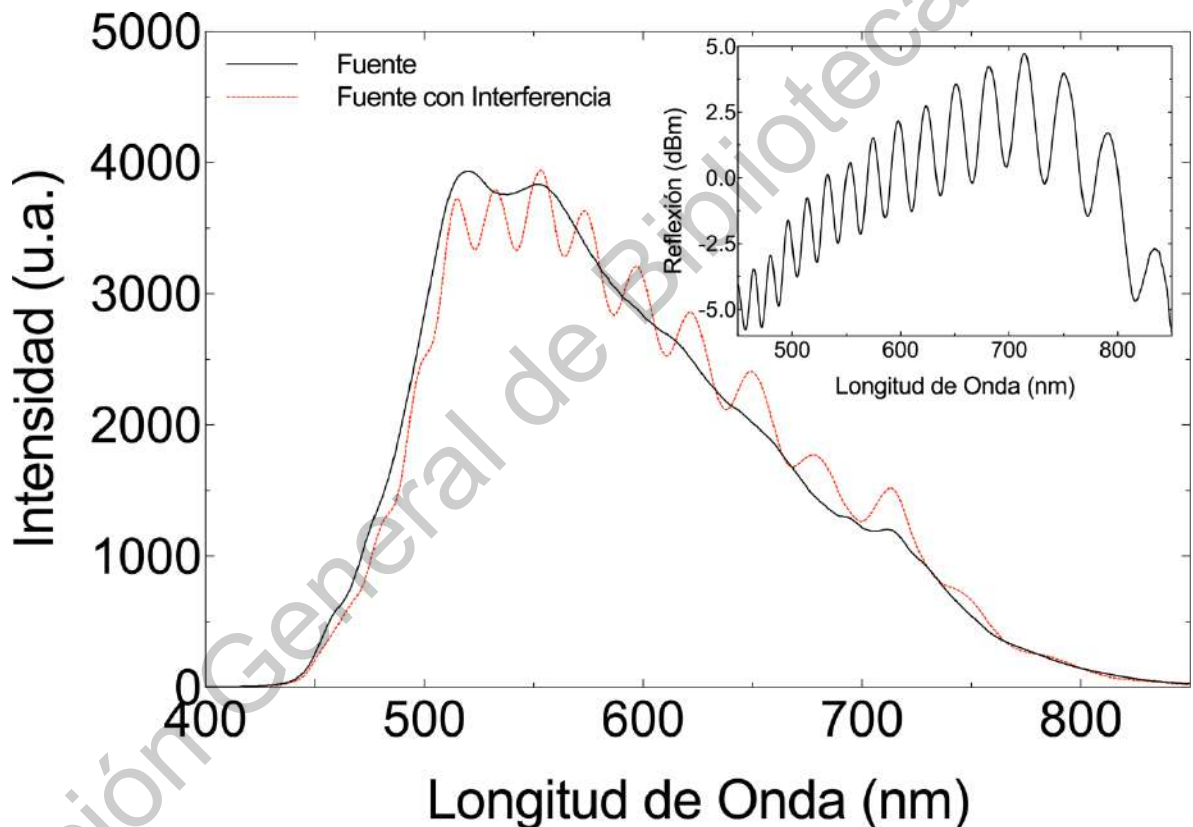


Figura 31 - Espectro de reflexión de la fuente de luz y la respuesta de interferencia óptica. El inserto es la señal de reflexión. Adaptado de (A. Gastélum-Barrios et al., 2019).

Las muestras de leche presentadas en la Tabla 2 fueron introducidas al sistema utilizando una celda de cuarzo de 1 mm de paso. La respuesta de reflexión es presentada en la Figura 32 en donde se puede observar que el espectro se

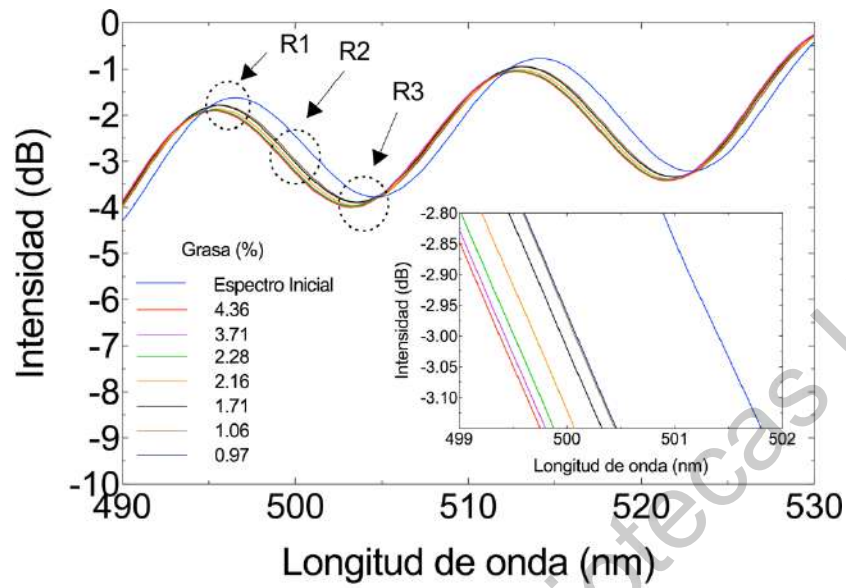
desplaza hacia longitudes de onda mas pequeñas cuando el contenido de grasa aumenta (ver el inserto en la Figura 32a).

Para encontrar una correlación entre el contenido de grasa y el desplazamiento del espectro, seleccionamos regiones para su análisis, definiendo tres principales: la región R1, que representa el pico de la onda aproximadamente a 495 nm; la región R2, que representa la región central de la onda (entre el pico y el valle) seleccionando una intensidad constante para su análisis, en nuestro caso se fijó a -3 dB; y la región R3, que representa el valle de la onda, buscando la mínima intensidad en una longitud de onda aproximadamente de 505 nm. Para la R1 buscamos el valor de longitud de onda donde se presentara la intensidad máxima. Para esta región, los resultados fueron siempre el mismo para todas las muestras de leche, todas se encuentran en la misma longitud de onda, por lo que no es posible encontrar una correlación con respecto de los cambios en el contenido de grasas. Para la R2, analizamos la longitud de onda de las señales en -3 dB, encontrando una diferenciación entre cada una de ellas y observando [inserto en la Figura 32 (a)] que a medida que el contenido de grasa aumenta, la señal se presenta hacia longitudes de onda más pequeñas. Para la R3, se encontró el valor en longitud de onda cuando la intensidad fuera la mínima, encontrando cambios entre las distintas muestras y seleccionando la región, al igual que la R2, como posible región de correlación.

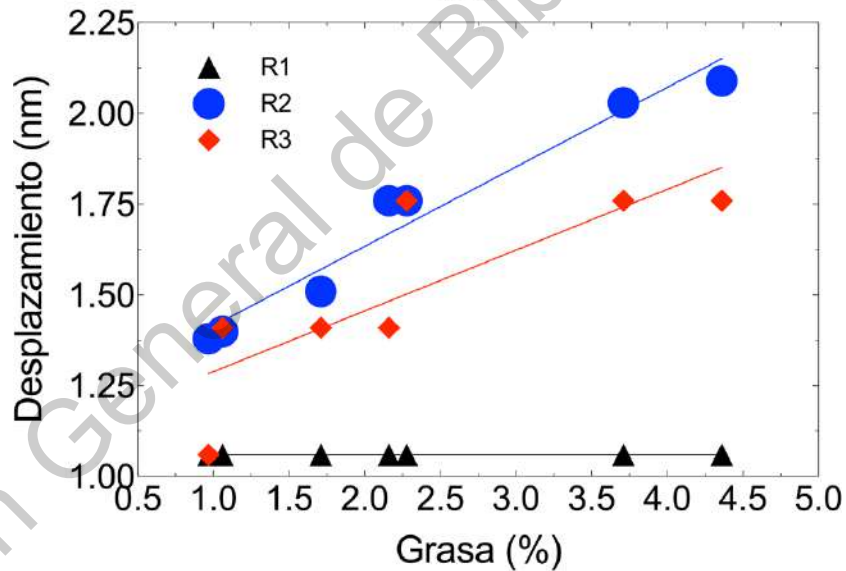
Con los datos obtenidos, se realizaron pruebas de regresión lineal de primer orden. La región R1 presenta una respuesta lineal sin desplazamiento entre las distintas muestras de leche. Las señales solamente se desplazan cuando se comparan con la fuente. La región R3 muestra una variación no lineal, solamente se pueden observar variaciones en la intensidad ya que en longitud de onda, algunas señales se solaparon. Sin embargo, en la región central (R2) entre el pico y el valle se presenta un desplazamiento en longitud de onda claro. En esta región se puede obtener una respuesta lineal [ver Figura 32 (b)]. De acuerdo con lo mencionado en la sección anterior, la fase del espectro de reflexión depende de la cavidad Fabry-Perot y del bucle de fibra óptica. En este trabajo, los cambios de los

índices de dispersión y reflexión están relacionados con la región de operación en el espectro electromagnético (B. Aernouts et al., 2015; C. Crofcheck et al., 2005; C. L. Crofcheck et al., 2002; McCarthy, 2002; Medjadba et al., 2011; Sabrina Stocker et al., 2017). Como resultado, todas las regiones R2 en el interferograma completo fueron analizadas para encontrar la región de operación óptima (ver Figura 33); es decir, se buscó en que región del espectro VIS se encuentra una mejor correlación entre el contenido de grasa y el espectro electromagnético.

Se utilizó una regresión de segundo orden para estudiar la mejor respuesta de acuerdo con las longitudes de onda, de igual manera se analizó la sensibilidad para cada región. Los resultados obtenidos están presentados en la Tabla 3. De acuerdo con la aproximación propuesta, la mejor región para detectar la cantidad total de grasa en leche cruda de vaca es la zona M3, donde opera alrededor de los 500 nm. Esta respuesta de desplazamiento presenta un ajuste de $R^2 = 0.9739$ y una sensibilidad de $0.616 \text{ nm}/\%$ de grasa; en otras palabras, las señales presentan un desplazamiento de 0.616 nm por cada cambio porcentual del contenido de grasa, y este se presenta hacia longitudes de onda más pequeñas.



(a)



(b)

Figura 32 - (a) Espectro de interferencia para variaciones de grasa. El inserto es una vista ampliada de la región central (R2). (b) Análisis de desplazamiento de las tres regiones con una regresión lineal. Adaptado de (A. Gastélum-Barrios et al., 2019).

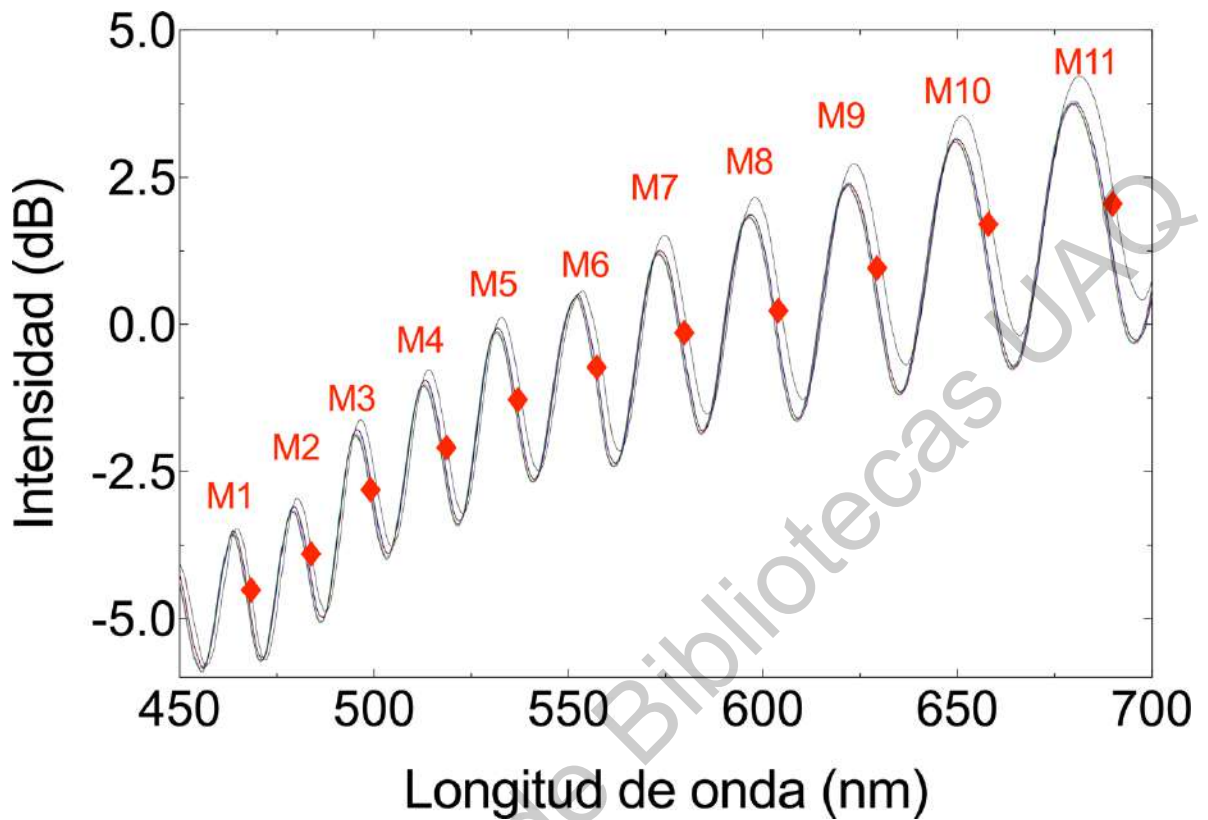


Figura 33 - Regiones centrales del interferograma. Adaptado de (A. Gastélum-Barrios et al., 2019).

Tabla 3 - Regresiones de segundo orden de las regiones centrales a través del interferograma. Adaptado de (A. Gastélum-Barrios et al., 2019).

Región	r^2
M1	0.9558
M2	*
M3	0.9739
M4	0.8118
M5	0.9157
M6	0.8118
M7	0.8484
M8	0.7077
M9	0.8935

M10	0.9135
M11	0.9158

* No se presentó desplazamiento.

La zona M2 mostró un ajuste igual a 1 (zona marcada con * en la Tabla 3, este rango no fue considerado para el análisis de la señal ya que no existe un desplazamiento de las señales; es decir, todas las muestras de leche muestran un espectro superpuesto una con la otra. Otros trabajos han mencionado distintas zonas del espectro electromagnético para la predicción de grasas y proteínas (Andrey Bogomolov et al., 2012b; Xu dong Feng et al., 2013; Kucheryavskiy et al., 2014; Niero et al., 2016), mismas que han sido revisadas en la sección 2.1.2 de este trabajo; sin embargo, hasta nuestro conocimiento, la mayoría de ellos se basan en modulación por intensidad y espectros de transmisión, donde se presentan las desventajas mencionadas con anterioridad, además de que algunos de estos trabajos se basan en el rango NIR. El estudio más cercano a esta propuesta, es el presentado por Zhu et al. (2016), donde los autores presentan un método óptico para implementarse en análisis de laboratorios basados en el espectro de reflexión en los 1,060 nm. Sin embargo, los autores utilizaron un pequeño rango de concentraciones de grasa (0.17-0.22%), y el error en su determinación fue del 3%.

De acuerdo con nuestros resultados, el sistema puede simplificarse incorporando un LED de color cian acoplado a fibra óptica y un fotodetector sensible en la zona de los 500 nm, donde la capacidad de respuesta (ganancia) jugará un rol importante en la optimización del arreglo físico.

Una vez definida la región de interés y con el objetivo de probar la capacidad del sistema para la estimación del contenido de grasa en leche cruda de vaca, 11 muestras de leche distintas fueron analizadas con el esquema propuesto, y se midió el desplazamiento en la región de los 500 nm (M3) entre las muestras de leche y el espectro inicial de la fuente. La Figura 34 muestra los resultados experimentales al determinar el contenido de grasa real con el Lactoscan S, como anteriormente se había realizado. Después de realizar las pruebas con el sistema, los resultados muestran un ajuste cuadrático de 0.9763, permitiendo asegurar que el sistema de

sensado óptico es capaz de determinar el contenido de grasa en leche de vaca midiendo el desplazamiento de longitudes de onda con respecto del espectro de la fuente de luz. Por otra parte, se realizó un análisis ANOVA de una vía con un nivel de confianza del 95% obteniendo un valor p de 0.8735. Esto significa que las predicciones no tuvieron diferencia significativa comparadas con las mediciones reales.

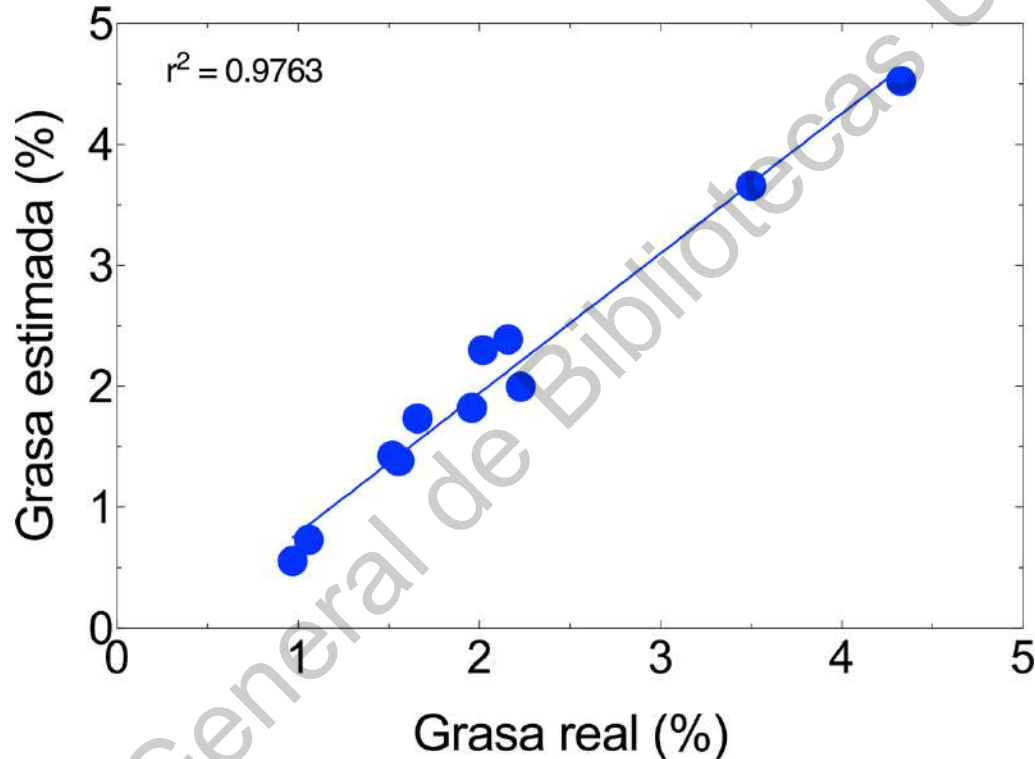


Figura 34 - Resultados de validación del modelo para el análisis de grasas totales.

Adaptado de (A. Gastélum-Barrios et al., 2019).

Para el análisis del contenido de la proteína, se tomaron siete muestras de leche con contenido de grasa similar (alrededor del 2%). Se procedió a un análisis similar a lo que se realizó para la determinación de grasa. Los resultados para el análisis de proteínas se muestran en la Figura 35. El ajuste cuadrático obtenido fue de 0.878 y la sensibilidad cercana al 4.571 nm/% de proteína. De estos resultados, se puede obtener una sensibilidad cruzada entre la concentración de proteína y grasa igual a 0.134.

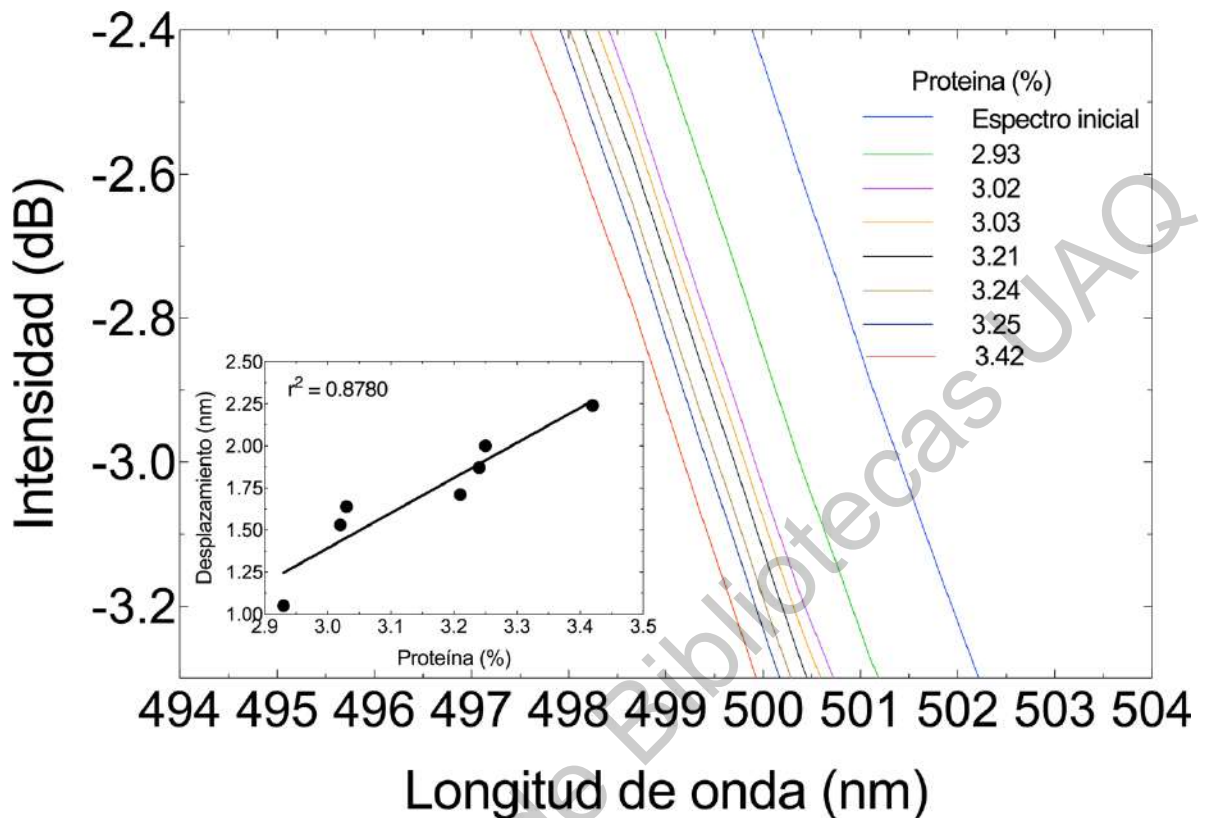


Figura 35 - Vista ampliada de la región R2 para la estimación de proteína. El inserto es el ajuste cuadrático del desplazamiento con respecto al espectro inicial.

Adaptado de (A. Gastélum-Barrios et al., 2019).

Cuando la leche sale por la ubre, esta tiene una temperatura alrededor de los 37 °C, pero esta temperatura decrece con el tiempo. Por lo tanto, es importante estudiar los efectos térmicos en el sistema. La temperatura de las muestras de leche fue determinada utilizando un termómetro infrarrojo (FLUKE-59 MAX, Fluke Corp., EUA). La relación entre las longitudes de onda y las diferencias de intensidades a medida que la muestra de leche va aumentando la temperatura se presentan en la Figura 36 (a). Se puede destacar que la longitud de onda no sufre desplazamiento contrario a lo que sucede con la intensidad, mostrando una inestabilidad de 0.2 dB. Ya que el objetivo es probar el sistema a cambios de temperatura externos, el arreglo óptico fue probado para analizar las variaciones de temperatura cercanas a la base para celdas de cuarzo utilizando una plancha caliente. Los resultados se pueden observar en la Figura 36 (b), donde la temperatura externa varía desde los

26 hasta los 44 °C sin afectar la fase del espectro. Sin embargo, la intensidad se altera en un orden de 0.1 dB. Es importante mencionar que las inestabilidades en intensidad están relacionadas a los efectos de dispersión. El comportamiento demostrado puede asegurar que el sistema es estable a variaciones de temperaturas.

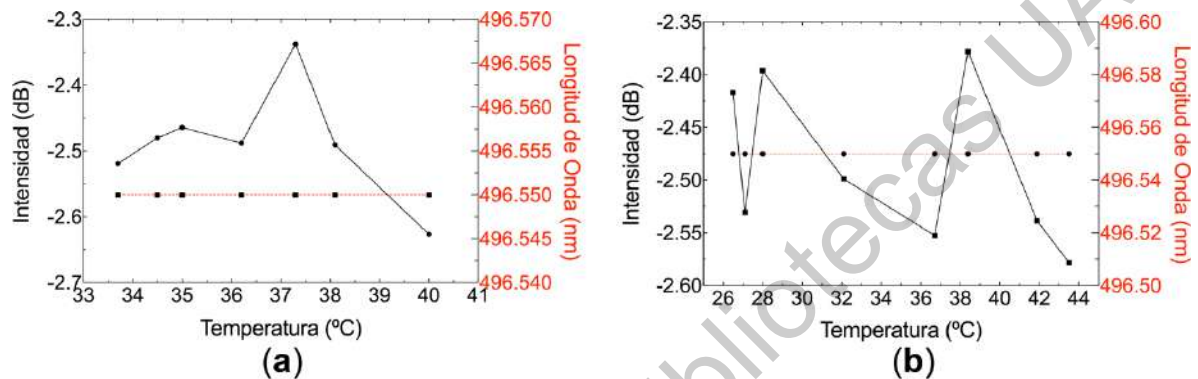


Figura 36 - Respuestas de intensidad y longitud de onda cuando (a) se modifica la temperatura de la muestra de leche y (b) cuando la temperatura exterior se modifica. Adaptado de (A. Gastélum-Barrios et al., 2019).

Por otra parte, la repetitividad del sistema fue probada tomando una muestra de leche con un contenido de 4.36% de grasa y a temperatura constante se realizaron 20 mediciones con el sistema óptico. Después de cada medición, el sistema permaneció sin muestra de leche durante 5 minutos. En la Figura 37 se pueden observar las variaciones de intensidad y longitud de onda para cada repetición. Los resultados indican que la variación de intensidad fue alrededor de 0.15 dB y el desplazamiento en longitud de onda presentado fue con un error cercano al 0.08%.

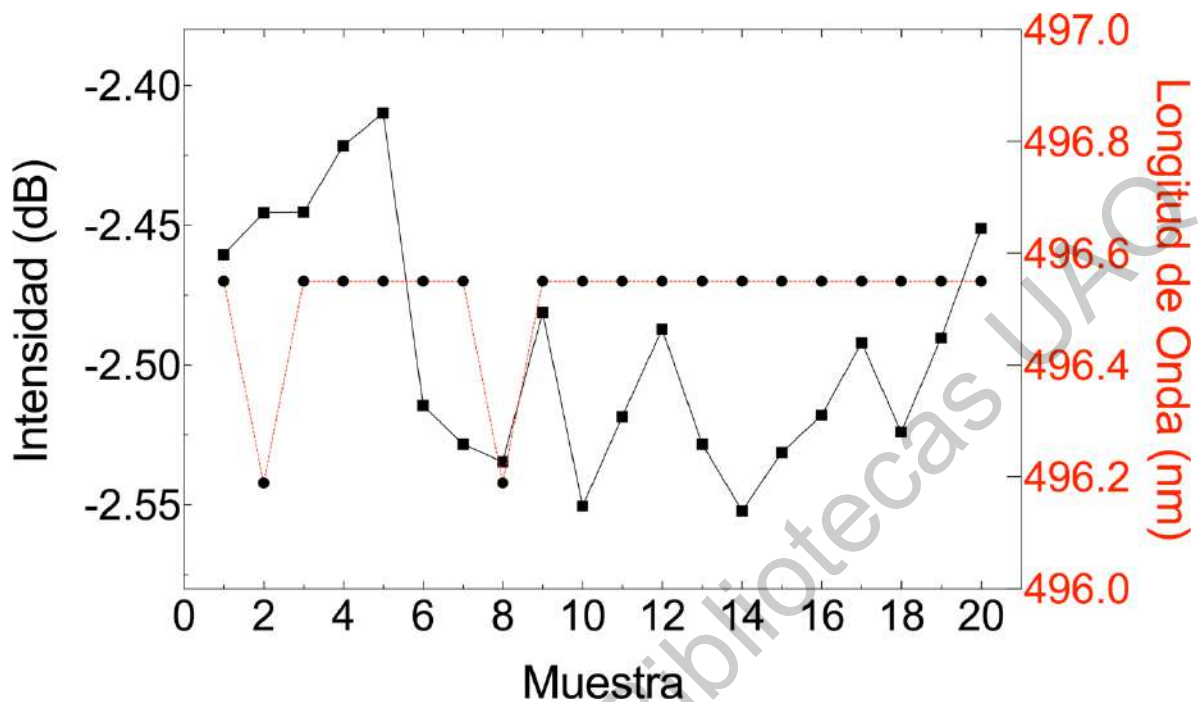


Figura 37 - Comparación entre la intensidad y el desplazamiento en longitud de onda para la prueba de repetitividad. (A. Gastélum-Barrios et al., 2019).

4.4. Análisis de respuesta en frecuencia

Hasta este momento, se ha demostrado que el análisis del desplazamiento en longitudes de onda que existe entre las señales que representan una muestra de leche comparándose con la señal de la fuente de luz, puede utilizarse para determinar el contenido de grasa y proteína de esta. Luego, el desplazamiento en longitudes de onda representa un movimiento con respecto al tiempo si lo analizamos desde el punto de vista en el dominio de la frecuencia mediante los Teoremas de Fourier. A continuación, se muestran algunos análisis mediante las técnicas de Fourier para demostrar que el desplazamiento entre las distintas señales existe y se puede cuantificar en el dominio de la frecuencia (modulación por frecuencia).

Retomando la señal mostrada en el inserto de la Figura 31, podemos identificar que la forma de onda pertenece al tipo "*chirp*" (Capus y Brown, 2003), para el caso, una señal donde la frecuencia va disminuyendo con el tiempo. Para el

análisis de la Transformada de Fourier (FT, por sus siglas en inglés de *Fourier Transformation*), se ha dividido el interferograma en tres regiones: Región 1, comprendida de los 450-550 nm; Región 2, de los 550-650 nm; y Región 3, de los 650-750 nm. Tomando la señal emitida por la fuente de luz, se obtiene la respuesta en frecuencia mostrada en la Figura 38, donde se puede observar que la R1 contiene una componente de frecuencia espacial mayor que la R2, y esta a su vez mayor que la R3. Esto significa que las componentes de frecuencia en la onda en el dominio del tiempo disminuyen con respecto al tiempo.

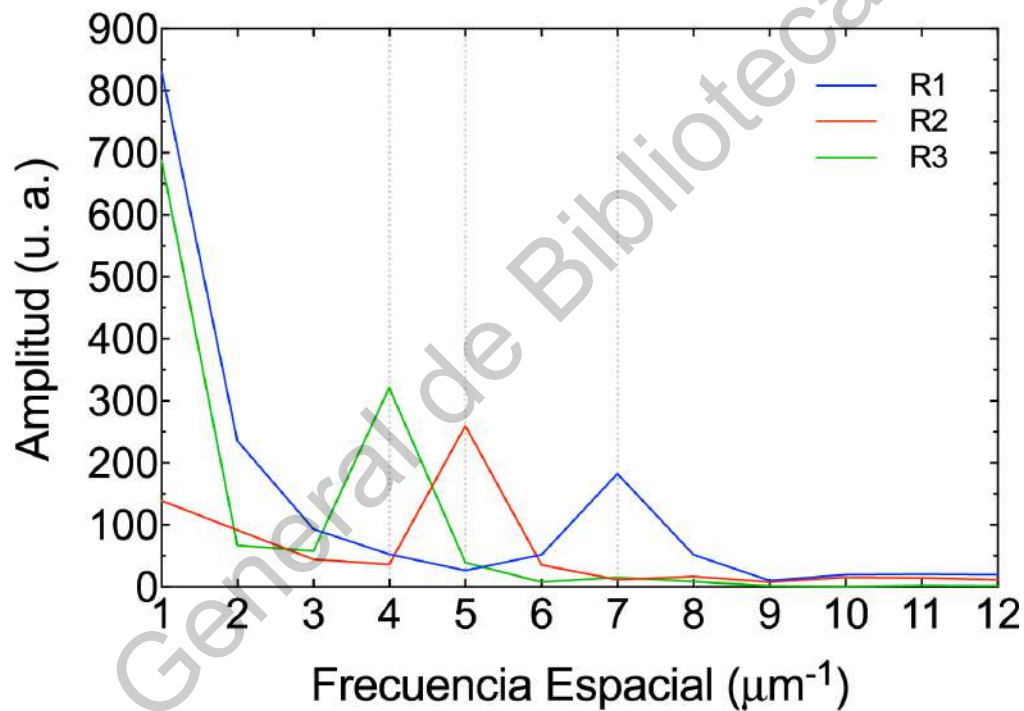


Figura 38 - Respuesta en frecuencia de la fuente de luz blanca. R1 representa el análisis del espectro comprendido entre los 450-550 nm, R2 en el rango de los 550-650 nm y R3 en el rango de los 650-750 nm.

Entonces, si analizamos la respuesta de las señales que representan las muestras de leche previamente analizadas con el sistema óptico, veremos que responderán al mismo comportamiento, centrando su componente de frecuencia en el mismo valor que la fuente de luz ya se estas señales son réplicas de la fuente de luz ligeramente alteradas por su interacción con las partículas de grasa y proteínas de la muestra de leche. En la Figura 39, se muestra el resultado del análisis de la

FT del rango R1, su respuesta en magnitud, una vista ampliada en la frecuencia espacial de valor siete y la respuesta en fase. En la Figura 39 (a) puede observarse que la respuesta en frecuencia contiene un armónico principal centrado en la frecuencia siete, misma que corresponde con el análisis de la fuente de luz en el espectro de frecuencias. Se puede observar una diferencia de las amplitudes de acuerdo a las distintas concentraciones de grasa en las muestras de leche [ver Figura 39 (b)], esperando una relación lineal entre el aumento del contenido de grasa contra el aumento en la amplitud; sin embargo, esto no se cumple para todas las muestras analizadas, solo existe una diferencia significativa entre la muestra de mayor y menor concentración de grasa. En el análisis de la fase [ver Figura 39 (c)], se puede observar que existe una diferencia de fase entre cada una de las muestras analizadas, esta diferencia permanece de manera constante en todo el rango. Este comportamiento nos permite aseverar que a distinta concentración de grasa existe un cambio en la fase de la señal. Sin embargo, de manera similar que el análisis anterior, la relación entre el aumento de la concentración de grasa y el ángulo de fase no responde a una correlación lineal para todas las muestras utilizadas. Por ejemplo, entre la muestra 0.97 y 1.06, se esperaría que la primera tuviera una menor fase que la segunda, y esto no se cumple, como si sucede con las muestras 2.16 y 1.71. Estas pequeñas diferencias, se podrían atribuir a que la concentración de proteína no es exactamente la misma para todas las muestras, lo ideal sería que todas las muestras analizadas tuvieran exactamente la misma concentración de proteínas, así se reflejaría únicamente el cambio en la fase (o magnitud) debido únicamente a la presencia de la grasa.

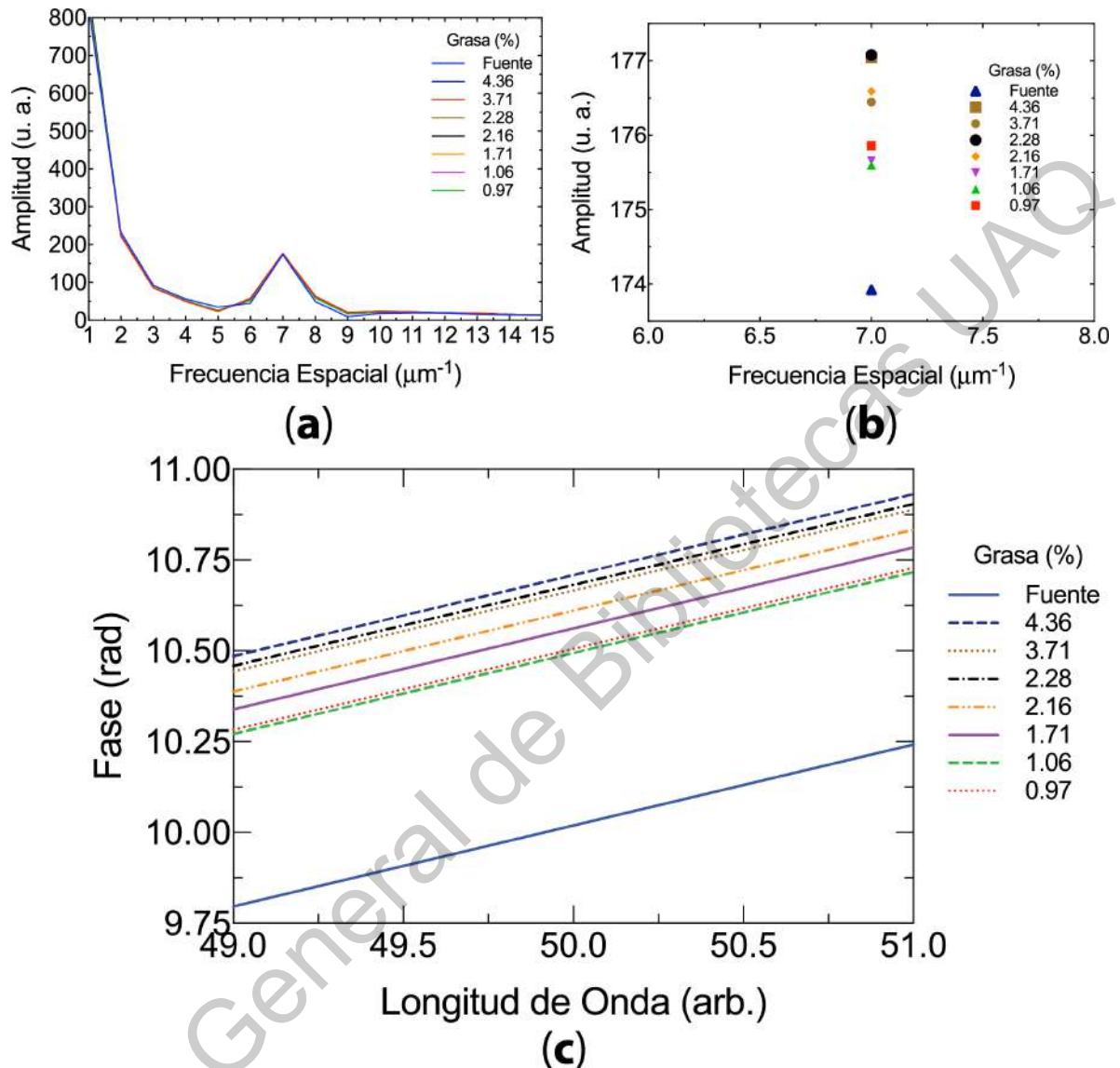


Figura 39 - (a) Respuesta en magnitud de la región R1 comprendida de los 450-550 nm. (b) Vista ampliada de la respuesta en magnitud centrada en la frecuencia espacial de siete. (c) Respuesta en fase centrada en 50 unidades.

De manera similar sucede con el análisis en las regiones R2 y R3, mostradas en la Figura 40 y Figura 41 respectivamente. Para el caso de la R2, las muestras de leche se encuentran centradas en la frecuencia espacial de $5 \mu\text{m}^{-1}$, observando que existe un desplazamiento en amplitud de acuerdo con la cantidad de grasa presente en ellas; sin embargo, este desplazamiento tampoco corresponde a un desplazamiento lineal. En el análisis de la fase [ver Figura 40 (c)], se puede observar

un claro corrimiento entre las muestras de leche y la fuente de luz; entre las muestras de leche no corresponden a un desplazamiento lineal. Para el caso de la R3 (ver Figura 41), las muestras se centran en la frecuencia de cuatro y de manera similar, la diferencia de las amplitudes no responde a una correlación lineal de acuerdo con el contenido de grasa de cada muestra.

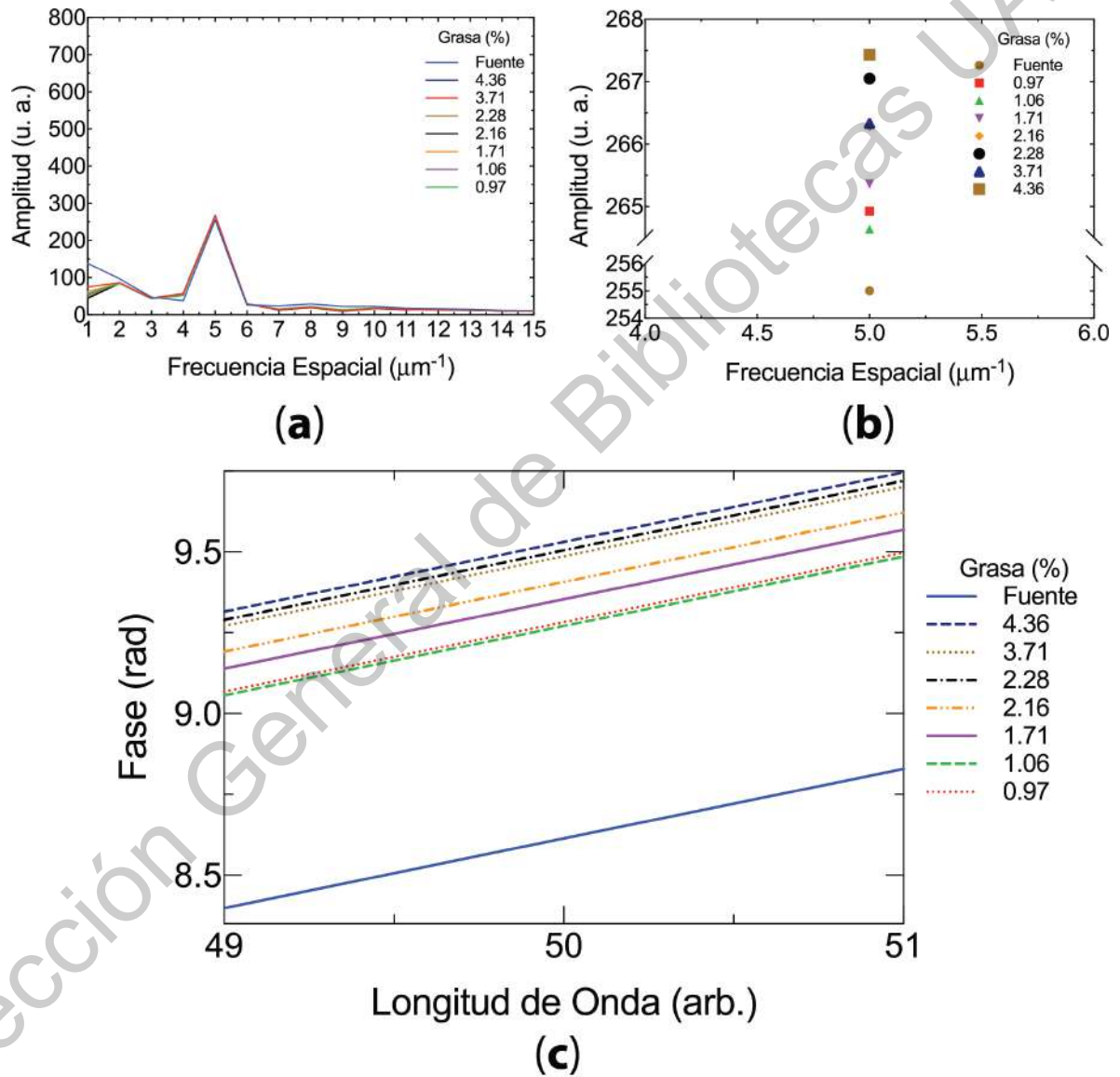


Figura 40 - (a) Respuesta en magnitud de la Región R2 comprendida de los 550-650 nm. (b) Vista ampliada de la respuesta en magnitud centrada en la frecuencia espacial de siete. (c) Respuesta en fase centrada en 50 unidades.

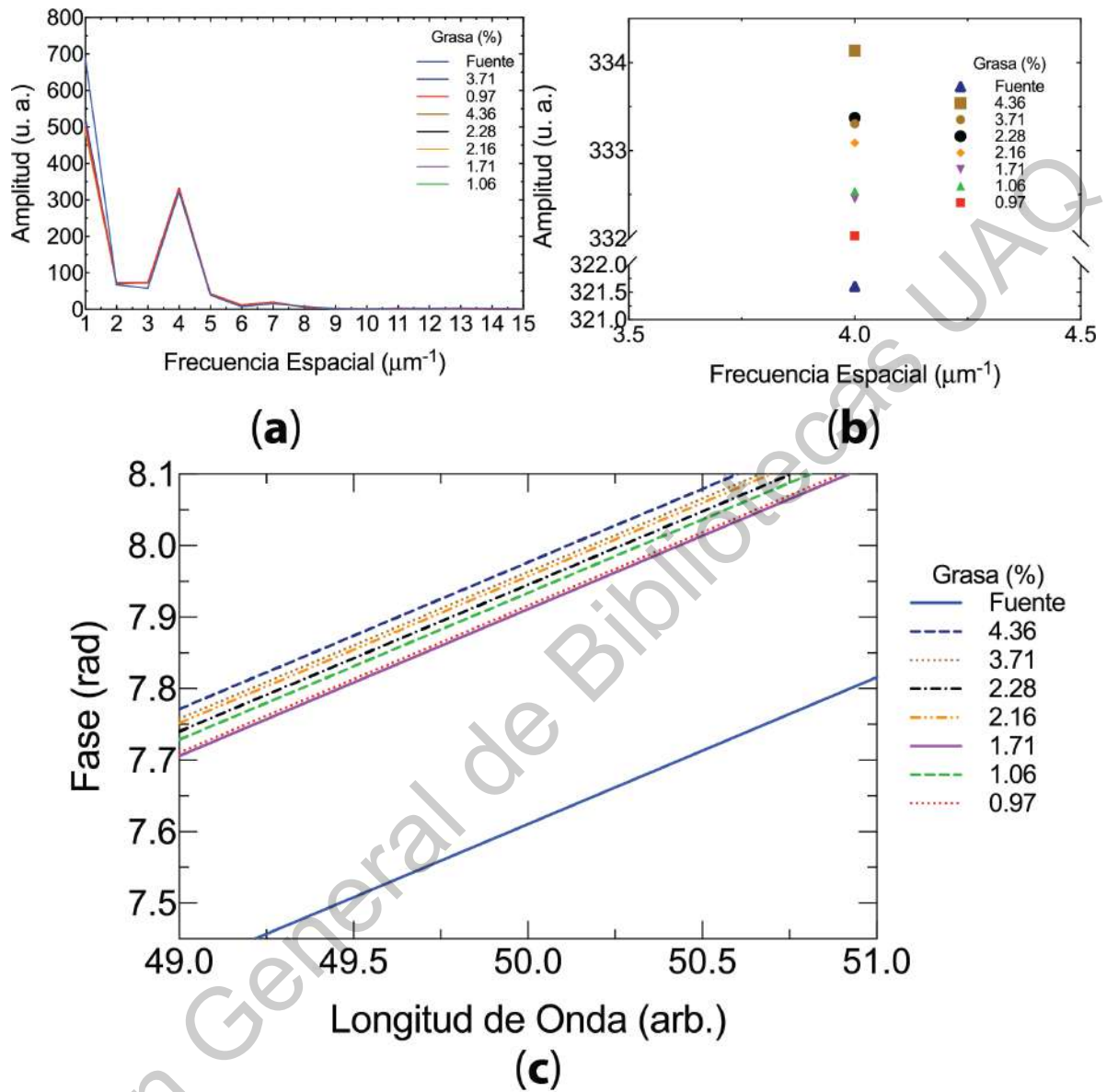


Figura 41 - (a) Respuesta en magnitud de la región R3 comprendida de los 650-750 nm. (b) Vista ampliada de la respuesta en magnitud centrada en la frecuencia espacial de siete. (c) Respuesta en fase centrada en 50 unidades.

Conclusiones y Recomendaciones

Un nuevo sistema y método no invasivo para detectar y cuantificar variaciones de grasa y proteína en leche cruda de vaca fue diseñado, desarrollado y validado de manera experimental. El sistema emplea un arreglo óptico basado en fibra multimodal con un interferómetro extrínseco Fabry-Perot de una capa, el cual genera una respuesta dual cuando las diferentes direcciones de la luz son inducidas. El sistema genera una interferencia óptica con un FSR desde los 17.77 hasta los 35.13 nm, y una visibilidad máxima y mínima de 5.03 y 1.55 dB respectivamente. El espectro de interferencia fue analizado de acuerdo con las distintas muestras de leche con variaciones en grasa y proteína; como resultado, se determinó una operación óptica en los 500 nm. El EFPI genera un desplazamiento hacia longitudes de onda inferiores a medida que la cantidad de grasa y/o proteína se incrementa y esto es atribuido a la interacción que existe entre la luz incidente y las partículas de grasa y proteína en el medio. Se determinaron una sensibilidad máxima de 0.616 nm/% de grasa y de 4.571 nm/% de proteína para los modelos de estimación de grasa y proteína respectivamente. Los resultados experimentales obtenidos demuestran que el sistema es capaz de estimar el contenido de grasa y proteína en leche cruda de vaca con una $r^2 = 0.9763$ y $r^2 = 0.8780$ respectivamente. Además, las pruebas de repetitividad mostraron que las mediciones se pueden realizar con un error cercano al 0.08%. Por otro lado, los análisis térmicos indicaron que el sistema presenta inmunidad a los cambios de temperatura tanto de la muestra de leche, como del sistema. Además, mediante el análisis ANOVA se demuestra que no hay diferencias significativas entre los resultados del sistema desarrollado y el instrumento de laboratorio. También, a manera de comprobar el desplazamiento en frecuencia, se realizaron análisis de las señales utilizando las Transformadas de Fourier, encontrando que, de acuerdo con el contenido de grasa de las muestras, el sistema es capaz de detectar desplazamientos en magnitud y fase, corroborando con esto la pregunta de la investigación. El análisis en el dominio de la frecuencia se deja como una

introducción a una nueva propuesta de investigación, ya que la falta de linealidad en la respuesta se puede atribuir a las variaciones de proteína de las muestras de leche. De acuerdo con los resultados y las condiciones en las que se realizó el presente estudio, se puede concluir que la modulación por fase es una fiable alternativa para detectar pequeños cambios en la composición de grasa y proteína de leche de vaca, con respecto a los métodos ya descritos donde se utilizan modulación por amplitud. Para implementar este método en un sistema dedicado, es necesario añadir técnicas de procesamiento de señales embebidas en un sistema electrónico, así como desarrollar modelos de calibración.

Dirección General de Bibliotecas UAG

Bibliografía

- Aernouts, B., Polshin, E., Lammertyn, J., y Saeys, W. (2011). Visible and near-infrared spectroscopic analysis of raw milk for cow health monitoring: Reflectance or transmittance? *Journal of Dairy Science*, 94(11), 5315–5329. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4354>
- Aernouts, B., Van Beers, R., Watté, R., Huybrechts, T., Lammertyn, J., y Saeys, W. (2015). Visible and near-infrared bulk optical properties of raw milk. *Journal of Dairy Science*, 98(10), 6727–6738. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9630>
- Aernouts, Ben, Van Beers, R., Watté, R., Huybrechts, T., Jordens, J., Vermeulen, D., Van Gerven, T., Lammertyn, J., y Saeys, W. (2015). Effect of ultrasonic homogenization on the Vis/NIR bulk optical properties of milk. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 126, 510–519. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.01.004>
- Afimilk Ltd. (2020). *Afilab Milk Analyzer*. [Figura]. Recuperado de <https://www.afimilk.com/parlor-automation/>.
- Alves da Rocha, R., Paiva, I. M., Anjos de Carvalho Dos Anjos, V., Furtado, M. A. M., y Bell, M. J. V. (2015). Quantification of whey in fluid milk using confocal Raman microscopy and artificial neural network. *Journal of dairy science*, 3559–3567. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8548>
- Boeco GmbH. (2020). *BOECO Milk Analyzer LAC-SP*. [Figura]. Recuperado de <http://boeco.com/milk-analyzer/boeco-milk-analyzer-lac-sp-lac-spa&sk=422/>.
- Bogomolov, A, y Melenteva, A. (2013). Scatter-based quantitative spectroscopic analysis of milk fat and total protein in the region 400–1100nm in the presence of fat globule size variability. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 126, 129–139. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2013.02.006>
- Bogomolov, A., y Melenteva, A. (2013). Scatter-based quantitative spectroscopic analysis of milk fat and total protein in the region 400–1100nm in the presence of fat globule size variability. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 126, 129–139. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2013.02.006>

- Bogomolov, Andrey, Dietrich, S., Boldrini, B., y Kessler, R. W. (2012a). Quantitative determination of fat and total protein in milk based on visible light scatter. *Food Chemistry*, 134(1), 412–418. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.077>
- Bogomolov, Andrey, Dietrich, S., Boldrini, B., y Kessler, R. W. (2012b). Quantitative determination of fat and total protein in milk based on visible light scatter. *Food Chemistry*, 134(1), 412–418. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.077>
- Bogomolov, Andrey, Melenteva, A., y Dahm, D. J. (2013). Fat globule size effect on visible and shortwave near infrared spectra of milk. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 21(5), 435–440. <https://doi.org/10.1255/jnirs.1076>
- Burns, D. A., y Ciurczak, E. W. (2007). *Handbook of near-infrared analysis*. CRC press.
- Bylund, G., y Tetra Pak Processing Systems AB. (1995). *Dairy processing handbook*. Tetra Pak Processing Systems AB.
- Capus, C., y Brown, K. (2003). Short-time fractional Fourier methods for the time-frequency representation of chirp signals. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 113(6), 3253. <https://doi.org/10.1121/1.1570434>
- Crofcheck, C. L., Payne, F. A., y Mengüç, M. P. (2002). Characterization of milk properties with a radiative transfer model. *Applied Optics*, 41(10), 2028. <https://doi.org/10.1364/ao.41.002028>
- Crofcheck, C., Wade, J., Swamy, J. N., Aslan, M. M., y Mengüç, M. P. (2005). Effect of fat and casein particles in milk on the scattering of elliptically polarized light. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, 48(3), 1147–1155. <https://doi.org/10.13031/2013.18488>
- Dave, A., Banwari, D., Mansinghani, S., Srivastava, S., y Sadistap, S. (2017). Ultrasonic sensing system for detecting water adulteration in milk. *IEEE Region 10 Annual International Conference, Proceedings/TENCON*, 2228–2231. <https://doi.org/10.1109/TENCON.2016.7848424>

- Determination of nitrogen content—Part 1: Kjeldahl method, Pub. L. No. 20–1 (2001).
- Deutsch, B., Beams, R., y Novotny, L. (2010). Nanoparticle detection using dual-phase interferometry. *Applied Optics*, 49(26), 4921–4925. <https://doi.org/10.1364/AO.49.004921>
- dong Feng, X., Su, R., Xu, N., hua Wang, X., min Yu, A., qi Zhang, H., y bo Cao, Y. (2013). Portable analyzer for rapid analysis of total protein, fat and lactose contents in raw milk measured by non-dispersive short-wave near-infrared spectrometry. *Chemical Research in Chinese Universities*, 29(1), 15–19. <https://doi.org/10.1007/s40242-013-2191-y>
- El-Abassy, R. M., Eravuchira, P. J., Donfack, P., von der Kammer, B., y Materny, A. (2011). Fast determination of milk fat content using Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 56(1), 3–8. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2010.07.001>
- EON Trading Ltd. (2020). *Ekomilk TOTAL*. [Figura]. Recuperado de <https://www.eonbg.com/product/ekomilk-total-ultrasonic-milk-analyzers/>.
- Etzion, Y., Linker, R., Cogan, U., y Shmulevich, I. (2004). Determination of protein concentration in raw milk by mid-infrared fourier transform infrared/attenuated total reflectance spectroscopy. *Journal of dairy science*, 87(9), 2779–2788. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73405-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73405-0)
- Feng, X, Su, R., Xu, N., Wang, X., Yu, A., Zhang, H., y Cao, Y. (2013). Portable analyzer for rapid analysis of total protein, fat and lactose contents in raw milk measured by non-dispersive short-wave near-infrared spectrometry. *Chemical Research in Chinese Universities*, 29(1), 15–19. <https://doi.org/10.1007/s40242-013-2191-y>
- Feng, Xu dong, Su, R., Xu, N., Wang, X. hua, Yu, A. min, Zhang, H. qi, y Cao, Y. bo. (2013). Portable analyzer for rapid analysis of total protein, fat and lactose contents in raw milk measured by non-dispersive short-wave near-infrared spectrometry. *Chemical Research in Chinese Universities*, 29(1), 15–19.

<https://doi.org/10.1007/s40242-013-2191-y>

- Forcato, D. O., Carmine, M. P., Echeverría, G. E., Pécora, R. P., y Kivatinitz, S. C. (2005). Milk Fat Content Measurement by a Simple UV Spectrophotometric Method: An Alternative Screening Method. *Journal of Dairy Science*, 88(2), 478–481. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72709-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72709-0)
- Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., Mcsweeney, P. L. H., y O'Mahony, J. A. (2015). Dairy Chemistry and Biochemistry. En *Dairy Chemistry and Biochemistry* (Second, Vol. 1542, Número 9). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-14892-2>
- G. Haugaard and J. D. Pettinati. (1959). Photometric milk fat determination. *J. Dairy Sci.*, 42, 1255–1275. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(59\)90730-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(59)90730-1)
- Gastélum-Barrios, A., Soto-Zarazúa, García-Trejo, Sierra-Hernandez, y Jauregui-Vazquez. (2019). A New Method for Total Fat Detection in Raw Milk Based on Dual Low-Coherence Interferometer. *Sensors*, 19(20), 4562. <https://doi.org/10.3390/s19204562>
- Gastélum-Barrios, Abraham, Soto-Zarazúa, G. M., Escamilla-García, A., Toledano-Ayala, M., Macías-Bobadilla, G., y Jauregui-Vazquez, D. (2020). Optical Methods Based on Ultraviolet, Visible, and Near-Infrared Spectra to Estimate Fat and Protein in Raw Milk: A Review. *Sensors*, 20(12), 3356. <https://doi.org/10.3390/s20123356>
- Goulden, J. D. S. (1964). Analysis of milk by infra-red absorption. *Journal of Dairy Research*, 31(03), 273–284. <https://doi.org/10.1017/S0022029900018203>
- Gowri, A., Rajamani, A. S., Ramakrishna, B., y Sai, V. V. R. (2019). U-bent plastic optical fiber probes as refractive index based fat sensor for milk quality monitoring. *Optical Fiber Technology*, 47, 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.yofte.2018.11.019>
- Hecht, E. (2017). *Optica* (5a ed.). Madrid: Pearson Educación.
- Hongyu, W., Hulbert, G. J., y Mount, J. R. (2000). Effects of ultrasound on milk homogenization and fermentation with yogurt starter. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 1(3), 211–218.

[https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(00\)00020-5](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(00)00020-5)

- Howard R. Stuart. (2000). Dispersive Multiplexing in Multimode Optical Fiber. *Science*, 289(5477), 6–9.
- Hulst, H. C., y van de Hulst, H. C. (1981). *Light scattering by small particles*. Courier Corporation.
- J & M Analytik AG. (2020). *TIDAS P Milk Analyzer*. [Figura]. Recuperado de <https://www.pharma-test/>.
- Jain, P., y Sarma, S. E. (2015). *Light scattering and transmission measurement using digital imaging for online analysis of constituents in milk*. 95254A. <https://doi.org/10.1117/12.2184903>
- Kawamura, S., Kawasaki, M., Nakatsuji, H., y Natsuga, M. (2007). Near-infrared spectroscopic sensing system for online monitoring of milk quality during milking. *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety*, 1, 37–43. <https://doi.org/10.1007/s11694-006-9001-x>
- Kawasaki, M., Kawamura, S., Tsukahara, M., Morita, S., Komiya, M., y Natsuga, M. (2008). Near-infrared spectroscopic sensing system for on-line milk quality assessment in a milking robot. *Computers and Electronics in Agriculture*, 63(1), 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2008.01.006>
- Kimbahune, S., Ghose, S. M., B. S., M., Shinde, S., y Jha, A. K. (2016). *Hyperspectral sensing based analysis for determining milk adulteration*. May 2016, 98600E. <https://doi.org/10.1117/12.2223439>
- Kuaye, A. Y. (1994). An ultraviolet spectrophotometric method to determine milk protein content in alkaline medium. *Food Chemistry*, 49(2), 207–211. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(94\)90160-0](https://doi.org/10.1016/0308-8146(94)90160-0)
- Kucheryavskiy, S., Melenteva, A., y Bogomolov, A. (2014). Determination of fat and total protein content in milk using conventional digital imaging. *Talanta*, 121, 144–152. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.12.055>

- Labtron Equipment Ltd. (2020). *Milk Fat Analyzer LAMA-B10*. [Figura]. Recuperado de <https://www.labtron.com/Lab-Equipment/Milk-Analyzers/Milk-Fat-Analyzer/LAMA-B10>.
- Lee, C. E., y Taylor, H. F. (1991). Fiber-optic Fabry-Perot temperature sensor using a low-coherence light source. *Journal of Lightwave Technology*, 9(1), 129–134. <https://doi.org/10.1109/50.64932>
- Li, X., Huo, G., Wang, Y., Sun, H., y Kong, Q. (2016). Research on Rapid Detection Method of Protein and Fat in Raw Milk Based on Mid-infrared Spectrum. *International Journal of Multimedia and Ubiquitous Engineering*, 11(10), 131–142. <https://doi.org/10.14257/ijmue.2016.11.10.12>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, 193(1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/0304-3894\(92\)87011-4](https://doi.org/10.1016/0304-3894(92)87011-4)
- Luinge, H. J., Hop, E., Lutz, E. T. G., van Hemert, J. A., y de Jong, E. A. M. (1993). Determination of the fat, protein and lactose content of milk using Fourier transform infrared spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 284(2), 419–433. [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(93\)85328-H](https://doi.org/10.1016/0003-2670(93)85328-H)
- Lüthi-Peng, Q., y Puhan, Z. (1999). Determination of protein and casein in milk by fourth derivative UV spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta*. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(98\)00823-X](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(98)00823-X)
- Mabood, F., Jabeen, F., Hussain, J., Al-Harrasi, A., Hamaed, A., Al Mashaykhi, S. A. A., Al Rubaiey, Z. M. A., Manzoor, S., Khan, A., Haq, Q. M. I., Gilani, S. A., y Khan, A. (2017). FT-NIRS coupled with chemometric methods as a rapid alternative tool for the detection & quantification of cow milk adulteration in camel milk samples. *Vibrational Spectroscopy*. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2017.07.004>
- Mäntele, W., y Deniz, E. (2017). UV–VIS absorption spectroscopy: Lambert-Beer reloaded. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 173, 965–968. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2016.09.037>

- McCarthy, O. J. (2002). Physical and Physico-Chemical Properties of Milk. En *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Vol. 3, pp. 467–477). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00311-3>
- Medjadba, H., Lecler, S., Mokhtar Simohamed, L., Fontaine, J., y Meyrueis, P. (2011). Investigation of mode coupling effects on sensitivity and bias of a multimode fiber loop interferometer: Application to an optimal design of a multimode fiber gyroscope. *Optical Fiber Technology*, 17(1), 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.yofte.2010.10.004>
- Melfsen, A., Hartung, E., y Haeussermann, A. (2012). Accuracy of in-line milk composition analysis with diffuse reflectance near-infrared spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 95(11), 6465–6476. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5388>
- Milkotester Ltd. (2020). Milk Analyzers. [Figura]. Recuperado de <https://milkotester.com/>.
- Milkotronic Ltd. (2020). *Lactoscan MCCWS*. [Figura]. Recuperado de [https://lactoscan.com/home-\(20,1,1\)](https://lactoscan.com/home-(20,1,1)).
- Muniz, R., Perez, M. a, de la Torre, C., Carleos, C. E., Corral, N., y Baro, J. a. (2009). Comparison of Principal Component Regression (Pcr) and Partial Least Square (Pls) Methods in Prediction of Raw Milk Composition by Vis-Nir Spectrometry. Application to Development of on-Line Sensors for Fat, Protein and Lactose Contents. *Xix Imeko World Congress: Fundamental and Applied Metrology, Proceedings*, 2564–2638.
- Muñoz-Ossa, H. A., Reyes-Vera, E., Causado-Buelvas, J. D., Lora-Jaramillo, G. J., y Dominguez-Gómez, D. M. (2011). Medición Del Porcentaje De Grasa En Leche Líquida Usando “Tapers” De Fibra Óptica. *Revista Colombiana de Física*, 43(3), 925–928.
- Nakai, S., y Le, A. C. (1970). Spectrophotometric Determination of Protein and Fat in Milk Simultaneously. *Journal of Dairy Science*, 53(3), 276–278. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(70\)86197-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(70)86197-5)

- Ng-Kwai-Hang, K. F., Hayes, J. F., Moxley, J. E., y Monardes, H. G. (1986). Relationships Between Milk Protein Polymorphisms and Major Milk Constituents in Holstein-Friesian Cows. *Journal of Dairy Science*, 69(1), 22–26. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(86\)80364-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(86)80364-2)
- Niero, G., Penasa, M., Gottardo, P., Cassandro, M., y De Marchi, M. (2016). Short communication: Selecting the most informative mid-infrared spectra wavenumbers to improve the accuracy of prediction models for detailed milk protein content. *Journal of Dairy Science*, 99(3), 1853–1858. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10318>
- Ocean Insight Inc. (2020). Analizador de espectros ópticos USB2000+. [Figura]. Recuperado de <https://www.oceaninsight.com/products/spectrometers/usb-series/usb-uv-nir/>.
- Ocean Optics Inc. (2020). Base para celda de cuarzo CUV-FL-DA. [Figura]. Recuperado de <https://www.labcompare.com/1534-Microscope-Holder/3627105-CUV-FL-DA-Cuvette-Holder/>.
- Ohtani, S., Wang, T., Nishimura, K., y Irie, M. (2005). Milk fat analysis by fiber-optic spectroscopy. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 18(4), 580–583. <https://doi.org/10.5713/ajas.2005.580>
- Penner, M. H. (2017). Basic Principles of Spectroscopy. En *Food Analysis* (pp. 79–88). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5>
- Pinto, M., Carrasco, E., Fraser, L., Letelier, A., y Dörner, P. (1998). Composición química de la leche cruda y sus variaciones a nivel de silos en plantas lecheras de la VIII, IX y X regiones de Chile. Parte I. Macrocomponentes. *Agro Sur*, 26(2), 97–109.
- Qi, P. X., Ren, D., Xiao, Y., y Tomasula, P. M. (2015). Effect of homogenization and pasteurization on the structure and stability of whey protein in milk. *Journal of dairy science*, 98(5), 2884–2897. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8920>
- Ragni, L., Iaccheri, E., Cevoli, C., y Berardinelli, A. (2016). Spectral-sensitive Pulsed Photometry to predict the fat content of commercialized milk. *Journal of Food*

- Engineering*, 171, 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.10.017>
- Rahmelow, K., y Hübner, W. (1997). Infrared spectroscopy in aqueous solution: Difficulties and accuracy of water subtraction. *Applied Spectroscopy*, 51(2), 160–170. <https://doi.org/10.1366/0003702971940080>
- Regnima, G.-O., Koffi, T., Bagui, O., Kouacou, A., Kristensson, E., Zoueu, J., y Berrocal, E. (2017). Quantitative measurements of turbid liquids via structured laser illumination planar imaging where absorption spectrophotometry fails. *Applied Optics*, 56(13), 3929–3938. <https://doi.org/10.1364/AO.56.003929>
- Saldaña Sanchez, A. J. del S. (2018). *Fabricación de un interferómetro modal de fibra óptica y su análisis como dispositivo sensor*. Universidad de Guanajuato.
- Šašić, S., y Ozaki, Y. (2001). Short-wave near-infrared spectroscopy of biological fluids. 1. Quantitative analysis of fat, protein, and lactose in raw milk by partial least-squares regression and band assignment. *Analytical Chemistry*, 73(1), 64–71. <https://doi.org/10.1021/ac000469c>
- Shapiro, D. B., Hull, P. G., Hunt, A. J., y Hearst, J. E. (1994). Calculations of the Mueller scattering matrix for a DNA plectonemic helix. *The Journal of Chemical Physics*, 101(5), 4214–4221. <https://doi.org/10.1063/1.467471>
- Shen, Y. X., Xiao, K., Liang, P., Ma, Y. W., y Huang, X. (2013). Improvement on the modified Lowry method against interference of divalent cations in soluble protein measurement. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(9), 4167–4178. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4783-3>
- SIAP. (2016). *Boletín de Leche*. <http://www.gob.mx/siap/documentos/boletin-de-leche?state=draft>
- Stocker, S., Foschum, F., Krauter, P., Bergmann, F., Hohmann, A., Scalfi Happ, C., y Kienle, A. (2016). Broadband Optical Properties of Milk. *Applied Spectroscopy*, 0(0), 1–12. <https://doi.org/10.1177/0003702816666289>
- Stocker, Sabrina, Foschum, F., Krauter, P., Bergmann, F., Hohmann, A., Happ, C. S., y Kienle, A. (2017). Broadband Optical Properties of Milk. *Appl.*

- Spectrosc.*, 71(5), 951–962. <http://as.osa.org/abstract.cfm?URI=as-71-5-951>
- Thorlabs, Inc. (2020). *Fuente de banda ancha MBB1F1*. [Figura]. Recuperado de <https://www.thorlabs.com/thorproduct.cfm?partnumber=MBB1F1>.
- Thorlabs, Inc. (2020a). *Controlador LEDD1B*. [Figura]. Recuperado de <https://www.thorlabs.com/thorproduct.cfm?partnumber=LEDD1B>.
- Thorlabs, Inc. (2020b). *Conector de fibra óptica TM200R5S2A*. [Figura]. Recuperado de <https://www.thorlabs.com/thorproduct.cfm?partnumber=TM200R5S2A>.
- Valle-Atilano, F. J., Estudillo-Ayala, J. M., Filoteo-Razo, J. D., Hernández-García, J. C., Jáuregui-Vázquez, D., Sierra-Hernández, J. M., Rojas-Laguna, R., Mata-Chavez, R. I., y Samano-Aguilar, L. F. (2016). Generation of supercontinuum light in micro-structured fiber and polarization study at different wavelengths. *Proceedings of SPIE*, 9958, 995817. <https://doi.org/10.1117/12.2238372>
- Woo, Y. A., Terazawa, Y., Chen, J. Y., Iyo, C., Terada, F., y Kawano, S. (2002). Development of a new measurement unit (MilkSpec-1) for rapid determination of fat, lactose, and protein in raw milk using near-infrared transmittance spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, 56(5), 599–604. <https://doi.org/10.1366/0003702021955150>
- Xin, Q., Zhi Ling, H., Jian Long, T., y Zhu, Y. (2006). The rapid determination of fat and protein content in fresh raw milk using the laser light scattering technology. *Optics and Lasers in Engineering*, 44(8), 858–869. <https://doi.org/10.1016/j.optlaseng.2005.02.007>
- Yang, J., Yuan, L., y Jin, W. (2007). Improving the reliability of multiplexed fiber optic low-coherence interferometric sensors by use of novel twin-loop network topologies. *Review of Scientific Instruments*, 78(5). <https://doi.org/10.1063/1.2735564>
- Yin, J., Zhang, S., Yang, H., y Zhou, Z. (2015). Theoretical Study of the Effect of Multi-Diameter Distribution on the Mie Scattering Characteristics of Milk Fat. *Journal of Harbin Institute of Technology*, 22(6), 115–120.

<https://doi.org/10.11916/j.issn.1005-9113.2015.06.016>

Zhu, X., Zhao, Z., Qian, K., Wang, L., y Lan, X. (2016). A rapid method for measuring fat content in milk based on W-type optical fibre sensor system. *Transactions of the Institute of Measurement and Control*, 38(12), 1471–1479.

<https://doi.org/10.1177/0142331215593994>

Dirección General de Bibliotecas UAO