

# El método NIR combinado con el análisis quimiométrico PLS-da para determinar la adulteración del aceite de oliva con aceite de girasol

*The NIR method chemometric analysis combined with PLS -da to determine the adulteration of olive oil with sunflower oil*

M.Sc. John Diego Bolaños Alfaro<sup>1</sup>

Recibido: 29/3/2016 / Aprobado: 12/04/2016

## Resumen

Las cualidades nutricionales del aceite de oliva virgen y su alto precio en el mercado, lo convierten en un producto accesible para la adulteración; una mezcla con aceites de menor precio son difíciles de percibir en el producto embotellado, pero su calidad se perjudica. Este artículo reseña una regresión de mínimos cuadrados parciales, unida a un análisis discriminante (PLS-DA) como técnica de clasificación estadística. El modelo construido calculó la incógnita 1:  $73.5 \pm 6,5\%$  aceite de oliva, la incógnita 2:  $84,2 \pm 6,4\%$  y la incógnita 3:  $58,2 \pm 6,5\%$ . Al comparar los datos reales de las incógnitas, se evidencian valores confiables, dado que la incógnita 1 fue adulterada con un 30% de aceite de girasol, la incógnita 2 con 15% y la incógnita 3 con 40%. El porcentaje de error promedio de predicción propuesto es de un 2%; sin embargo, no se recomienda como técnica de cuantificación en porcentajes de adulteración menores al 7%, dado que la variabilidad de las muestras provoca solapamientos de clases. Se concluye que la técnica de espectroscopia infrarrojo cercano (NIR) permite clasificar y cuantificar adulteraciones de aceite con naturalezas de origen distintas, de una manera fácil y rápida, pero necesariamente sí se aplica un pretratamiento espectral unido al respectivo análisis y tratamiento estadístico de los datos.

**Palabras clave:** Quimiometría, adulteración, espectroscopia infrarrojo cercano.

## Abstract

The extraordinary nutritional qualities and high price on the market make virgin olive oil a worthwhile product for adulteration; a mixture of lower-priced oils is difficult to discern in a bottled product, but its quality would certainly be spoiled. For this article, a partial least squares regression, coupled with discriminant analysis (PLS-DA) as a statistical classification technique was performed. The constructed model calculated unknown factor # 1:  $73.5 \pm 6.5\%$  olive oil, unknown factor #2:  $84.2 \pm 6.4\%$  and unknown factor #3:  $58.2 \pm 6.5\%$ . Actual data of the unknown factors were compared. Consistent values are evident, because unknown factor #1 was adulterated with 30% sunflower oil, unknown factor #2 with 15% and unknown factor #3 with 40%. The average of the proposed percentage prediction error is 2%; however, this technique is not recommended for percentages of adulteration under 7% because the variability of the samples causes classes to overlap. In conclusion, the Near-Infrared Spectroscopy (NIRS) technique can classify and quantify adulteration of oil natures of different origins, easily and quickly, but only if a spectral pretreatment with its respective data analysis and statistical treatment is applied.

**Keywords:** Chemometrics, adulteration, Near-Infrared Spectroscopy.

---

<sup>1</sup> Pasante, Universidad de Rovira i Virgili. Tarragona. España. 2015. Correo electrónico: john.bolanos@ucr.ac.cr

## Introducción

El aceite de oliva “extra virgen” posee unas cualidades nutricionales y organolépticas que lo convierten en la grasa vegetal más valorada, debido en gran medida al modo de obtención del aceite. Esto hace que el precio de este producto sea muy elevado en comparación con otras grasas de origen vegetal, por lo que siempre está en el punto de mira de los adulteradores (Paganuzzi, 1997).

Desde el punto de vista de calidad de producción, Jiménez, Izquierdo, Rodríguez, (2000) explican que el contenido de aceite en la aceituna y el porcentaje de humedad, definen la base del pago para el agricultor, una vez establecida la calidad de producto que entregan a la industria y que se utilizará como materia prima para la producción del aceite de oliva; ambas variables son de lenta y costosa determinación, por cuanto incluso la muestra es destruida a nivel de laboratorio durante su cuantificación.

Para colaborar con esta tarea de una manera más ágil, a principios de la década de los años de 1990 entran en acción la segunda generación de instrumentación de espectroscopia de infrarrojo cercano o NIRS, con la que se abren expectativas sobre las posibilidades que significaría su incorporación en los procesos de producción agroalimentaria. Sin embargo, estos sistemas tuvieron una casi nula penetración en dicho sector, debido a las limitaciones de los propios equipos, así como el poco conocimiento en el nivel quimiométrico (Jensen, 1993; Garrido, Gómez, Guerrero, Fernández, 1996).

La técnica NIR a nivel analítico se convierte en un método popular para el análisis químico en la industria alimentaria posterior al año 2000, debido al bajo costo que significa su utilización en determinaciones masivas (alto muestreo), así como la capacidad de realizar un análisis no destructivo y no invasivo de manera muy rápida y expedita (Özdemir, 2007).

Los espectro NIR cubren el rango de 780 nm a 2500 nm y la mayoría de las bandas de absorción observadas en esta región se deben a las vibraciones

moleculares entre enlaces moleculares de los principales grupos funcionales que la componen. Las bandas más comunes que se observan son los enlaces C-H, O-H o enlaces N-H que existen en las moléculas de una muestra de interés. Tal situación genera espectros en un muy corto tiempo, el cual evidencia los múltiples componentes que contiene dicha muestra y que tiende a ser característico e identificativo.

Morón (2004) explica que la tecnología NIR puede ser utilizada para la detección de adulteraciones en aceite de oliva vírgenes con aceites refinados, como el aceite de girasol, solo si se utiliza un análisis quimiométrico posterior. El presente artículo pretende demostrar que la aplicación de una regresión de mínimos cuadrados parciales, unida a un análisis discriminante o PLS-DA, permite obtener y evidenciar esas adulteraciones, construyendo un modelo que puede predecir muestras con adulteraciones, así como su grado de adulteración.

## Fundamento instrumental y quimiométrico

La tecnología NIRS se basa en la interacción que tiene lugar entre la radiación electromagnética infrarroja y la muestra, como consecuencia de la cual se producen cambios -como se mencionó- en el estado vibracional de las moléculas. El espectro vibracional de una molécula se considera una propiedad física única y, por tanto, característica de esa molécula. Así, en función de los enlaces presentes en las moléculas, la absorción de radiación será variable para cada frecuencia del espectro infrarrojo (Burns y Ciurczak, 1992). La forma de cuantificarla en la región NIR es a través de la medida de la energía reflejada o transmitida. La energía reflejada se expresa en unidades de absorbancia (A) definida como  $A = \log(1/R)$ , donde R son los valores de reflectancia o cociente entre la radiación reflejada por la muestra y la radiación incidente sobre la muestra (Williams y Norris, 1987; ASTM, 1994; Bertrand y Dufour, 2000).

La representación de los valores de absorbancia obtenidos a las diferentes longitudes de onda del rango NIR da lugar a una curva denominada

espectro NIR, el cual es resultado de los diferentes sobretonos, bandas de combinación y absorciones electrónicas de radiación de los grupos funcionales presentes en la muestra.

Para poder extraer dicha información a partir de los espectros NIR obtenidos se hace necesario el uso de métodos de análisis multivariante (Burns y Ciurczak, 1992; Osborne B; Fearn, T; Hindle, P, 1993; Naes T; Issaksson, T; Fearn, T; Davies, T, 2002); el cual se emplea para estimar cualquier propiedad de la muestra (físico-química, fundamentalmente) a partir de múltiples variables espectrales (valores de absorbancia a diferentes longitudes de onda). Una vez obtenidos los espectros NIR de las muestras seleccionadas, es necesario aplicar un pretratamiento espectral, que consiste normalmente en:

**a. Promedio de espectros:** el ruido es considerado una variación instrumental aleatoria, por lo que promediando varias señales analíticas de la misma muestra, el ruido disminuye y se mejora la relación señal/ruido.

**b. Suavizado espectral:** los métodos de suavizado son utilizados para reducir matemáticamente el ruido aleatorio o incrementar la relación señal/ruido (Beebe et al., 1998). Estos métodos utilizan una ventana de puntos para determinar un valor central, desplazando la ventana a lo largo de todo el espectro. Los métodos más utilizados son el de Savitzky-Golay (Savitzky & Golay, 1964) y el de la Transformada de Fourier (Horlick, 1972).

**c. Derivadas:** es uno de los pretratamientos más utilizados en espectroscopía NIR por su capacidad de solventar los problemas más característicos de esta técnica: el solapamiento de bandas y los desplazamientos de la línea base. La primera derivada elimina los desplazamientos de la línea base constantes y la segunda derivada elimina los desplazamientos que varían linealmente con la longitud de onda. Los métodos más utilizados son el de Savitzky-Golay (Savitzky & Golay, 1964) y el de Norris (Norris & Williams, 1984). Las derivadas por el método de Savitzky-Golay incorporan un suavizado, por lo que el tamaño de ventana es un

parámetro crítico. Si este es pequeño la derivada tendrá elevado ruido y si es grande la información espectral resultará demasiado suavizada (Beebe et al., 1998).

**d. Centrado:** el centrado es un pretratamiento habitual previo al desarrollo de un modelo de calibración o de un análisis de componentes principales. Consiste en centrar cada una de las N variables restando la media de todos los elementos de esa variable. Los vectores centrados tienen valor medio igual a cero, sin modificar la varianza. (Ramis et al., 2001).

En el nivel quimiométrico se logran atender necesidades específicas en el plano del diseño de experimentos óptimos, para asegurar máxima información útil recabada en el ámbito del trabajo de laboratorio, con lo cual se mejora el conocimiento sobre un sistema de interés, reduciendo considerablemente el costo al evitar la realización de múltiples y detallados análisis químicos y centrarse únicamente en la variables que tienen propiedades ocultas, las cuales arrojan información de mucho mayor interés en los procesos de control de calidad.

El análisis y tratamiento estadístico de los datos utilizando el software The Unscrambler 9.0 u otros software similares, permite realizar un análisis de componentes principales o PCA. Dentro de este ámbito estadístico, se describen los siguientes términos:

1. **PCA:** según Ramos (2001) un componente principal es una combinación lineal de las variables originales, que sigue la dirección de máxima variación en los datos y, por tanto, retiene el máximo de información en sí misma. En química elimina el ruido, permite predecir, clasificar o cuantificar una muestra, no obstante su nivel de confiabilidad depende directamente de la variabilidad máxima de los datos originales.
2. **PCR:** se basa en la descomposición de la matriz de datos espectrales mediante un PCA, por lo que genera una nueva matriz, con variables ortogonales no correlacionadas

(PCs); con las cuales desarrolla una regresión lineal junto con la matriz de datos que contiene la información de referencia. El inconveniente de este algoritmo es que solo usa la información espectral para calcular las nuevas variables.

3. **PLS:** se diferencia del anterior en que las nuevas variables ortogonales no solo se calculan a partir de la matriz de datos espectrales, sino que considera también la matriz de los datos de referencia. De este modo, las nuevas variables (*LV, Latent Variables*) maximizan la varianza explicada de la matriz espectral (*X*) de forma que sea relevante para predecir los parámetros de la matriz con los datos de referencia (*Y*) (Martens & Naes, 1989; Wold et al., 2001).
4. **PLS-DA:** se define como una regresión por mínimos cuadrados parciales, pero realizando un análisis discriminante, el cual se lleva a cabo con el fin de afinar la separación entre grupos de observaciones, obteniendo una separación máxima entre las clases; es decir, no permite otras variables de respuesta que no sea para la definición de los grupos de individuos. Como consecuencia, todas las variables medidas juegan el mismo papel con respecto a la asignación de clase.

El objetivo del artículo es detallar el proceso y evidenciar la detección de mezclas de aceites, utilizando la espectroscopia NIR como método de clasificación y detección de mezclas de aceites de oliva vírgenes y de girasol; matrices que tienen una composición química similar pero que se puede cuantificar incluso teniendo diferentes proporciones de adulteración.

### Ubicación de la investigación

Durante cuatro meses, debido a una beca corta de intercambio docente universitario, el autor realizó transferencia de conocimientos sobre el tema de quimiometría, entre la Universidad de Rovira i Virgili (URV) y la Universidad de Costa Rica (UCR). La actividad docente-investigativa

significó, el repaso sobre la utilización de técnicas estadísticas, las aplicaciones de la calibración y análisis univariante y multivariante; así como el debido proceso de investigación y trabajo a nivel de laboratorio del análisis con técnicas modernas de análisis, acompañadas del uso de componentes principales, sus métodos de clasificación y calibrado, entre otros contenidos de optimización experimental.

Específicamente se trabajó en el Laboratorio de Técnicas Analíticas Avanzadas, del Departamento de Química Analítica y Química Orgánica, ubicado en la Facultad de Química de la URV, ubicada en Provincia de Tarragona, España.

### Materiales y métodos

Se trabajó con seis botellas de aceite de oliva virgen extra de diferentes marcas que se etiquetaron con letras de la A a la F, para diferenciarlos. Además, se utilizó tres botellas de aceite de girasol, que se identificaron con los números del 1 al 3, con el fin de caracterizar espectralmente los dos grupos de estudio. Posteriormente, se realizaron mezclas para simular adulteraciones para el aceite de oliva, con el aceite de girasol, en proporciones previamente establecidas.

En el nivel de trabajo de laboratorio se utilizaron 200 viales con tapa de 20 mL, balanza granataria y un vaso de precipitados de 2 L. Se utilizó el equipo Mattson 300 espectrómetro FTIR (*Fourier transform infrared spectroscopy*); así como equipos de cómputo con el software *The Unscrambler 9.0*. Finalmente, en el nivel analítico, se siguió el método AOAC-IUPAC, N°969.33.

Se pesaron 10 g de muestra de los aceites puros (9 en total) y se midieron sus espectros por cuadruplicado; posteriormente, se prepararon 10 g de mezcla de los aceites, pesando en la balanza granataria, los equivalentes necesarios de las mezclas aleatorias entre los aceites de oliva y los aceites de girasol, para un total de 21 muestras por el respectivo porcentaje de adulteración, teniendo para el estudio un total de 136 determinaciones realizadas por cuadruplicado.

Las mezclas preparadas se colocaron en los viales con los siguientes porcentajes de aceite de girasol como material adulterante: 0% (muestra puro de aceite de oliva), 10%, 25%, 50%, 90%, 95%, 98% y 100% (muestra pura de aceite de girasol).

Se dejó a criterio del analista la mezcla entre las marcas de aceite tanto de girasol (1 a 3) como los de oliva (A a F), en tanto se asegure la máxima variabilidad, requisito indispensable para un análisis quimiométrico posterior. También se prepararon tres muestras incógnitas, cuyo porcentaje de adulteración se da bajo el supuesto de ser desconocido por el analista. Se pretendió con la investigación de laboratorio demostrar que

es posible cualificar y cuantificar, esas muestras; además proponer un modelo que también ofreciera el grado de eficiencia de su clasificación.

Una vez preparadas todas las muestras se procedió a establecer las condiciones de trabajo en el espectrómetro, según Tabla 1.

Consideraciones adicionales:

- Medir todas las muestras con la misma cubeta.
- Si se cambian las condiciones de trabajo, se tiene que volver a iniciar la corrida. Es recomendable hacer todas las medidas un mismo momento, para asegurar la reproducibilidad del equipo.

**Tabla 1. Condiciones de trabajo del espectrómetro NIR**

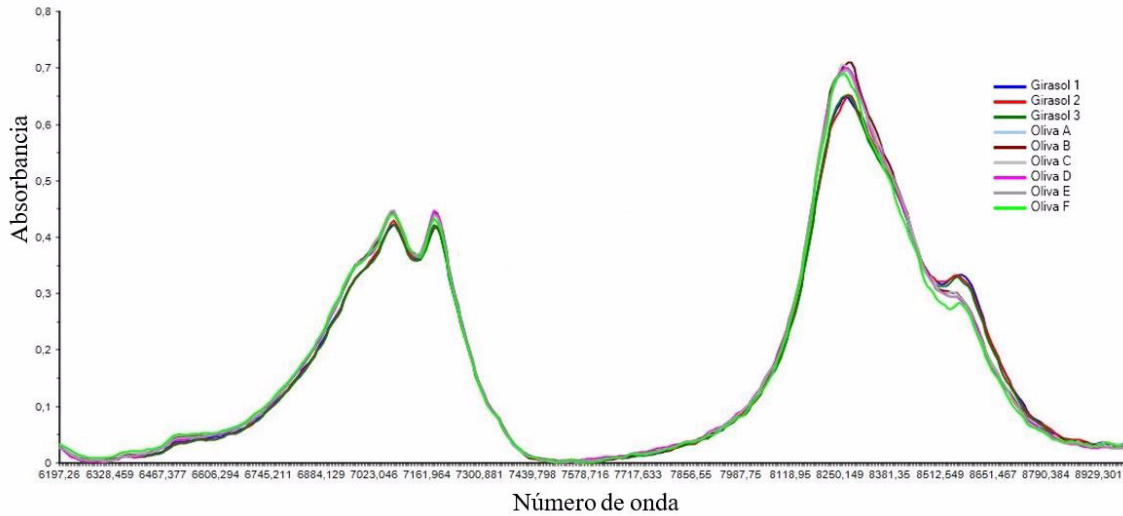
| Data type           | Abs                       |
|---------------------|---------------------------|
| Resolution          | 16.0 cm <sup>-1</sup>     |
| Sample scans        | 32                        |
| Background scans    | 32                        |
| Spectral Range      | NIR                       |
| Starting Wavenumber | 6200.000 cm <sup>-1</sup> |
| Ending Wavenumber   | 9000.000 cm <sup>-1</sup> |
| Bench number        | 1                         |

## Discusión y resultados

Para llevar a cabo el análisis de los espectros obtenidos por el NIR, es necesario realizar un pretratamiento espectral, con el fin de homologar las condiciones reales de análisis; también se requiere que todos los espectros, se conviertan en datos numéricos, con un formato específico para hacer la estadística y predicción de las muestras preparadas, en un software diferente al del equipo analítico (NIR).

Antes de guardar los datos (con extensión \*.dx) se debe asegurar entonces una corrección de la línea base, aplicando un “*baseline offset*” y “*linear*

*baseline correction*”, en el software del NIR. Así todos los espectros alcanzan el mismo nivel de línea base, donde se aprecian además espectros muy similares y homogéneos, casi no hay diferencias entre los de girasol y los de oliva. También, Para eliminar el ruido, se realiza una corrección denominada “*Smoothing*”, siguiendo el procedimiento S-Golay, como suavizado estadístico de los datos (ver figura 1), y se guardan los datos para utilizarlos en un análisis quimiométrico posterior el software Unscrambler 9.0.



En dicho programa, se ejecuta un análisis de componentes principales para establecer con cuantos componentes es importante realizar el análisis investigativo y para visualizar de manera preliminar, la existencia o no de una diferenciación entre los grupos de estudio, como por ejemplo una división por tipos de aceite (ver figura 2). Tal

situación, permite realizar una caracterización por porcentaje, si se mezclan los grupos de estudio en porcentajes conocidos de composición y se le pide al programa que los separe utilizando un PCR. Es importante destacar en este punto, que de no existir una separación clara, no sería posible llevar a cabo el presente estudio.

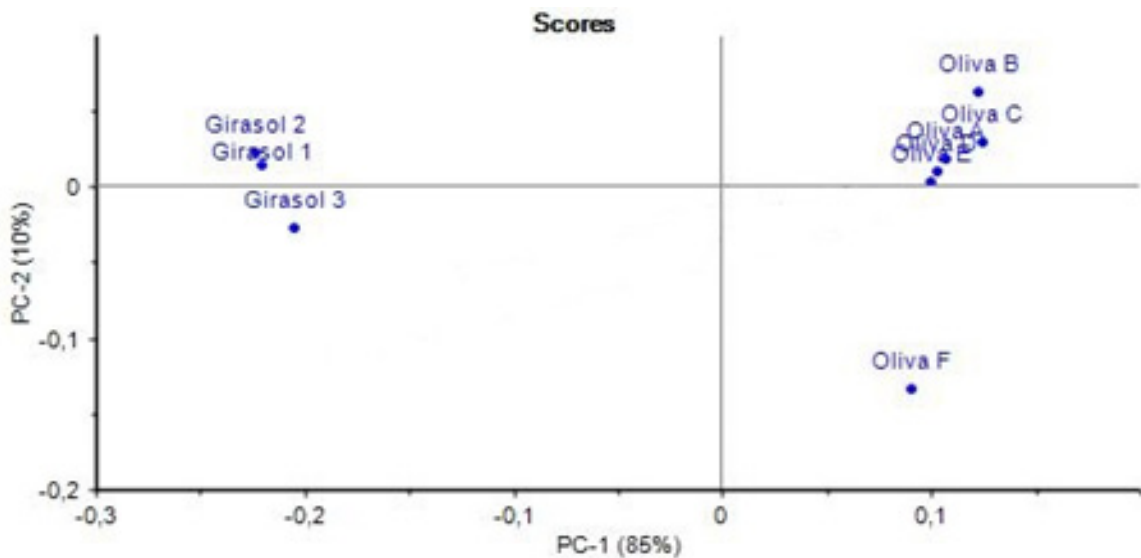


Figura 2. Gráfico de Scores, donde PC1 y PC2 explican 95% de la variabilidad

En la figura 2 se aprecia cómo la segunda componente principal, separa claramente los grupos de estudio (tipos de aceites), colocando los aceites de girasol a la izquierda y los aceites de oliva a la derecha, mientras que la primer componente principal separa las muestras según la afinidad o similitud entre sí.

Del análisis quimiométrico, se desprende que los aceites de girasol 1 y 2 son muy similares en su composición química, pero difieren en máxima medida con la composición química del aceite de oliva denominado F. Igualmente podemos asegurar que los aceites de oliva A, B, C, D, E son muy similares en su composición química entre sí; en tanto difieren del F debido a una condición física forzada en la determinación experimental,

que tiene que ver con el grado de transparencia de los aceites de oliva. Como el aceite de oliva F, es menos translucido, eso provoca una afectación en la cuantificación de la absorbancia y por ende una condición de máxima variabilidad entre el mismo grupo de aceites, pero aún con tal condición, el análisis de componentes no afecta la separación entre los dos grupos de estudio.

Una vez asegurada una alta variabilidad, superior al 95%, explicada con las PC1 y PC2, para tener una veracidad estadística como se aprecia en la figura 3; se realiza un centrado de los datos, una validación cruzada y se crean grupos según el porcentaje de adulteración conocido. Posteriormente, se clasifican las muestras incógnitas y se predice el porcentaje de adulteración.

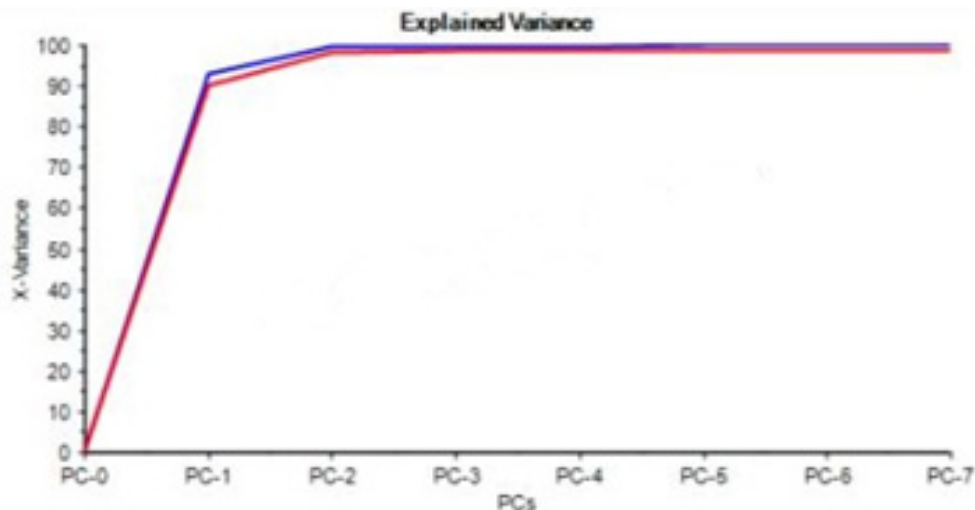


Figura 3. Gráfico de varianza explicada por el gráfico de scores

Para realizar un análisis de clasificación y ordenar las muestras por clase, utilizando los datos originales, se crea en la hoja de trabajo del programa, una nueva columna (variable); en esta columna se clasificarán los aceites según su porcentaje de aceite de girasol con excepción de las muestras incógnitas, las cuales serán calculadas por el modelo construido a partir de los datos prácticos de laboratorio, pero que son conocidos; tal procedimiento es lo que se conoce como un análisis PLS-DA.

Como se puede apreciar en la figura 4, las muestras tienden a formar agrupaciones

perpendiculares a la PC1, según sea el porcentaje de adulteración o mezcla de aceites. También se puede apreciar que en el caso de las adulteraciones con un bajo porcentaje de aceite de girasol, tienden a formar conglomerados, los cuales deberán clarificarse, en caso de proponer un modelo de predicción de muestras que permita una identificación de adulteración de aceites de oliva con bajos contenido de aceites de girasol.

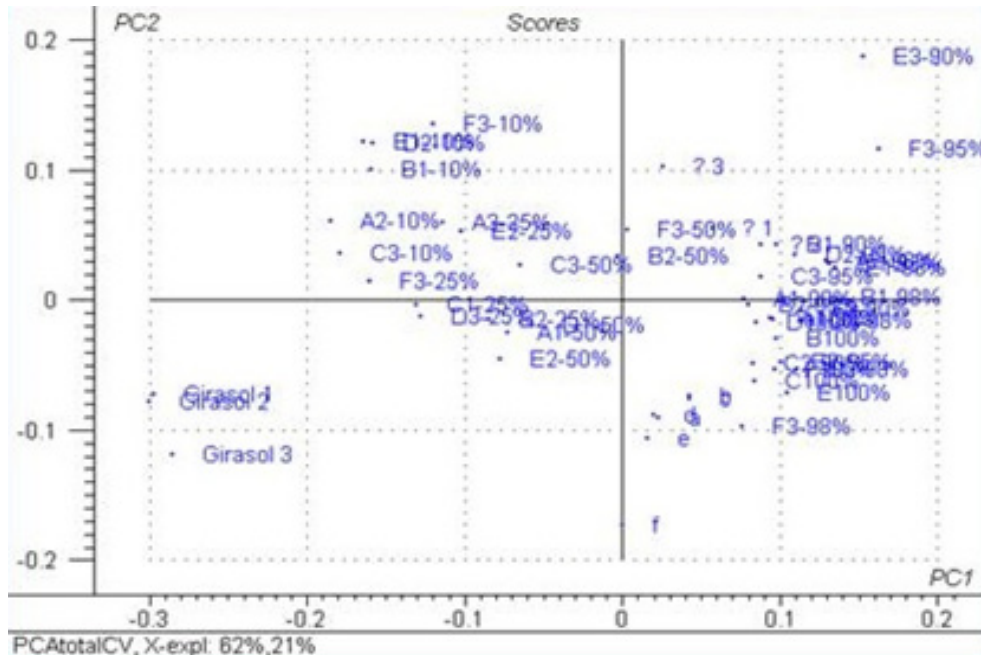


Figura 4. PCR obtenido a partir de las mezclas preparadas de aceites

En el software, el PLS-DA tiene que definir las “Y” como el porcentaje, utilizando la primera columna como una “clase” diferente; lo cual permitirá que calcule la regresión con la correlación a la recta; además permitirá el cálculo del error del método (RMSEC) entre otros datos útiles. Es muy importante que el modelo no supere un error mayor al 5% y para reducirlo es muy recomendable eliminar

los “outliers” o puntos que estén fuera del patrón normal de estudio, los cuales experimentalmente para este caso investigativo no se presentaron.

Finalmente, una vez obtenido el modelo PLS-DA, con el mínimo error, se predicen las tres muestras incógnitas; en la figura 5, se aprecia el resultado de la cuali-cuantificación de las muestras incógnitas.

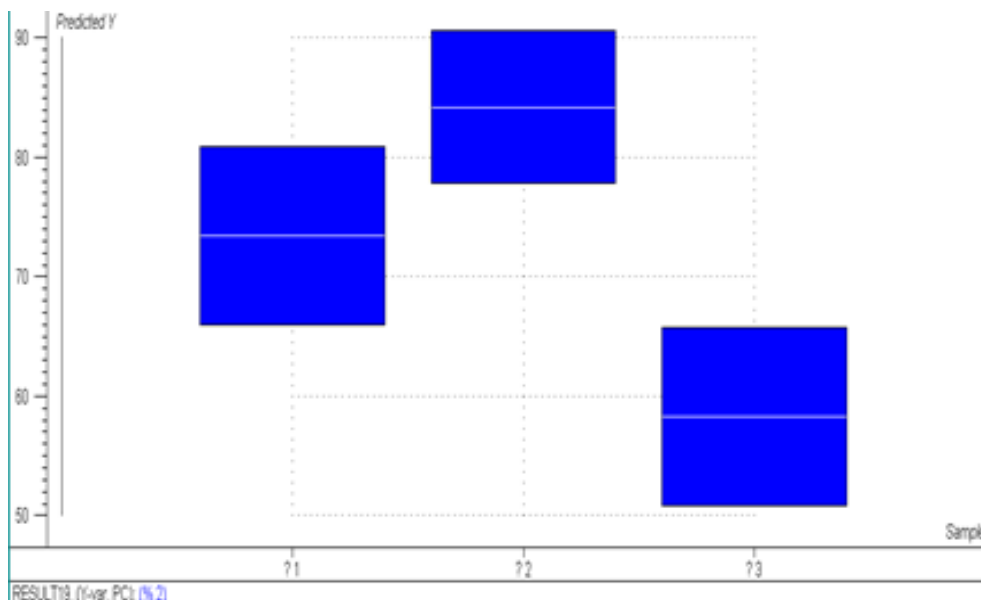


Figura 5. Predicción de incógnitas a partir del modelo PLS-DA experimental



Como se puede apreciar, el modelo construido calcula la incógnita 1 con un 73,5% de aceite de oliva y con una desviación de 6,5%, la incógnita 2, con un  $84,2 \pm 6,4\%$  y la incógnita 3 con un  $58,2 \pm 6,5\%$  de aceite de oliva. Al comparar los datos reales de las incógnitas, se evidencia que los valores son sumamente confiables, teniendo en cuenta que la incógnita 1 fue adulterada con un 30% de aceite de girasol, la incógnita 2 un 15% y la incógnita 3 un 40%.

El porcentaje de error promedio de predicción calculado para el modelo fue de 2%; sin embargo, en muestras con adulteración menores al 7%, bajo el presente modelo experimental no es recomendable su determinación debido a que la incertidumbre de las determinaciones supera el 6%.

## Conclusiones

- La descomposición de la matriz de datos espectrales obtenido por el NIR, analizados como matriz donde se combinan de manera lineal las variables originales (absorbancia y número de onda), permite obtener datos que siguen una variación máxima, que evidentemente es una variable oculta de la muestra de estudio, en este caso una diferenciación del tipo de aceite.
- El resultado experimental demuestra que de manera rápida se puede realizar el análisis de calidad del producto que está de venta en el mercado. Su estudio puede realizarse con el fin de demostrar si cumple con lo establecido en la etiqueta; por ende con lo que el cliente espera del producto y por el cual está pagando.
- Se puede concluir que la técnica de clasificación y calibración quimiométrica PLS-DA, es muy útil cuando existen sustancias interferentes (aceite de girasol para el presente estudio), las cuales incluso pueden ser desconocidas en la muestra a cuantificar y son de difícil eliminación.
- En este tipo de técnicas de clasificación y calibraciones es importante la ausencia del error sistemático; el cálculo de las regresiones

con dicho error, afectan significativamente la capacidad de predicción para el modelo construido.

## Agradecimientos

Un especial agradecimiento a la Sede de Occidente y a la Oficina de Asuntos Internacionales de la Universidad de Costa Rica por financiar la pasantía, bajo la modalidad de curso de corta duración; también al equipo profesores e investigadores del Equipo investigador de Quimiometría, Qualimetría y Nanosensores, del Departamento de Química Analítica y Química Orgánica, de la URV, por abrir las puertas de sus laboratorios, aulas y profesores para mejorar la formación investigativa del pasante.

## Bibliografía

- ASTM. 1994. Standard practices for infrared, multivariate, quantitative analysis. ASTM *Annual book of standards*. Standard E1655-94. ASTM, West Conshohocken, Estados Unidos.
- Beebe, K; Pell, R; Seasholtz, M. 1998. Chemometrics. *A practical guide*. John Wiley & Sons. New York, Estados Unidos.
- Bertrand, D; Dufour, E. 2000. *La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques*. Editions TEC & DOC, Paris, France.
- Burns, D; Ciurczak, E. 1992. *Handbook of near infrared analysis*. Marcel Dekker. New York, Estados Unidos.
- Garrido, A; Gómez, A; Guerrero, J; Fernández, V. 1996. NIRS: una tecnología de apoyo para un servicio integral en alimentación animal. *Avances en Alimentación y Nutrición Animal*. FEDNA, Madrid, España. 375-300.
- Horlick, G. 1972. Digital data handling of spectra utilizing Fourier transformations. *Analytical Chemistry*. 44, 943-947.

- Jiménez, A; Izquierdo, E; Rodríguez, F. 2000. Determinación de grasa y humedad en aceitunas mediante medidas de reflectancia en Infrarrojo cercano. *Grasas y Aceites*. 5 (5), 311-315
- Jensen, E. 1993. Use of NIRS for on-line process control during the manufacture of animal feed stuffs. *NIR Spectroscopy Developments in Agriculture and Food. International Conference*. ADAS. Drayton Birmingham. Reino Unido.
- Martens, H; Naes, T. 1989. *Multivariate calibration*. John Wiley and Sons Inc. Chichester, Reino Unido.
- Morón, O. 2004. *Trabajo Profesional fin de Carrera*. Universidad de Córdoba. España.
- Naes, T; Issaksson, T; Fearn, T; Davies, T. 2002. *A user-friendly guide to multivariate calibration and classification*. NIR Publications, Chichester, Reino Unido.
- Norris, K; Williams, P. 1984. Optimization of mathematical treatments of raw nearinfrared signal in the measurement of protein in hard red spring wheat. I. Influence of particle size. *Cereal Chemistry*. 61 (2), 158-165.
- Osborne, B; Fearn, T; Hindle, P. 1993. *Practical NIR Spectroscopy with Applications in Food and Beverage Analysis*. Longman Scientific and Technical London, Reino Unido.
- Ozdemir, D; Ozturk, B. 2007. Near infrared spectroscopic determination of olive oil adulteration with sunflower and corn oil. *Journal of food and drug analysis*. 15 (1), 40-47.
- Paganuzzi, V. 1997. *Journal Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*. 74, 49-58.
- Ramis, G; García M. 2001. *Quimiometría*. Editorial Síntesis S.A., Madrid, España.
- Savitzky, A; Golay, M. 1964. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Analytical Chemistry*. 36, 1627-1639.
- Williams, P; Norris, K. 1987. Near-infrared technology in the agricultural and food industries. *American Association of Cereal Chemist Inc.*, St. Paul, Estados Unidos.
- Wold, S; Sjöström, M; Eriksson, L. 2001. *PLS-regression: a basic tool of chemometrics. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 58, 109-130.